

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

Čičak, Martina

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:524842>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



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

Martina Čičak

PROVJERA VALJANOSTI KINETIČKOG MODELA BIODIPLOMSKI
SINTEZE FLUORIRANOG AZIDOALKOHOLA U RAZLIČITIM TIPOVIMA
REAKTORA

DIPLOMSKI RAD

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

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

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

doc. dr. sc. Dragana Vuk

Zagreb, rujan 2022.

Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević, na nesebičnoj pomoći, stručnim savjetima i konstruktivnim primjedbama.

Zahvaljujem se također asistentici Neveni Milčić na velikodušnoj potpori u izradi eksperimentalnog dijela rada i strpljivosti u odgovaranju na moja brojna pitanja.

Najviše hvala cijeloj mojoj obitelji, posebice roditeljima i sestrama. Hvala vam na ljubavi i neizmjerne podršci tijekom svih godina moga studiranja, hvala vam na svim kritikama, pohvalama i savjetima koji su mi uvelike pomogli da ostvarim svoje snove.

Dragi Ante, prijatelji, kolegice i kolege, hvala vam što ste mi godine studiranja učinili puno zabavnijima, lakšima i ispunjenijima te što ste bili uvijek tu za mene.

SAŽETAK

U ovom radu provedena je validacija, odnosno provjera valjanosti matematičkog modela biokatalitičke sinteze (*R*)-2-azido-1-[4-(trifluorometil) fenil] etanola u reakciji otvaranja prstena *rac*-2-[4-(trifluorometil) fenil] oksirana uz azidne ione. Kao biokatalizator korištena je varijanta enzima halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH) W249P. Također, ispitana je i operacijska stabilnost enzima, kao i njegova stabilnost prilikom inkubacije s racemičnom smjesom epoksida, odnosno azidom. Brzina reakcije opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom (*R*)-2-[4-(trifluorometil) fenil] oksiranom, kompetitivnom inhibicijom (*S*)-2-[4-(trifluorometil) fenil] oksiranom, *rac*-2-[4-(trifluorometil) fenil]-1,2-etandiolom i DMSO te inhibicijom produktom (*R*)-2-azido-1-[4-(trifluorometil) fenil] etanolom. Eksperimentalno je utvrđeno da model dobro opisuje eksperimentalne podatke.

Ključne riječi: matematički model, validacija modela, azidni ion, halogenhidrin-dehalogenaza, Michaelis-Menteničina kinetika, inhibicija

SUMMARY

In this research validation of mathematical model of biocatalytic synthesis (*R*)-2-azido-1-[4-(trifluoromethyl)phenyl]ethanol through *rac*-2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]oxirane ring-opening mediated by azide ions was carried out. The W249P variant of halohydrin dehalogenase (HHDH) enzyme was used as a biocatalyst. Also, the operational stability of enzyme, and its stability during incubation with *rac*-epoxide and sodium azide were evaluated. The reaction rate was described by double-substrate Michaelis-Menten kinetics with substrate (*R*)-2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]oxirane inhibition, competitive inhibition by (*S*)-2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]oxirane, *rac*-2-[4(trifluoromethyl)phenyl]-1,2-ethanediol and DMSO, and product inhibition by (*R*)-2-azido-1-[4-(trifluoromethyl)phenyl]ethanol. The mathematical model described the experimental data well.

Key words: mathematical model, model validation, azide ion, halohydrin-dehalogenase, Michaelis-Menten kinetics, inhibition



Ovaj rad financirala je Hrvatska zaklada za znanost u okviru projekta "Enzimaska sinteza fluoriranih kiralnih građevnih blokova (EnzyFluor)", IP-2018-01-449

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1 Biokatalizatori	2
2.1.1 Biokatalizatori općenito	2
2.1.2 Struktura biokatalizatora	4
2.1.3 Podjela biokatalizatora	6
2.1.4 Biokataliza.....	7
2.1.5 Halogenhidrin – dehalogenaza	8
2.2 Optički čiste tvari.....	10
2.2.1 Epoksidi.....	11
2.2.2 Dobivanje optički čistih tvari	12
2.3 Modeliranje biotransformacija	13
2.3.1 Kinetički modeli enzimskih reakcija.....	14
2.3.2 Model kotlastog reaktora.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1 Aparatura	18
3.1.1 Kapljevinska kromatografija visokog učinka.....	18
3.1.2 Homogenizator	18
3.1.3 Termostat.....	19
3.2 Analitičke metode.....	19
3.2.1 Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visokog učinka (HPLC)	19
3.3 Eksperimenti validacije matematičkog modela.....	20
3.4 Test aktivnosti.....	21
3.5 Ispitivanje stabilnosti enzima prilikom inkubacije sa supstratom	23
3.6 Određivanje operacijske stabilnosti.....	23
4. MATEMATIČKO MODELIRANJE PROCESA.....	25
5. REZULTATI I RASPRAVA	27
5.1 Stabilnost enzima tijekom inkubacije supstratom	27

5.2	Ispitivanje valjanosti matematičkog modela	28
5.3	Konstanta deaktivacije.....	31
6.	ZAKLJUČAK	34
7.	POPIS SIMBOLA.....	35
8.	LITERATURA	37
9.	PRILOZI	43

1. UVOD

Biokataliza je postala vrlo važan dio moderne organske sinteze, kako u akademskoj zajednici, tako i u kemijskoj i farmaceutskoj industriji. Svoj uspjeh zahvaljuje brzom širenju raspona dostupnih biokatalitičkih reakcija što je omogućeno naprednim alatima za otkrivanje enzima u kombinaciji s visoko-propusnim laboratorijskim evolucijskim tehnikama za optimizaciju biokatalizatora. Velik broj enzima s visokom učinkovitošću i selektivnošću se sada može proizvoditi brzo, na skali od grama do kilograma. Baze podataka i alati za pretraživanje imaju za cilj učiniti biokatalizatore dostupnim široj znanstvenoj zajednici. (Bell et al., 2021)

Biokataliza je i zelena i održiva tehnologija što je većinski rezultat spektakularnog napretka molekularne biologije i biotehnologije postignutog u posljednja dva desetljeća. Proteinsko inženjerstvo omogućilo je optimizaciju postojećih enzima i izum potpuno novih biokatalitičkih reakcija koje su nepoznate u prirodi. (Sheldon et al., 2018)

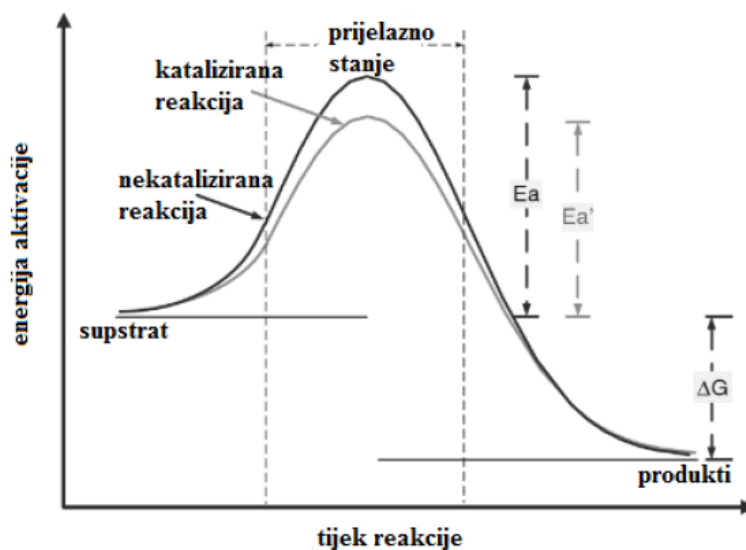
2. OPĆI DIO

2.1 Biokatalizatori

2.1.1 Biokatalizatori općenito

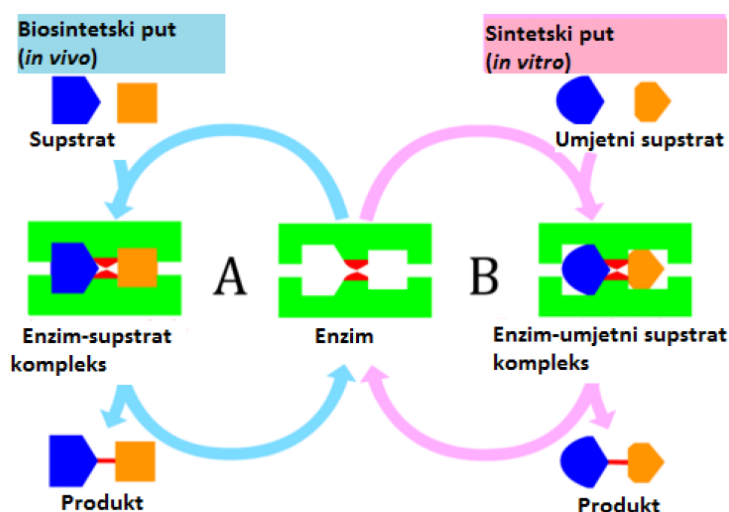
Biokatalizatori, tj. enzimi su biološke tvari koje ubrzavaju različite biokemijske reakcije u živim organizmima bez trošenja u reakciji. Enzimi sudjeluju u većini biokemijskih reakcija koje se odvijaju u mikroorganizmima, biljkama, životinjama i ljudima. Iako se biokatalizatori proizvode unutar živih stanica, mogu aktivno djelovati *in vitro*, što ih čini korisnima u industrijskim procesima. (Kuddus, 2019)

Katalizatori su općenito molekule koje smanjuju energetska barijeru koju je potrebno prevladati da bi se tvar kemijski pretvorila u drugu. Termodinamički, veličina energetske barijere može biti izražena kao promjena slobodne energije. Kao što je prikazano na slici 2.1, katalizatori smanjuju veličinu barijere zahvaljujući svojoj interakciji sa supstratom pri čemu se stvara aktivni prijelazni kompleks koji oslobađa katalizator i stvara produkt. (Illanes, 2008) Enzimi nemaju utjecaja na promjenu slobodne Gibbsove energije (ΔG) niti na ravnotežno stanje reakcije. (Liu, 2016)



Slika 2.1 Mehanizam katalize (Illanes, 2008)

Najznačajnije svojstvo enzima je njihova visoka specifičnost prema supstratima, u stanju su prepoznati i djelovati na molekulu iz skupa sličnih spojeva. (Ottone et al., 2021) 1984. godine E. Fischer predložio je teoriju “ključ-brava“ koja se odnosi na specifične odnose između enzima i supstrata. U reakciji *in vivo* koja je prikazana na slici 2.2, ciklus A, prirodni supstrat specifično prepoznaje enzim za stvaranje kompleksa enzim-supstrat. Nastajanje kompleksa uzrokovano je supramolekularnom interakcijom i aktivira supstrat koji dovodi do reakcijskog produkta sa savršenom kontrolom selektivnosti. *In vitro* reakcija prikazana je na slici 2.2, ciklus B, u njoj enzim mora prepoznati umjetni supstrat kako bi se stvorio enzimski umjetni supstratni kompleks, a zatim se supstrat aktivira kako bi se reakcija nastavila. Navedeno dovodi do stvaranja proizvoda sa savršenom kontrolom selektivnosti reakcije. (Shoda et al., 2016) Enzimaska aktivnost zahtijeva povoljne uvjete poput temperature i pH. Enzimi obično funkcioniraju u neutralnom kiselom i bazičnom mediju i pH većinom između 5 i 10. (Yaseen et al., 2021)



Slika 2.2 Shematski prikaz “ključ-brava“ teorije za *in vivo* enzimske reakcije biosintetskim putem (ciklus A) i za *in vitro* enzimske reakcije sintetskim putem (ciklus B) (Shoda et al., 2016)

L. Pauling je 1946. (Pauling, 1946) godine naveo razlog zašto enzimi kataliziraju pri blagim reakcijskim uvjetima kao i u živim stanicama. Enzim (E) i supstrat (S) formiraju kompleks (ES) ključ-brava interakcijom. Na taj način se aktivira supstrat pretvarajući se u prijelazno stanje (ES^\ddagger) kako bi se reakcija nastavila. (Shoda et al., 2016)

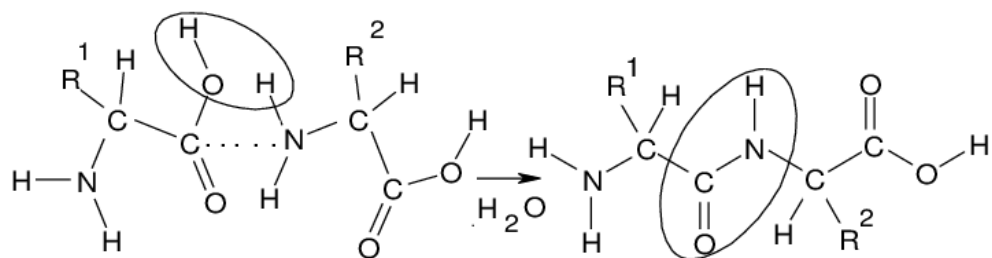


Slika 2.3 Mehanizam enzimske reakcije (Shoda et al., 2016)

Da bi enzimi mogli katalizirati reakcije, potrebne su im male molekule koje se zovu kofaktori. Kofaktori su obično nekođirane komponente koje su bitne za enzimsku katalizu, one su kovalentno ili nekovalentno vezane za enzim. Kada je kofaktor kovalentno vezan za enzim, još se naziva i prostetička skupina. U nekovalentnom vezanju kofaktora za enzim, kofaktor se naziva i koenzim. Kofaktori i koenzimi se koriste u enzimskoj katalizi za organsku sintezu. (Paul et al., 2019; Kataoka et al., 2003)

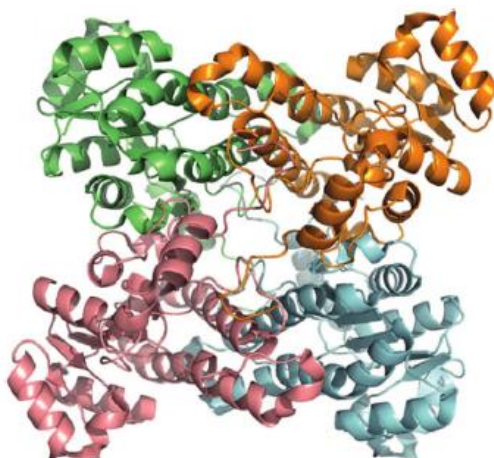
2.1.2 Struktura biokatalizatora

Enzimi su građeni od jednog ili više polipeptidnih lanaca čije se molekulske mase kreću između 15 000 i nekoliko milijuna g/mol. Aminokiseline se međusobno povezuju peptidnim vezama između amino- i karboksilnih skupina i tako tvore polipeptidne lance. (Roskoski, 2007) Ovisno o prirodi R-skupine, aminokiseline mogu biti: nepolarne (hidrofobne) ili polarne (nabijene ili nenabijene) i njihova raspodjela duž proteinske molekule određuje njihovo ponašanje. (Illanes, 2008)



Slika 2.4 Shema formiranja peptidne veze (Kereselidze et al., 2016)

Trodimenzionalna struktura enzima uključuje: primarnu strukturu polipeptidnog lanca/ polipeptida, sekundarne strukture uključuju α -helix i β -list te tercijarnu strukturu. Kwartarna struktura proteina odnosi se na međusobni raspored polipeptidnih lanaca i njihovo slaganje u veće agregate. Enzimi djeluju poput katalitički aktivnih proteina i svoje posebne funkcije imaju zbog vrlo složene trodimenzionalne strukture, kao i zbog uklapanja ili vezivanja aktivnih mjesta u toj strukturi (slika 2.5). To omogućuje iznimno specifično prepoznavanje supstrata, što rezultira odličnom selektivnošću, tj. kemoselektivnošću i stereoselektivnošću. (Pera et al., 2015; May et al., 2002)

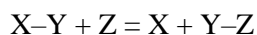


Slika 2.5 Trodimenzionalna struktura enzimskog biokatalizatora (Schallmeyer, 2016)

2.1.3 Podjela biokatalizatora

Pokušavajući unijeti neki red u kaotičnu situaciju nomenklature enzima, Malcom Dixon i Edwin Webb, 1958. godine, razvrstali su enzime prema reakcijama koje kataliziraju. Ovaj sustav je usvojen i razvijen od strane IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) te se enzimi dijele u šest skupina:

1. Oksidoreduktaze – ova skupina sadržava enzime koji kataliziraju oksidoredukcijske reakcije. Budući je oksidacija jedne skupine popraćena redukcijom druge, grupiraju se zajedno kao oksidoreduktaze.
2. Transferaze – ova skupina enzima prenosi skupine ili atome s jednog supstrata (donor) na drugi (akceptor) prema općenitoj reakciji:



3. Hidrolaze – ovi enzimi kataliziraju hidrolitičko cijepanje veza kao što su C – O, C – N, C – C i neke druge veze uključujući veze fosfornog anhidrida.
4. Liaze – skupina enzima koja cijepa C – C, C – O, C – N i druge veze. Razlikuju se od ostalih enzima po tome što su dva supstrata prisutna u jednoj reakciji, ali samo jedan u drugom. Kada sudjeluje samo jedan supstrat, molekula se uklanja napuštanjem dvostruke veze ili prstena.
5. Izomeraze – ovi enzimi kataliziraju geometrijske ili strukturne promjene unutar jedne molekule.
6. Ligaze – kataliziraju povezivanje dviju molekula uz istovremenu hidrolizu difosfatne veze u ATP-u ili sličnom trifosfatu. (McDonald, 2015)

Sve skupine enzima, osim hidrolaza, trebaju kofaktor za katalizu, iako u nekim slučajevima ni ostalim enzimima nije potreban kofaktor za katalizu. Takav primjer su liaze kojima kofaktor nije potreban za katalizu u organskoj kemiji. (Silva et al., 2015)

2.1.4 Biokataliza

Biokataliza je vrlo važna tehnologija za kemičare. Korištenje izoliranih enzima ili cijelih stanica omogućuje pristup širokom rasponu selektivnih transformacija – često nedostupnih s kemijskim katalizatorima. (Torello et al., 2015)

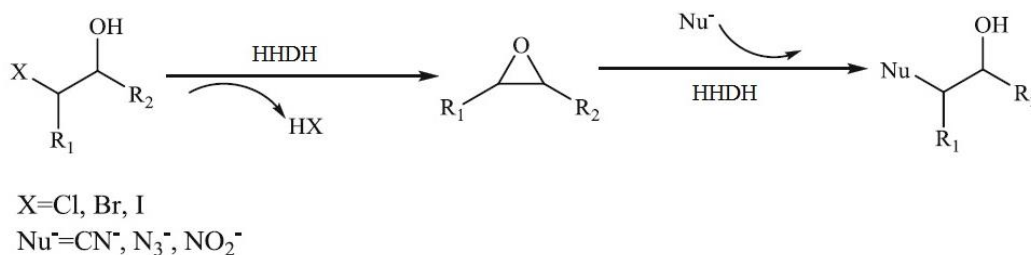
Pojam biokataliza označava korištenje enzima (biokatalizatora) za izvođenje kemijskih transformacija. Stoga je biokataliza, baš kao i heterogena ili homogena kataliza, sastavni dio kemijske sinteze. Biokataliza je vrlo dinamično područje za istraživanje i razvoj i mnogi njeni prethodni nedostaci su riješeni. Biokataliza se smatra vrlo atraktivnim alatom za organsku sintezu. (Schmid et al., 2001)

Enzimi imaju složenu molekulsku strukturu koja je nestabilna i skupa za proizvodnju. Pored toga, glavni nedostatak enzima je njihova niska operacijska stabilnost, odnosno smanjenje aktivnosti tijekom biokatalize. Unatoč ograničenjima enzima, razvijene su mnoge komplementarne strategije za poboljšanje njihove učinkovitosti. Enzimsko inženjerstvo temelji se na fizičkim modifikacijama proteina ili DNK. Proizvodnja enzima visokotehnološkom fermentacijom omogućuje proizvodnju jeftinijih i boljih enzima za industrijsku upotrebu. To otvara mogućnosti korištenja enzima ne samo u području prehrambene industrije i detergenata, nego i u proizvodnji farmaceutskih proizvoda, kozmetike, agrokemikalija i finih kemikalija. (Ran et al., 2008)

Biokataliza postaje jedan od najmoćnijih alata u biotehnologiji, koji ima velik utjecaj na zdravlje, opskrbu hranom, zaštitu okoliša i održivu proizvodnju goriva. Vrlo je važna u bijeloj tehnologiji u okviru zelene kemije, kao i u genetici, molekularnoj biotehnologiji, fermentaciji, bioinformatici, nanotehnologiji, znanosti o materijalima te naprednoj spektroskopiji. (Illanes et al., 2012)

2.1.5 Halogenhidrin – dehalogenaza

Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH), također poznate i kao haloalkohol-dehalogenaze ili halogenhidrin-hidrogen-halogene liaze, kataliziraju nukleofilnu supstituciju halogena vicinalnom hidroksilnom skupinom u halogenhidrinima kako bi se dobili epoksidi. Također, učinkovito kataliziraju i obrnutu reakciju, halogenaciju epoksida i dehalogenaciju vicinalnih klorokarbonila do hidrokarbonila (slika 2.6). (van Hylckama, 2001) U obrnutoj reakciji, mogu se vezati različiti nukleofili poput azida, nitrita i cijanida. Ovakva izvanredna katalitička reakcija omogućuje enzimsku sintezu širokog raspona β -supstituiranih alkohola iz epoksida. (Janssen et al., 2006) Interes za HHDH porastao je kada je otkriveno da se dehalogenacija halogenhidrina može odvijati s visokom enantioselektivnošću, što ove enzime čini korisnim katalizatorima za proizvodnju optički čistih epoksida i halogenhidrina. (Assis et al., 1998)



Slika 2.6 Dehalogenacija vicinalnih halogenhidrina halogenhidrin-dehalogenazom
(You et al., 2013)

2.1.5.1 Podjela i strukturne karakteristike HHDH

Unatoč velikom broju istraživanja koja se bave izolacijom mikrobnih sojeva koji pokazuju aktivnost HHDH i pročišćavanjem odgovarajućih enzima, uspješno je klonirano samo nekoliko odgovarajućih gena koji kodiraju HHDH. Iz tog je razloga objavljeno samo pet različitih sekvenci HHDH koje pripadaju jednom od tri različita filogenetska podtipa: A, B i C. Tim filogenetskim skupinama pripadaju sljedeći enzimi: *hheA* iz *Corynebacterium* sp. strain

N-1074, *hheA2* iz *Arthobacter* sp. soj AD2, *hheB* iz *Corynebacterium* sp. soj N-1074, *hheB2* iz *Mycobacterium* sp. soj GP1 te dvije identične *hheC* sekvence iz *Agrobacterium radiobacter* AD1 i *Rhizobium* sp. soj NHG3. Od navedenih, *hheC* iz *A. radiobacter* AD1 se najviše proučava zbog svoje izvanredne (enantio)selektivnosti koja kod drugih vrsta nije u tolikoj mjeri izražena. (Schallmey, 2016) U novije vrijeme su otkriveni i novi tipovi HHDH enzima pa su enzimi svrstani u 7 filogenetskih skupina, od A do G.

Prvi izvještaj o 3D strukturi HHDH objavljen je 2001. godine za enzim HheC iz *A. radiobacter* soj AD1. Pronađeno je da HheC ima značajnu sekvencu jednaku skupini enzima kratkolančanih dehidrogenaza/ reduktaza (SDR). Enzim HheC je tetramer koji se može smatrati dimerom dimera. Svaka podjedinica se sastoji od sedam α – uzvojnica i devet β – listova. Dimer sadrži dva para spirala koje tvore snop od četiri spirale u središnjoj vodoravnoj ravnini. Dva dimera su povezana uzduž okomite ravnine kako bi se formirao završni tetramer. 2006. godine otkrivena je i struktura enzima HheA soj AD2 i potvrđeno je da ima jednaku kvaternu i tercijarnu strukturu kao HheC. Najznačajnija razlika između navedena dva enzima je ta što HheA AD2 ima otvoreniji džep za vezanje supstrata. Za sada nema istraživanja strukture sekvence B enzima HHDH. (You et al., 2013)

2.1.5.2 Produkti i primjena HHDH u biokatalizi

Najvažnija primjena je proizvodnja prekursora bočnog lanca statina etil (*R*)-4-cijano-3-hidroksibutirata iz etil (*S*)-4-klor-3-hidroksibutirata preko odgovarajućeg (*S*)-epoksida kao intermedijera. (Ma et al., 2010) Još jedna biokatalitička primjena HHDH uključuje sintezu drugih C_3 ili C_4 jedinica poput epihalogenohidrina (Lutje Spelberg et al., 2004) ili kiralnih tercijarnih alkohola. (Majerić-Elenkov et al., 2007, Fusch et al., 2009) Osim toga, HHDH se koriste i za biorazgradnju toksičnih ksenobiotika kao što je 1,2,3-trikloropropanol koji je prisutan u kontaminiranom tlu i vodi (Dvorak et al., 2014) i za uklanjanje 3-kloro-1,2-propandiol estera nastalih tijekom obrade hrane. (Bornscheuer et al., 2010) Također, objavljena je i primjena halogenhidrin dehalogenaze za kvantifikaciju azida i cijanida u vodenoj otopini. (Wan et al., 2015) Metoda se temelji na reakciji azida ili cijanida s 1,2-epoksibutanom kataliziranom s HHDH

kao i na detekciji nastalih proizvoda, 1-azidobutan-2-ola odnosno 3-hidroksipentannitrila, plinskom kromatografijom. (Schallmey, 2016)

Epiklorhidrin i drugi epihalogenhidrini važni su međuprodukti u pripremi polimera, ljepila ili lijekova, a posebno su potrebni enantiomerno čisti epihalogenhidrini. Kinetičkom rezolucijom racemičnog epiklorhidrina otvaranjem epoksidnog prstena posredovanog nitritom pomoću HheC dobiven je (*R*)-epiklorhidrin s 99% čistoće pri konverziji od 41% nakon samo 18 minuta. Dulja inkubacija rezultirala je potpunom pretvorbom racemičnog epoksida, kao i sporijim vezanjem enantiomera za HheC. (Schallmey, 2016)

2.2 Optički čiste tvari

Mnoge molekule oko nas nemaju ni središta ni ravnine simetrije, a jedna prema drugoj se odnose kao predmet prema svojoj zrcalnoj slici. Takve molekule nazivaju se kiralne ili enantiomorfne. Najznačajniji primjer kiralnosti je pojava lijevih - (*R*) ili desnih - (*S*) molekula tzv. enantiomera, ovisno u kojem smjeru zakreću ravninu. Oni imaju identična fizikalna svojstva (npr. talište, vrelište, viskoznost, topljivost te tvrdoću) i, sve dok se u obzir uzimaju interakcije s akiralnim sustavima, njihove kemijske aktivnosti također su identične. (Ernst, 2012) Enantiomeri se pojavljuju samo kod spojeva čije su molekule kiralne. Kiralne molekule i njihova zrcalna slika čine par enantiomera, a veza između njih je enantiomerska.

Zasebni enantiomeri su optički aktivni spojevi zbog svog učinka na ravno polariziranu svjetlost. Optička čistoća obično se izražava enantiomernim omjerom ili enantiomernim viškom koji je prema definiciji omjer razlike i zbroja molova oba enantiomera, a može se izračunati kao omjer optičkog zakretanja uzorka koji sadržava smjesu enantiomera i optičkog zakretanja jednog čistog enantiomera. (Solomons et al., 2013)

Kiralnost molekula uključuje više od toga da su neke molekule desno-, a neke lijevo-orijentirane konformacije. Priroda skupina vezanih na određenim atomima daje kiralnost molekuli. Sve osim jedne od 20 aminokiselina koje čine prirodne proteine su kiralne i sve su (*S*)-konformacije. Gotovo sve molekule prirodnih šećera su klasificirane (*R*)-konformacijom. Zapravo, većina molekula koje su važne za život su kiralne i većina ih ima samo jedan oblik

zrcalne slike, također je i većina farmaceutika kiralno. Osjetila njuha i okusa kod ljudi ovise također o kiralnosti. (Solomons et al., 2013)

2.2.1 Epoksidi

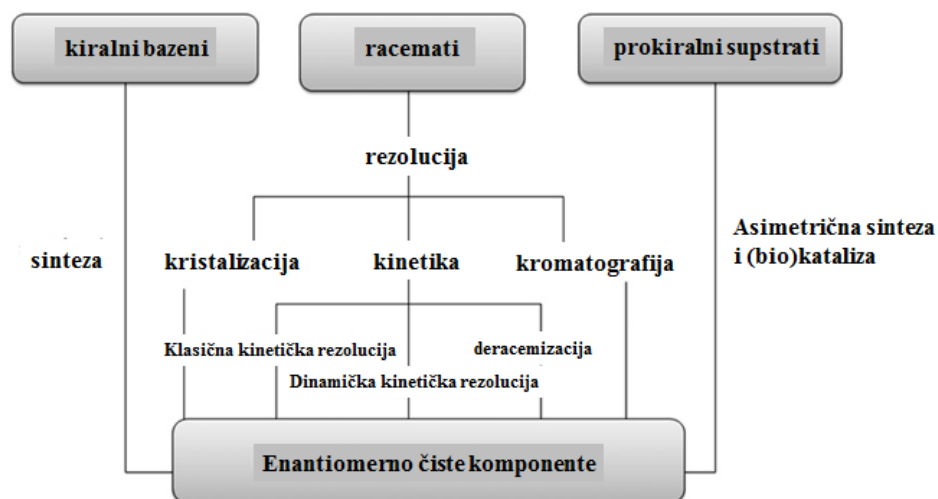
Epoksidi su ciklički eteri koji u tročlanom prstenu sadrže kisikov atom. Sadrže djelomično pozitivno nabijene atome ugljika i bazični kisik, a zbog napetosti prstena i polarnosti sudjeluju u reakcijama s raznovrsnim reagensima: nukleofilima i elektrofilima te kiselinama i bazama. (Nakano et al., 2007)

Epoksidi su vrlo atraktivni intermedijeri za proizvodnju kiralnih tvari. Važne biokatalitičke reakcije u kojima sudjeluju epoksidi uključuju kinetičku rezoluciju kataliziranu epoksid-hidrolazom, što dovodi do stvaranja diola i enantiomerno čistih supstrata, kao i enzimsku hidrolizu koja daje visoke prinose jednog enantiomera iz racemičnih smjesa. Epoksidi se također mogu pretvoriti u druge spojeve i nehidrolitičkim enantioselektivnim otvaranjem prstena, korištenjem alternativnih anionskih nukleofila u reakciji kataliziranoj halogenalkohol-dehalogenazom. Razlike u opsegu ovih enzimskih pretvorbi povezane su s njihovim različitim katalitičkim mehanizmima, koji uključuju, kovalentnu katalizu s aspartat karboksilatom kao nukleofilom i nekovalentnu katalizu s tirozinom koji djeluje kao opća kiselinska baza. (de Vries et al., 2003)

Zbog intrinzične reaktivnosti epoksidnog prstena, epoksidi su vrijedni međuprodukti u proizvodnji kemikalija visoke vrijednosti poput lijekova. Budući da epoksidi lako reagiraju s halogenidima, ugljikom, dušikom, kisikom ili sumpornim nukleofilima, vrlo su atraktivni za daljnju derivatizaciju. Pojavljivanje sve više mogućnosti za enantioselektivnu biokatalitičku pretvorbu epoksida ukazuje na to da će njihova važnost u zelenoj kemiji rasti. (de Vries et al., 2003)

2.2.2 Dobivanje optički čistih tvari

Enantiomerno čisti kiralni spojevi mogu se prirediti separacijskim ili sintetskim metodama (slika 2.7). Sve metode razdvajanja enantiomera iz racemične smjese temelje se na činjenici da kiralne molekule u kiralnom okruženju iskazuju različita svojstva. Razdvajanje racemične smjese na komponente može se provesti kokristalizacijom s enantiomerno čistim reagensima ili kromatografskim metodama s kiralnim nepokretnim fazama. (Šinko, 2005) Kiralne nepokretne faze sadržavaju enantiomerno čiste kiralne molekule koje na sebe vežu enantiomere iz smjese različitim afinitetima. Enantiomeri se razdvajaju na kromatografskoj koloni zbog različitog vremena zadržavanja na nepokretnoj fazi. Kako bi se izbjeglo neekonomično razdvajanje racemata na enantiomere, u sintezi enantiomerno čistih spojeva primjenjuju se stereoselektivni katalizatori ili enzimski katalizirane reakcije. Sintetski kiralni katalizatori priređuju se za određenu vrstu molekula s kojom se želi provesti reakcija. Ti katalizatori mogu biti vrlo učinkoviti, ali manje promjene u strukturi reagensa mogu bitno sniziti njihovu djelotvornost. Nasuprot njima, enzimi su se pokazali izuzetno pogodnima u procesima sintetske kemije zbog velike raznovrsnosti reakcija koje kataliziraju te prirodnih i neprirodnih supstrata koje prihvaćaju i uvjeta samih reakcija. (Šinko, 2005)



Slika 2.7 Metode dobivanja enantiomerno čistih komponenti (Ahmed et al., 2012)

Pored ovih metoda, dobivanje enantiomerno čistih tvari transformacijama kataliziranim enzimima, sve se više koristi za proizvodnju širokog spektra međuprodukata u farmaceutskoj, agrokemijskoj, finoj kemijskoj te prehrambenoj industriji. Danas zamjenjuju kemijsku katalizu kako bi se suzbili nedostaci poput neželjenih nusprodukata, toksičnih otpadnih voda i loše selektivnosti supstrata. (Ahmed et al., 2012)

2.3 Modeliranje biotransformacija

Biokatalitički procesi slični su konvencionalnim kemijskim na mnogo načina. Najznačajnija razlika je da se kod biokatalitičkih procesa mora uzeti u obzir i enzimski kinetika i operacijska stabilnost enzima. Zbog svoje sličnosti s konvencionalnim kemijskim procesima, biokatalitički procesi sve više prodiru u kemijsku, odnosno farmaceutsku industriju. Do prije nekoliko godina modeliranje se nije smatralo važnim za industriju, ali sada se situacija brzo mijenja s potrebom za brzim razvojem biokatalitičkih procesa. Modeliranje kao načelo reakcijskog inženjerstva svakako ima ulogu u razvoju biokatalitičkih procesa te se očekuje da će rasti s uporabom biokatalize u industriji iako se tehnike modeliranja ne primjenjuju široko u biokatalitičkim procesima. (Vasić-Rački et al., 2011)

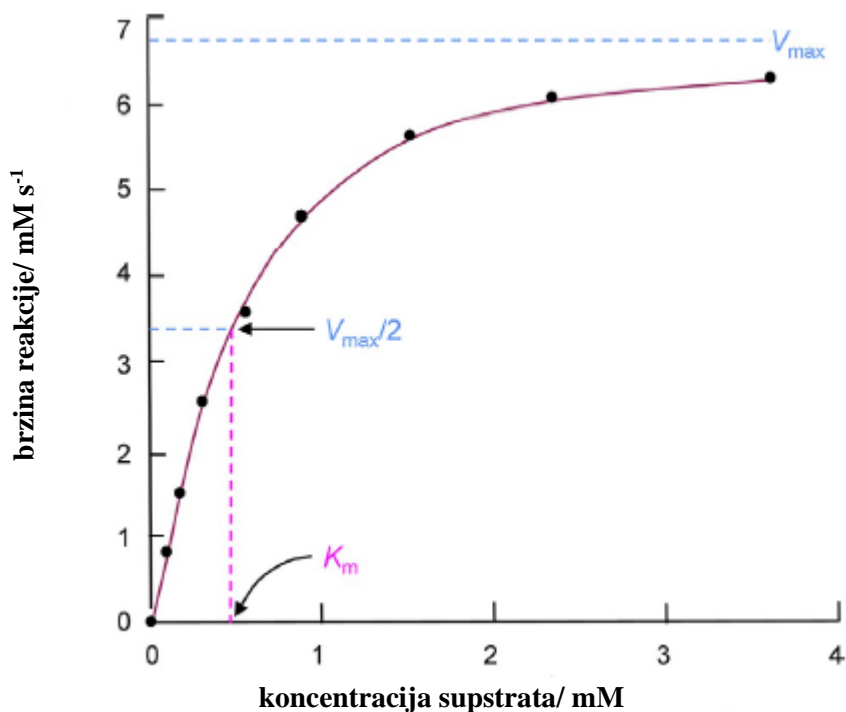
Sin, Woodley i Gernaey (Sin et al., 2009) klasificirali su matematičke modele u području biokatalize u sljedeće četiri skupine:

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

Matematički model enzimske reakcije sadrži kinetički i reaktorski model. Kinetički modeli opisuju ovisnost brzine enzimske reakcije o reakcijskim veličinama stanja i parametrima, a reaktorski modeli sastoje se od bilanca tvari koje ovise o tipu reaktora. (Vasić-Rački et al., 2011)

2.3.1 Kinetički modeli enzimskih reakcija

Enzimska kinetika, između ostalog, proučava kako brzina reakcija kataliziranih enzimima ovisi o koncentraciji spojeva koji izravno stupaju u interakciju s enzimom. Obično dijagram ovisnosti početne brzine enzima o koncentraciji supstrata daje hiperbolu (slika 2.8). Kako se povećava koncentracija supstrata, tako se i aktivnost enzima povećava i približava se zasićenju kada konačno stagnira neovisno o koncentraciji. Pri niskim koncentracijama supstrata, brzina reakcije linearno raste porastom koncentracije supstrata te se to područje zove područje kinetike 1. reda. Pri vrlo visokim koncentracijama, brzina reakcije ne ovisi o koncentraciji supstrata pa se to područje naziva područje kinetike 0. reda. (Roskoski, 2015)



Slika 2.8 Grafički prikaz Michaelis-Menteničine kinetike (Roskoski, 2015)

Michaelis i Menten prepostavili su da su enzim i supstrat u ravnoteži tijekom katalize i da brzina formiranja produkta ne remeti ovu ravnotežu. Enzimom katalizirana pretvorba supstrata (S) u produkt (P) dana je shemom reakcije 2.1.



Ravnoteža se izražava konstantom disocijacije za kompleks ES prema jednadžbi 2.2.

$$K_s = [E] \cdot [S] / [ES] \quad (2.2)$$

Suvremena Michaelis-Menteničina jednadžba povezuje brzinu reakcije katalizirane enzimima s dvije kinetičke konstante (V_{\max} i K_m) gdje je K_m povezan s K_s (2.3)

$$r = V_{\max}[S] / (K_m + [S]) \quad (2.3)$$

gdje je r reakcijska brzina, V_{\max} je maksimalna brzina, kada je $r = V_{\max}/2$, $K_m = [S]$, tj. K_m je jednak koncentraciji supstrata kada je maksimalna brzina na polovici vrijednosti, a $[S]$ je koncentracija supstrata. (Roskoski, 2015)

Parametri Michaelis-Menteničine kinetike matematički se definiraju prema jednadžbama 2.4 i 2.5:

$$V_m = k_3 \cdot c_{E0} \quad (2.4)$$

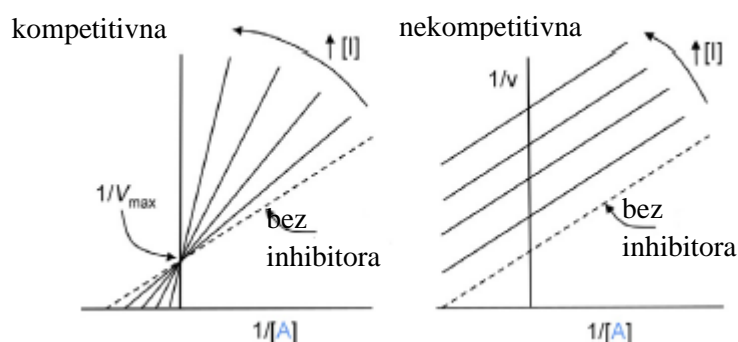
$$K_m = (k_1 + k_3) / k_2 \quad (2.5)$$

gdje je c_{E0} (mg/mL) početna koncentracija enzima, a k_1 , k_2 i k_3 konstante iz reakcijske sheme 2.1. (Roskoski, 2007)

Vrlo je korisno, za izračun brzine reakcije pri različitim uvjetima, koristiti Michaelis – Menteničinu jednadžbu. Štoviše, K_m je konstanta izvedena iz konstanti brzine, a teorijska maksimalna brzina reakcije, V_{\max} , također je konstanta. Za postizanje V_{\max} , sve molekule enzima moraju biti vezane za supstrat. Početna karakterizacija enzima općenito uključuje određivanje K_m ili Michaelisove konstante. (Roskoski, 2015)

Neke molekule male molekulske mase u enzimskoj reakciji mogu se ponašati kao inhibitori zbog svog vezanja na enzim kojim smanjuju ili blokiraju katalitičko djelovanje. Njihov učinak može biti reverzibilan, pri čemu inhibitori naknadno disociraju, ili ireverzibilan, pri čemu inhibitor i enzim formiraju stabilan kompleks.

Kompetitivna inhibicija odnosi se na slučaj kada je molekula inhibitora svojom strukturom slična supstratu te mu konkurrira za vezanje za aktivno mjesto. Kompetitivni inhibitori smanjuju broj molekula enzima dostupnih supstratu pa dolazi do smanjenja brzine reakcije što je posebno uočljivo pri niskim koncentracijama supstrata. Do nekompetitivne inhibicije dolazi kada inhibitori prilikom vezanja na bilo koji dio enzima mijenjaju njegovu prostornu konformaciju. Tada enzim nije u mogućnosti katalizirati reakciju pa dolazi do smanjenja broja dostupnih i funkcionalnih molekula enzima (slika 2.9). (Sharma, 2012)



Slika 2.9 Lineweaver – Burk dijagrami kompetitivne i nekompetitivne enzimске inhibicije (Roskoski, 2015)

2.3.2 Model kotlastog reaktora

U kotlastom reaktoru sve veličine stanja ovise o vremenu. Prema tome, sastav reakcijske smjese, brzina kemijske reakcije i količina oslobođene topline uslijed kemijske reakcije, su vremenski promjenjive veličine. Kod idealnog kotlastog reaktora jedino se temperatura u reaktoru ne mijenja s vremenom jer se pretpostavlja izotermni rad. Model idealnog kotlastog

reaktora također sadrži i pretpostavku da je volumen reakcijske smjese stalan i neovisan o vremenu tj. nema promjene gustoće.

Za postavljanje jednostavnih matematičkih zakonitosti koje opisuju promjenu tvari u kotlastom reaktoru, uvode se pretpostavke:

- Kotlasti reaktor je zatvoreni sustav, prema tome za vrijeme reakcije ne dolazi do izmjene tvari s okolinom i volumen reakcijske smjese je stalan.
- Idealno miješanje pretpostavlja da su sastav reakcijske smjese i temperatura u svakoj točki volumena isti.

Idealno miješanje također nalaže izoternost rada, odnosno da je dovedena toplina jednaka onoj odvedenoj iz reaktora te nepostojanje difuzijskog prijenosa tvari i topline, tj. koncentracijskih i temperaturnih gradijenata.

Uslijed provođenja vremenski ovisne reakcije u konstantnom volumenu, dolazi do promjena veličina stanja pa je kotlasti reaktor uvijek u nestacionarnom radu. Promjena koncentracije s vremenom, u kotlastom reaktoru, može se opisati diferencijalnom jednačinom 2.6. (Gomzi, 2009)

$$r_s = -dc_s/dt \tag{2.6}$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Aparatura

3.1.1 Kapljevinska kromatografija visokog učinka

U ovom radu, uzorci su analizirani na HPLC-u *LC-40 Nexera Lite* s PDA detektorom proizvođača *Shimadzu* prikazanom na slici 3.1.



Slika 3.1 HPLC

3.1.2 Homogenizator

Tijekom eksperimenta, svi uzorci su homogenizirani na uređaju *Biosan Vortex V-1 plus* prikazanom na slici 3.2.



Slika 3.2 Uređaj *Biosan Vortex V-1 plus*

3.1.3 Termostat

Za termostatiranje uzoraka korišten je termostat *Eppendorf ThermoMixer C* prikazan na slici 3.3.



Slika 3.3 Termostat

3.2 Analitičke metode

3.2.1 Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visokog učinka (HPLC)

Tekućinska kromatografija visokog učinka je metoda koja se koristi za razdvajanje komponenti iz smjese na temelju kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze.

Princip rada HPLC-a je prolazak analizirane tvari ili smjese kroz stupac pumpanjem mobilne faze pod visokim tlakom kroz sam stupac. Postupak predviđa unošenje malog volumena uzorka u tok mobilne faze gdje na temelju specifičnih kemijskih i fizičkih interakcija, dolazi do različitog zadržavanja komponenata smjese. Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi tvari koja se analizira, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze. Vrijeme u kojem se tvar eluira (dođe do kraja stupca) naziva se retencijsko vrijeme i karakteristično je za određenu tvar. (Settle, 1997) Svaka komponenta se različito vrijeme zadržava u koloni i na temelju toga se radi kvalitativna analiza.

Nakon toga se za pojedine komponente rade baždarni pravci gdje je veličina odziva proporcionalna koncentraciji.

Prilikom svih mjerenja na HPLC uređaju, kao stacionarna faza koristila se Phenomenex Kinetex kolona C18 dimenzija 100 mm x 4,6 mm.

Prilikom praćenja koncentracija supstrata i produkta, kao mobilna faza koristile su se mobilne faze A i B. Mobilna faza A je 90% -tni acetonitril (ACN) u ultračistoj vodi, a mobilna faza B je ultračista voda. Analiza se provodila 22 minute prilikom čega se od 0. do 15. minute mijenjao gradijent B faze od 60 do 40 %, od 15. do 20. minute se vraćao gradijent na početnih 60% faze B, a do 22. minute se održavala ta vrijednost. Protok je iznosio 1 mL/min, valna duljina (λ) je bila 190 nm, a temperatura 30 °C. Retencijsko vrijeme za *rac*-2-[4-(trifluorometil) fenil] oksiran iznosilo je 14,8 minuta, a za (*R*)-2-azido-1-[4-(trifluorometil) fenil] etanol 12,3 minute. Baždarni pravci i primjer kromatograma za supstrat (*rac*-2-[4-(trifluorometil) fenil] oksiran) i produkt ((*R*)-2-azido-1-[4-(trifluorometil) fenil] etanol) su dani u prilogu 4, 5 i 6.

U testu enzimske aktivnosti, prilikom praćenja koncentracija PNSHH i PNSO, koristile su se mobilne faze A i B. Mobilna faza A je 80%-tni ACN u pročišćenoj vodi s 0,1% trifluoroctenom kiselinom (TFA), dok je mobilna faza B pročišćena voda s 0,1 % TFA. Analiza se provodila tijekom 7 minuta. Analiza se od 0. do 5. minute provodila s 40 – 30 % eluenta B, od 5. do 5,5. minute s 30 – 40 % eluenta B, a do 7. minute s 50 % eluenta B. Protok je iznosio 1,5 mL/ min, valna duljina 275 nm, a temperatura 30 °C. Retencijsko vrijeme za PNSHH iznosilo je 3,6 minuta, a za PNSO 3,9 minuta. Baždarni pravci za PNSHH i PNSO dani su u prilogu 1 i 2, a primjer kromatograma dan je u prilogu 3.

3.3 Eksperimenti validacije matematičkog modela

Eksperimenti validacije matematičkog provedeni su u kotlastom reaktoru te u repetitivnom kotlastom reaktoru, odnosno uz dodatak supstrata u određenim vremenskim razmacima. Početni sastavi reakcijskih smjesa dani su u tablici 3.1. Reakcije su provedene u Eppendorf epruветama uz ukupni volumen reakcijske smjese 1 mL na tresilici *Eppendorf ThermoMixer C* pri 1000 okr/min i 25 °C. Kao pufer korišten je Tris-SO₄ pH 7,5 i koncentracije

500 mM. Eksperimenti su praćeni uzorkovanjem po 10 μ L reakcijske smjese te ekstrakcijom u 500 μ L etil acetata (EtOAc). Po ekstrakciji u trajanju od 20 sekundi, organska faza je posušena na sloju natrijevog sulfata kako bi se uklonili ostaci vodenog medija s azidnim ionima i enzimom. Uzorci su analizirani na HPLC uređaju prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.1.

Tablica 3.1 Početni sastavi reakcijskih smjesa

Oznaka eksperimenta	Sastav reakcijske smjese		
	Cazid, mM	Crac-2-[4-(trifluorometil)fenil]oksiran, mM	γ HheC-W249P, mg/mL
1	5	5	0,3
2	5	5	0,2
3	10	10	0,2
4	25	25	0,3
5	50	50	0,4
6	10	20	2,0
7	20	40	2,0
8	5	10	2,0

3.4 Test aktivnosti

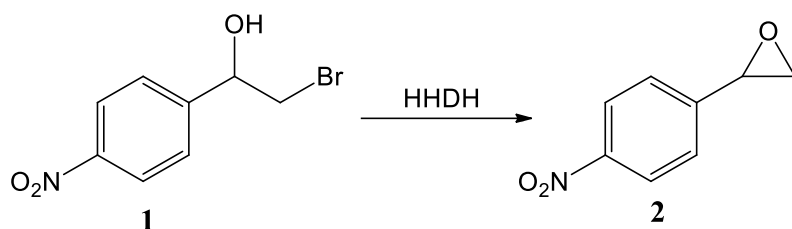
Test aktivnosti je reakcija pretvorbe PNSHH, 1-(*p*-nitrofenil)-2-bromoetanol u PNSO, *p*-nitrofenilstiren oksid uz djelovanje enzima HHDH, a aktivnost enzima prati se preko produkta PNSO, kapljevinskom kromatografijom visokog učinka. Reakcija pretvorbe PNSHH u PNSO praćena je pomoću metode početnih reakcijskih brzina, tj. unutar prvih 10% konverzije supstrata. HPLC metodom dobiju se površine PNSHH i PNSO koje se pomoću baždarnih pravaca preraćunaju u koncentracije. Metodom početnih reakcijskih brzina dobije se 5 toćaka na grafu, koje odgovaraju koncentracijama PNSO i moraju slijediti linearni odziv. Kada se kroz tih 5 toćka povuće pravac, iz njega se izraćuna nagib. Iz nagiba pravca odredi se volumna aktivnost prema formuli 3.1.

$$V.A. = \frac{dc}{dt} \cdot V_r \quad (3.1)$$

Iz volumne aktivnosti, računa se specifična aktivnost prema formuli 3.2.

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_e} \quad (3.2)$$

gdje je $V.A.$ volumna aktivnost enzima, dc/dt je nagib pravca dobivenog HPLC metodom, V_r je volumen reaktora u kojem se nalazi reakcijska smjesa, V_e je volumen enzima dodanog u reakcijsku smjesu, $S.A.$ je specifična aktivnost enzima, a γ_e je masena koncentracija enzima.



Slika 3.4 Reakcija pretvorbe PNSHH (1) u PNSO (2) katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom

Ispitivanja su provedena u Eppendorf epruветama, pri čemu je volumen reakcijske smjese iznosio 500 μ L. Mjerenja su provedena pri 1000 okr/min i 25 °C u puferu (100 mM Tris-SO₄ s 5 % DMSO, pH 7,5). Reakcijska smjesa je sadržavala 5 mM PNSHH, a reakcija je započeta dodatkom enzima koncentracije 0,4 mg/mL. Uzorkovanje je provedeno 5 puta unutar 10% konverzije supstrata i alikvoti su obrađeni na način opisan u poglavlju 3.3.

3.5 Ispitivanje stabilnosti enzima prilikom inkubacije sa supstratom

U ovom radu praćene su operacijska stabilnost enzima te stabilnost enzima tijekom inkubacije sa supstratom i nukleofilom azidom. Stabilnosti su praćene u određenom vremenskom intervalu izoliranjem enzima iz inkubacijske/reakcijske smjese te pokretanjem ranije opisanog testa aktivnosti pretvorbe. Koncentracije PNSHH i PNSO praćene su HPLC metodom.

Korištenjem testa aktivnosti, opisanog u prethodnom poglavlju, tijekom 72 h praćena je stabilnost enzima tijekom inkubacije sa supstratima (epoksidom i azidom). Inkubacija enzima provedena je u reakcijskom mediju (500 mM Tris-SO₄, pH 7,5 pri 25 °C) i u prisutnosti različitih koncentracija pojedinačnih supstrata. Istraživan je učinak različitih koncentracija epoksida (5, 20, 50 mM) i azida (20, 50, 100 mM) na stabilnost enzima tijekom inkubacije, pri čemu je koncentracija enzima iznosila 0,4 mg/mL. Inkubacija enzima provedena je u prisutnosti samo jednog supstrata istovremeno, kako ne bi došlo do biokatalitičke reakcije između epoksida i azida. Inkubacijski medij pripremljen je miješanjem supstrata s reakcijskim puferom i 10% DMSO, a inkubacija je pokrenuta dodavanjem enzima do koncentracije 0.4 mg/mL. U redovitim intervalima (0, 24, 48, 72 h), inkubacijska smjesa je uzorkovana i enzim je razrijeđen u reakcijskom puferu te odvojen od ostatka reakcijske smjese (tj. supstrata, produkta i otapala) na Amicon™ Ultra-0,5 centrifugalnom filtru (*Merck*, SAD), pri 4 °C, 14 000 okr/min tijekom 5 minuta. Enzim je resuspendiran u reakcijskom puferu te izdvojen iz filtera i korišten za pokretanje testa aktivnosti.

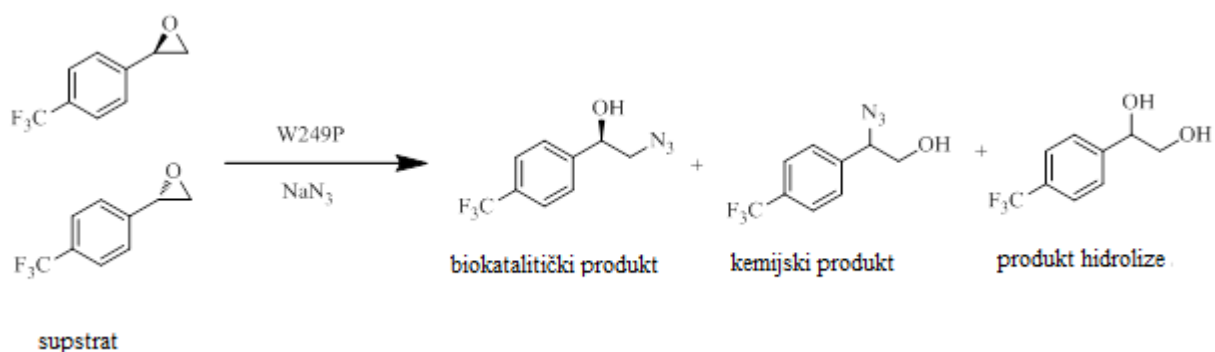
3.6 Određivanje operacijske stabilnosti

Operacijska stabilnost enzima praćena je tijekom eksperimenata u kotlastom reaktoru prema uvjetima danima ranije u tablici 3.1. Reakcijska smjesa je pripremljena miješanjem supstrata epoksida i azida u puferskom mediju uz dodatak DMSO radi poboljšanja topljivosti epoksida, a započeta je dodavanjem određene količine enzima u reaktor. Kao i u prethodno opisanim eksperimentima, reakcijska smjesa je uzorkovana sa ciljem izdvajanja enzima za pokretanje testa aktivnosti u redovitim intervalima tijekom 6 h. Enzim je razrijeđen u reakcijskom puferu te odvojen od ostatka reakcijske smjese (tj. supstrata, produkta i otapala)

centrifugiranjem na Amicon™ Ultra-0,5 centrifugalnom filtru (*Merck*, SAD), pri 4 °C, 14 000 okr/min tijekom 5 minuta. Enzim je izdvojen iz filtera te resuspendiran u reakcijskom puferu i korišten za pokretanje testa aktivnosti kao što je opisano u poglavlju 3.4.

4. MATEMATIČKO MODELIRANJE PROCESA

Cjeloviti matematički model sinteze (*R*)-2-azido-1-[4-(trifluorometil) fenil] etanola reakcijom otvaranja prstena *rac*-2-[4-(trifluorometil) fenil] oksirana uz azidne ione i biokatalizator halogenhidrin-dehalogenazu, razvijen je prethodno. (Tomljenović, 2021) Slika 4.1 prikazuje sintezu (*R*)-2-azido-1-[4-(trifluorometil) fenil] etanola reakcijom otvaranja prstena *rac*-2-[4-(trifluorometil) fenil] oksirana uz azidne ione i biokatalizator halogenhidrin-dehalogenazu.



Slika 4.1 Sinteza (*R*-2-azido-1-[4-(trifluorometil) fenil] etanola reakcijom otvaranja prstena *rac*-2 [4-(trifluorometil) fenil] oksirana uz azidne ione i biokatalizator W249P

Na temelju eksperimentalnih podataka prikupljenih primjenom metode početnih reakcijskih brzina u kotlastom reaktoru, procijenjeni su kinetički parametri i razvijen je kinetički model, što je tema prethodnih istraživanja, a ne ovog rada. Procijenjeni parametri dani su u tablici 4.1, a kinetički model jednadžbama 4.1 i 4.2. Brzina biokatalitičke reakcije sinteze (*R*)-2-azido-1-[4-(trifluorometil) fenil] etanolom opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom (*R*)-2-[4-(trifluorometil) fenil] oksiranom, kompetitivnom inhibicijom (*S*)-2-[4-(trifluorometil) fenil] oksiranom, *rac*-2-[4-(trifluorometil) fenil]-1,2-etandiolom i DMSO te inhibicijom produktom (*R*)-2-azido-1-[4-(trifluorometil) fenil] etanolom (jed. 4.1.). Brzina hidrolitičke reakcije opisana je kinetikom prvoga reda, što znači da je brzina reakcije hidrolize proporcionalna koncentraciji supstrata *rac*-2-[4-(trifluorometil) fenil] oksirana (jed. 4.2.).

Tablica 4.1 Procijenjeni kinetički parametri za reakciju sinteze (*R*)-2-azido-1-[4-(trifluorometil)fenil] etanola

Parametar	Mjerna jedinica	Vrijednost
V_m	U mg ⁻¹	0,404 ± 0,019
K_m^{azid}	mM	2,014 ± 0,198
$K_m^{(R)\text{-epoksid}}$	mM	1,095 ± 0,171
$K_i^{(R)\text{-epoksid}}$	mM	32,86 ± 2,96
$K_i^{(S)\text{-epoksid}}$	mM	2,256 ± 0,140
$K_i^{\beta\text{-azido alkohol}}$	mM	6,136 ± 0,895
K_i^{diol}	mM	6,532 ± 0,501
K_i^{DMSO}	mM	373,0 ± 29,8
k_h	min ⁻¹	1,154 · 10 ⁻³ ± 1,211 · 10 ⁻⁴

$$r_1 = \frac{V_{m0} \cdot e^{-k_d \cdot t} \cdot c_{(R)\text{-epoksid}} \cdot c_{\text{azid}} \cdot \gamma_{\text{HHeC-W249P}}}{(K_m^{\text{azid}} + c_{\text{azid}}) \cdot (K_m^{(R)\text{-epoksid}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\beta\text{-azido alkohol}}}{K_i^{\beta\text{-azido alkohol}}} + \frac{c_{(S)\text{-epoksid}}}{K_i^{(S)\text{-epoksid}}} + \frac{c_{\text{diol}}}{K_i^{\text{diol}}} + \frac{c_{\text{DMSO}}}{K_i^{\text{DMSO}}} \right) + c_{(R)\text{-epoksid}} \cdot \frac{c_{(R)\text{-epoksid}}}{K_i^{(R)\text{-epoksid}}}}$$

(4.1)

$$r_2 = k_h \cdot c_{\text{rac-epoksid}}$$

(4.2)

Matematički model dobiven je kombiniranjem kinetičkog modela s bilancnim jednadžbama za kotlasti reaktor od 4.3 do 4.7 koje su dane u nastavku.

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

(4.3)

$$\frac{dc_{(S)\text{-epoksid}}}{dt} = -0,5 \cdot r_h$$

(4.4)

$$\frac{dc_{\text{azid}}}{dt} = -r_1$$

(4.5)

$$\frac{dc_{(R)\text{-azido alkohol}}}{dt} = r_1$$

(4.6)

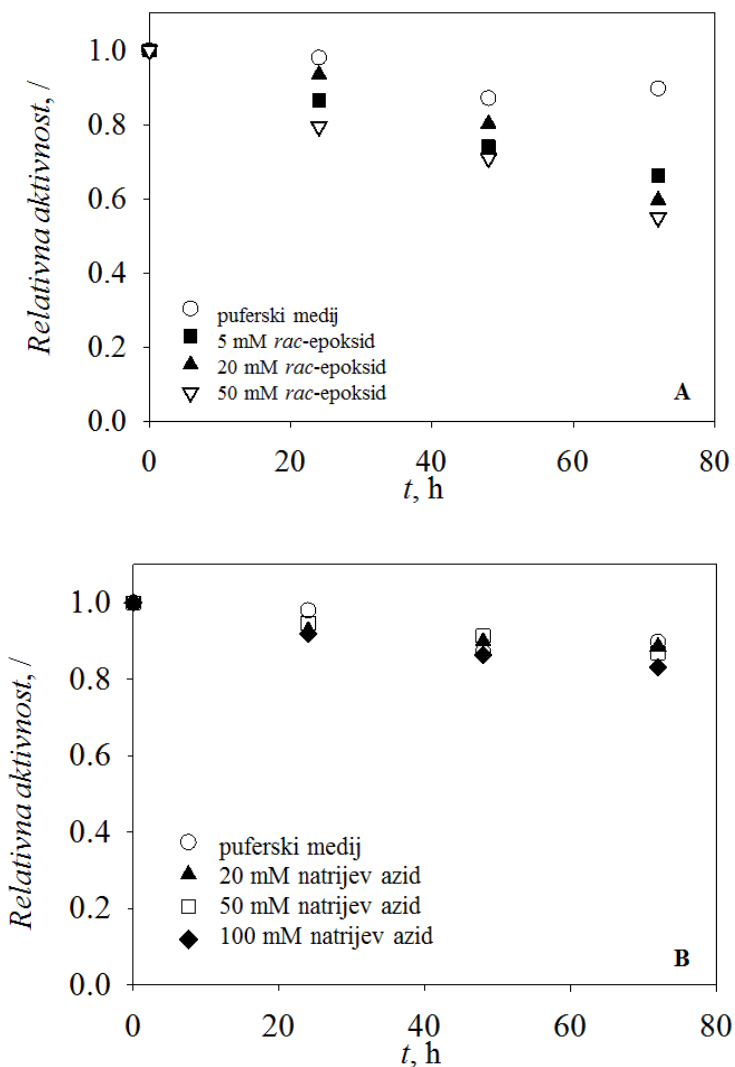
$$\frac{dc_{\text{diol}}}{dt} = r_h$$

(4.7)

5. REZULTATI I RASPRAVA

5.1 Stabilnost enzima tijekom inkubacije supstratom

Slika 5.1 prikazuje ovisnost relativne aktivnosti enzima o vremenu prilikom inkubacije s epoksidom (A), odnosno natrijevim azidom (B).

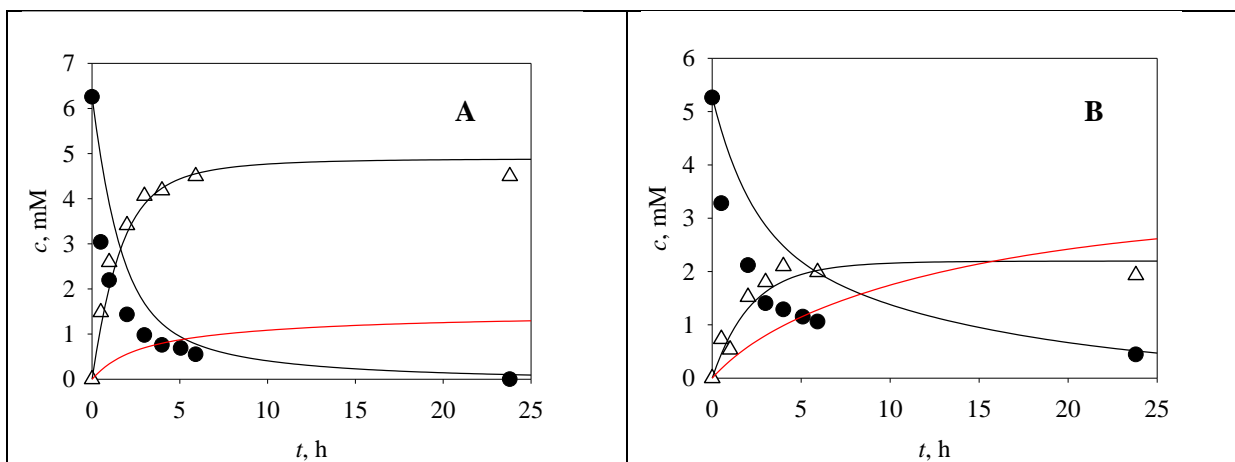


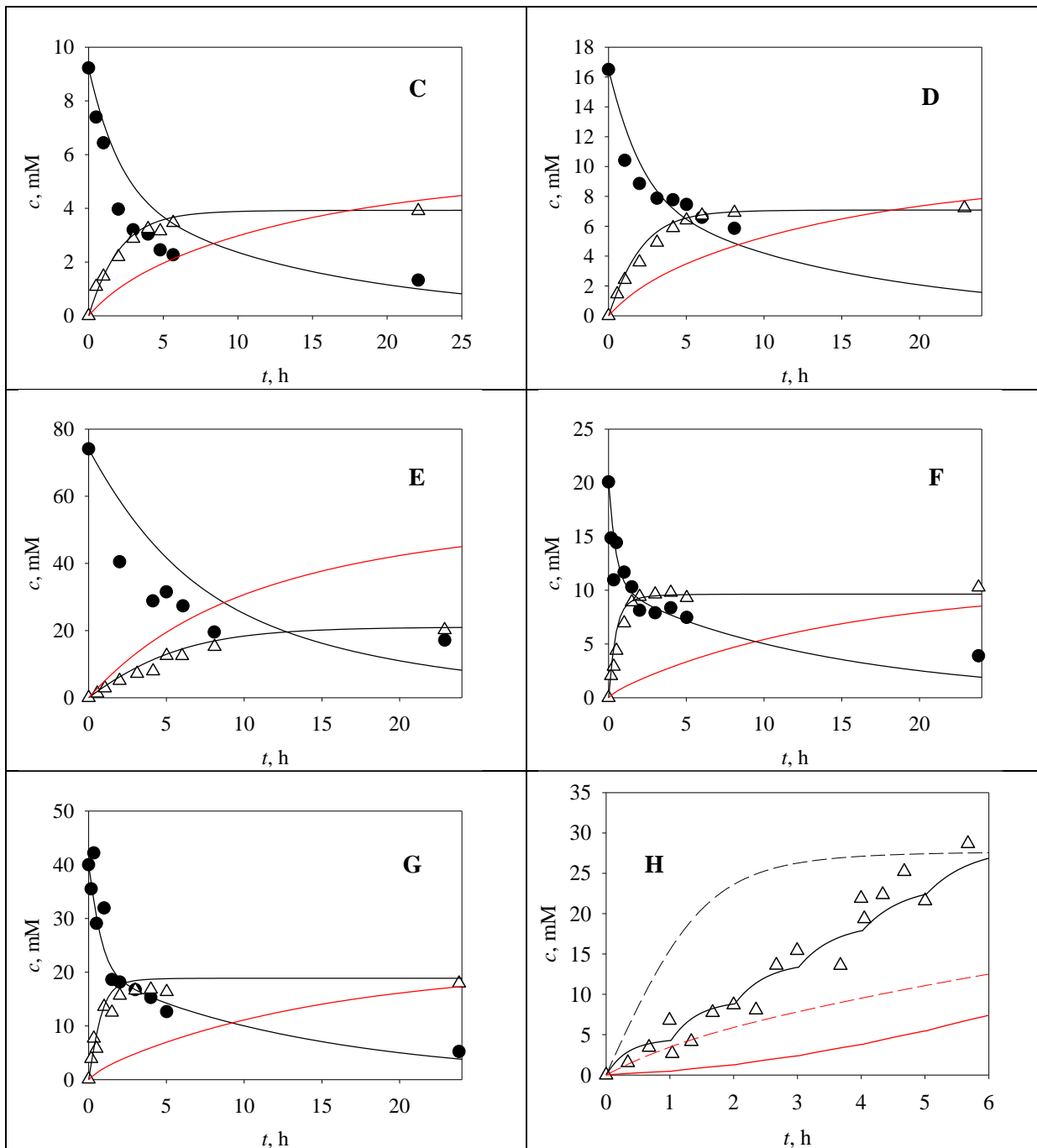
Slika 5.1 Ovisnost aktivnosti HheC-W249P u vremenu ($V_r = 500 \mu\text{L}$; 500 mM Tris-SO_4 ; $\text{pH} = 7,5$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; $10\% \text{ DMSO}$; 1000 rp ; $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 0,400 \text{ mg/ mL}$) o: **A.** koncentraciji 2-[4-(trifluorometil) fenil] oksirana (0, 5, 20, 50 mM); **B.** koncentraciji natrijevog azida (0, 20, 50, 100 mM).

Rezultati na slici 5.1 prikazuju da je varijanta enzima W249P vrlo stabilna u puferu za vrijeme provedbe eksperimenta. Kako bi se procijenilo utječu li različiti reaktanti na aktivnost enzima tijekom vremena, W249P je također inkubiran pri različitim koncentracijama epoksida (Slika 5.1 A) i azida (Slika 5.1 B). Utvrđeno je da azidni ioni ne utječu na stabilnost enzima jer je zadržana aktivnost unutar promatranog vremena bila jednaka puferu kao i u prisutnosti najveće koncentracije korištenog nukleofila. S druge strane, u prisutnosti različitih koncentracija epoksida, došlo je do različite deaktivacije enzima. Iz tog razloga se očekivalo da će supstrat također imati negativan učinak na operacijsku stabilnost enzima.

5.2 Ispitivanje valjanosti matematičkog modela

U ovom radu provedeno je ispitivanje valjanosti matematičkog modela za reakciju sinteze (*R*)-2-azido-1-[4-(trifluorometil) fenil] etanola dobivenog otvaranjem epoksidnog prstena *rac*-2 [4-(trifluorometil) fenil] oksirana uz azidne ione i biokatalizu s W249P enzimom. Matematički model je prethodno razvijen te je zatim uslijedila njegova validacija provedbom eksperimenata u kotlastom reaktoru prema uvjetima prikazanim u poglavlju 3.3, u tablici 3.1. Rezultati validacije modela prikazani su na slikama 5.2 A-H.





Slika 5.2 Dobivanje (*R*)-2-azido-1-[4-(trifluorometil)fenil] etanola otvaranjem prstena *rac*-epoksida i uz pomoć azidnih iona katalizirano enzimom W249P ($V_r = 500 \mu\text{L}$, 500 mM Tris- SO_4 , pH = 7,5, 25 °C, DMSO 10 % (v/v), 1000 rpm) **A.** $c_{\text{azid}} = 5 \text{ mM}$, $c_{\text{rac-2-[4-(trifluorometil)fenil]oksiran}} = 5 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 0,3 \text{ mg/ mL}$); **B.** $c_{\text{azid}} = 5 \text{ mM}$, $c_{\text{(R)-2-[4-(trifluorometil)fenil]oksiran}} = 5 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 0,2 \text{ mg/ mL}$; **C.** $c_{\text{azid}} = 10 \text{ mM}$, $c_{\text{(R)-2-[4-(trifluorometil)fenil]oksiran}} = 10 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 0,2 \text{ mg/ mL}$;

D. $c_{\text{azid}} = 25 \text{ mM}$, $c_{(R)\text{-}2\text{-}[4\text{-}(\text{trifluorometil})\text{fenil}]\text{oksiran}} = 25 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 0,3 \text{ mg/ mL}$; **E.** $c_{\text{azid}} = 50 \text{ mM}$, $c_{(R)\text{-}2\text{-}[4\text{-}(\text{trifluorometil})\text{fenil}]\text{oksiran}} = 50 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 0,4 \text{ mg/ mL}$; **F.** $c_{\text{azid}} = 10 \text{ mM}$, $c_{(R)\text{-}2\text{-}[4\text{-}(\text{trifluorometil})\text{fenil}]\text{oksiran}} = 20 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 2 \text{ m/ mL}$; **G.** $c_{\text{azid}} = 20 \text{ mM}$, $c_{(R)\text{-}2\text{-}[4\text{-}(\text{trifluorometil})\text{fenil}]\text{oksiran}} = 40 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 2 \text{ mg/ mL}$; **H.** usporedba repetitivnog kotlastog reaktora i kotlastog reaktora s početnim uvjetima: $c_{\text{azid}} = 30 \text{ mM}$, $c_{(R)\text{-}2\text{-}[4\text{-}(\text{trifluorometil})\text{fenil}]\text{oksiran}} = 60 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 2 \text{ mg/ mL}$ s dodatkom 5 mM NaN_3 i $10 \text{ mM rac-2-[4-(trifluorometil)fenil]oksirana}$ svakih sat vremena do 5. sata. Legenda: simboli – eksperimentalni podaci, linije – model. Δ – (*R*)-azidoalcohol; \bullet – *rac*-epoksid; ———— *rac-2-[4-(trifluorometil)fenil]-1-2-etandiol* (repetitivni reaktor); - - - - - *rac-2-[4-(trifluorometil)fenil]-1-2-etandiol* (kotlasti reaktor)

Grafovi od A do G na slici 5.2 prikazuju usklađenost eksperimenata u kotlastom reaktoru s matematičkim modelom kada su korišteni različiti početni uvjeti. Koncentracije reaktanata i nastajanje produkta je u svim eksperimentima dobro opisano modelom. Razlog manjeg odstupanja potrošnje supstrata od one predviđene modelom vjerojatno leži u lošoj topljivosti supstrata, budući da je koncentracija u reaktoru prividno niža od one koju model predviđa. Supstrat koji nije u potpunosti otopljen, tj. homogeniziran s ostatkom reakcijske smjese, neće biti jednolično uzorkovan i davat će niži odziv na analizi nego što bi trebao. Vidljivo je iz grafova da je usklađenost s modelom bolja što je koncentracija enzima veća (slika 5.1 F i G). Na temelju toga i vizualnog opažanja reaktora prilikom provedbe eksperimenta, može se zaključiti da veća količina enzima u reaktoru doprinosi boljoj homogenizaciji uzorka te samim time pravilnijim uzorkovanjem i manjim odstupanjem u analizama.

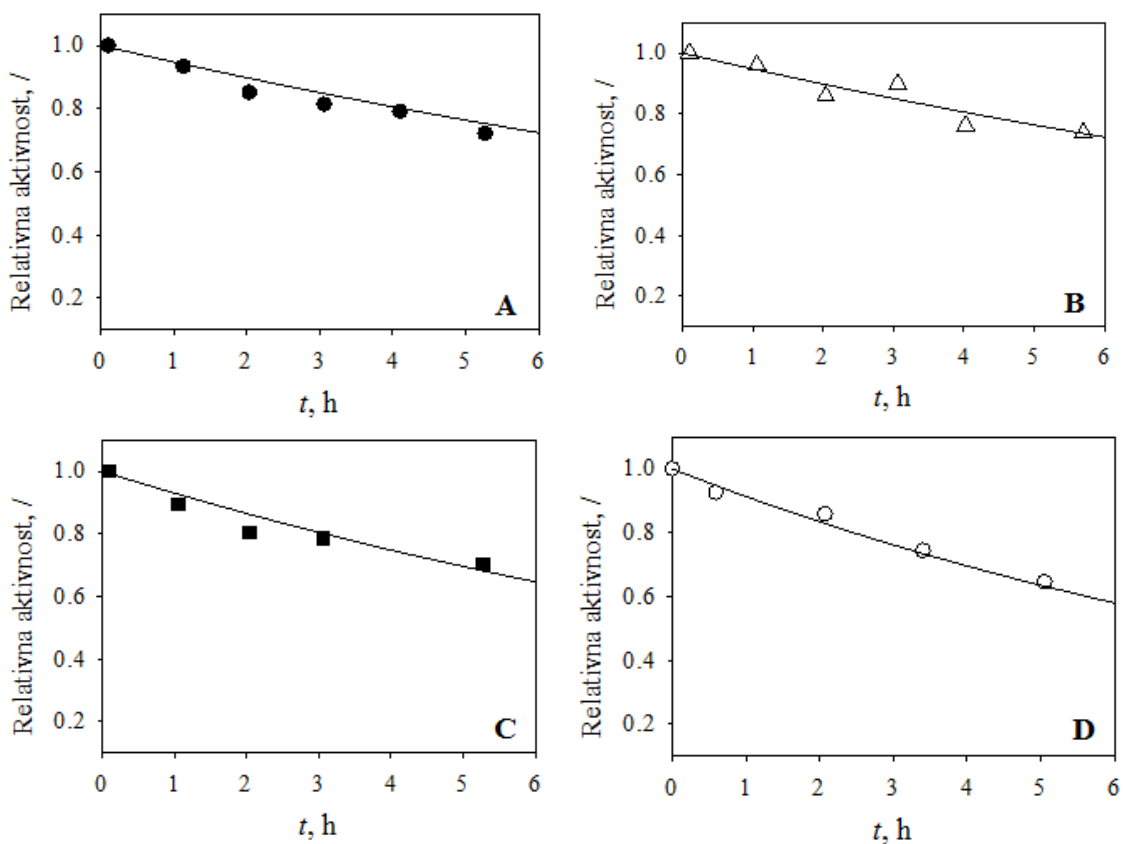
Na slici 5.1 H prikazan je repetitivni batch eksperiment u kojem se dodavalo 5 mM NaN_3 i $10 \text{ mM rac-epoksida}$ svakih sat vremena sve do 5. sata. Dodavanjem azida i epoksida vidljivo je kako koncentracija produkta (*R*)-azidoalkohola puno brže raste u odnosu na koncentraciju diola koja raste puno manjim intenzitetom. Također, i ovaj eksperiment pokazuje zadovoljavajuće slaganje s matematičkim modelom. Na graf H dodana je i simulacija za kotlasti reaktor kako bi se lakše usporedio s repetitivnim reaktorom. U oba slučaja korištena je jednaka ukupna koncentracija supstrata, ali je u repetitivnom reaktoru dodavanje epoksida, azida i enzima raspoređeno kroz 5 sati, a u kotlastom reaktoru je dodano odjednom. U repetitivnom reaktoru, dovođenjem supstrata u reaktor nastaje jednaka količina (*R*)-azidoalkohola dok je količina

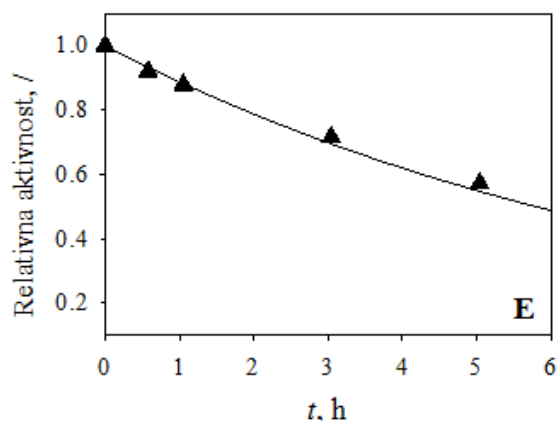
nastalog diola manja zbog povoljnije raspodjele koncentracije epoksida tijekom vremena pa je prema tome repetitivni reaktor bolji izbor za provedbu reakcije u odnosu na kotlasti.

5.3 Konstanta deaktivacije

Praćenjem aktivnosti enzima tijekom eksperimenata validacije modela u kotlastom reaktoru procijenjena je i konstanta deaktivacije enzima (k_d , min^{-1}). Konstanta deaktivacije je procijenjena na temelju izraza 5.1 iz eksperimentalnih podataka prikazanih na slici 5.3. Iz grafova na slici 5.3 vidljivo je da se relativna aktivnost enzima postepeno smanjuje tijekom 6 sati uzorkovanja. Što je veća koncentracija epoksida i azida u reakcijskoj smjesi, pad relativne aktivnosti enzima je sve izraženiji.

$$\frac{d\gamma_{W249P}}{dt} = -k_d \cdot \gamma_{W249P} \quad (5.1)$$





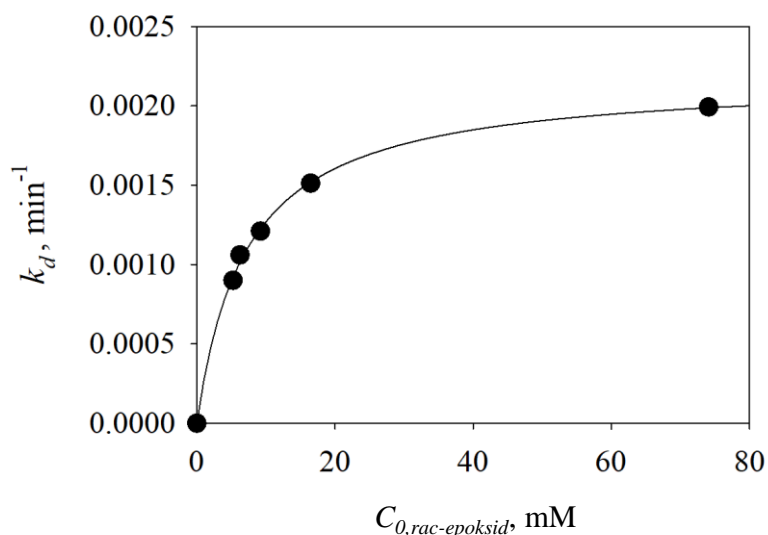
Slika 5.3 Eksperimentalni podaci za određivanje konstante deaktivacije ($V_r = 500 \mu\text{L}$, 500 mM Tris- SO_4 , $\text{pH} = 7,5$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, DMSO $10 \text{ } \%$ (v/v), 1000 rpm) **A.** $c_{\text{azid}} = 5 \text{ mM}$, $c_{\text{rac-2-[4-(trifluorometil)fenil]oksiran}} = 5 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 0,3 \text{ mg/ mL}$); **B.** $c_{\text{azid}} = 5 \text{ mM}$, $c_{\text{(R)-2-[4-(trifluorometil)fenil]oksiran}} = 5 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 0,2 \text{ mg/ mL}$; **C.** $c_{\text{azid}} = 10 \text{ mM}$, $c_{\text{(R)-2-[4-(trifluorometil)fenil]oksiran}} = 10 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 0,2 \text{ mg/ mL}$; **D.** $c_{\text{azid}} = 25 \text{ mM}$, $c_{\text{(R)-2-[4-(trifluorometil)fenil]oksiran}} = 25 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 0,3 \text{ mg/ mL}$; **E.** $c_{\text{azid}} = 50 \text{ mM}$, $c_{\text{(R)-2-[4-(trifluorometil)fenil]oksiran}} = 50 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 0,4 \text{ mg/ mL}$

Tablica 5.1 Prikaz početnih koncentracija epoksida i procijenjenih k_d vrijednosti

$c_{\text{epoksid, mM}}$	$k_d, \text{ min}^{-1}$
6,26	$0,00106 \pm 5,7 \cdot 10^{-5}$
5,26	$0,00095 \pm 1,4 \cdot 10^{-4}$
9,22	$0,00121 \pm 1,5 \cdot 10^{-4}$
16,5	$0,001512 \pm 7,7 \cdot 10^{-5}$
74,1	$0,001992 \pm 6,8 \cdot 10^{-5}$

Kao što je pretpostavljeno na temelju eksperimenata inkubacije sa supstratom i nukleofilom, operacijska stabilnost enzima ovisi o početnoj koncentraciji u reaktoru. Na temelju procijenjene konstante deaktivacije i početne koncentracije epoksida, dobiven je graf ovisnosti konstante deaktivacije o početnoj koncentraciji *rac*-2-[4-(trifluorometil) fenil] oksirana prikazan

na slici 5.4. Iz grafa na slici 5.4 vidljivo je da povećanjem koncentracije epoksida, konstanta deaktivacije raste do postizanja svojevrsnoga zasićenja kada se više ne mijenja.



Slika 5.4 Prikaz ovisnosti konstante deaktivacije o početnoj koncentraciji *rac*-epoksida

Ovisnost enzimske operacijske stabilnosti o koncentraciji epoksida može se opisati izrazom 5.2 kako je dano u nastavku:

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

Tablica 5.1 Procijenjeni parametri korišteni za izračun konstante deaktivacije prema jednadžbi 5.2.

Parametar	Vrijednost	Mjerna jedinica
<i>a</i>	$0,00218 \pm 3,14 \cdot 10^{-5}$	min^{-1}
<i>b</i>	$7,168 \pm 0,33$	mM

6. ZAKLJUČAK

U ovome radu provjerena je valjanost kinetičkog modela u reakciji sinteze (*R*)-2-azido-1-[4-(trifluorometil) fenil] etanola otvaranjem epoksidnog prstena *rac*-2-[4-(trifluorometil) fenil] oksirana uz azidne ione i biokatalizu s W249P enzimom.

Provedeni eksperimenti u kotlastom reaktoru dobro se slažu s matematičkim modelom kada su korišteni različiti početni uvjeti. Nastajanje produkta je u svim eksperimentima dobro opisano modelom pa se može zaključiti da je sinteza (*R*)-azidoalkohola validirana. Potrošnja supstrata djelomično odstupa od modela čemu može biti razlog slabija topljivost supstrata jer je koncentracija u reaktoru prividno niža od one koju predviđa model. Ukoliko se stavi jednaka količina enzima, epoksida i azida u oba reaktora, u kotlastom reaktoru nastaje više diola pa se može zaključiti da je reakciju bolje provoditi u repetitivnom kotlastom reaktoru nego u kotlastom reaktoru.

7. POPIS SIMBOLA

E_a – energija aktivacije, kJ

ΔG – slobodna Gibbsova energija, kJ

E – enzim

S – supstrat

ES – kompleks enzim – supstrat

ES[‡] - prijelazno stanje

EP – kompleks enzim – produkt

P – produkt

ATP – adenzin trifosfat

NADP⁺ – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NADPH – oksidirani oblik NADP-a

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

HHDH- halogenhidrin-dehalogenaza

V_{\max} – maksimalna brzina enzimske reakcije, mmol/dm³ min

K_m – Michaelisova konstanta, mmol/ dm³

c – množinska koncentracija, mmol/ dm³

t – vrijeme, min

ACN – acetonitril

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

PNSO – *p*-nitrofenilstiren oksid

V.A. – volumna aktivnost, U/ cm³

V_r – volumen reakcijske smjese, cm³

V_e – volumen enzima, cm³

S.A. – specifična aktivnost, U/mg

γ_e – masena koncentracija enzima, mg/ mL

DMSO – dimetil sulfoksid

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

IUBMB – Internacionalna unija za biokemiju i molekularnu biologiju (engl. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*)

TFA – trifluoroctena kiselina

K_i – konstanta inhibicije, mM

k_d – konstanta deaktivacije, min⁻¹

HheC – C tip halogenhidrin dehalogenaze

8. LITERATURA

1. Ahmed M., Ghanem A.; Applications of enzymatic and non-enzymatic methods to access enantiomerically pure compounds using kinetic resolution and racemization, *Tetrahedron*, **68**, 6781 – 6802 (2012)
2. Assis H. M. S., Bull A. T., Hardman D. J.; Synthesis of chiral epihalohydrins using haloalcohol dehalogenases A from *Arthobacter erithrii* H10a, *Enzyme. Microb. Technol.* **22(7)**, 545 – 551 (1998)
3. Bell L. E., Finnigan W., France P. S., Green P. A., Hayes A. M., Hepworth L. J., Lovelock L.S., Niikura H., Osuna S., Romero E., Ryan S. K., Turner J. N. , Flitsch L. S.; *Biocatalysis, Primer*, **1(46)**, 1 – 21 (2021)
4. Bornscheuer U. T., Hesseler M.; Enzymatic removal of 3-monochloropropanediol (3-MCPD) and its esters from oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **112**, 552 – 556 (2010)
5. Dvorak P., Bidmanova S., Damborsky J., Prokop Z.; Immobilized synthetic pathway for biodegradation of toxic recalcitrant pollutant 1,2,3-trichloropropane, *Environ. Sci. Technol.*, **48**, 6859 – 6866 (2014)
6. Ernst K.H.; Molecular chirality at surfaces, u: Wandelt K., *Surface and interface science*, Weinheim, Wiley, **249(11)**, 2057 – 2088 (2012)
7. Fusch M., Simeo Y., Ueberbacher B. T., Mautner B., Netscher T., Faber K.; Enantiocomplementary chemoenzymatic asymmetric synthesis of (*R*)- and (*S*)-chromanemethanol, *Eur. J. Org. Chem.*, **2009(6)**, 833 – 840 (2009)
8. Gomzi Z.; *Kemijski reaktori*, Hinus, str. 7 – 30 (2009)

9. van Hylckama Vlieg J. E. T., Tang L., Spelberg J. H., Smilda T. , Poelarends G. J., Bosma T., van Merode A. E. J., Fraaije M. W., Janssen D. B.; Halohydrin dehalogenases are structurally and mechanistically related to short-chain dehydrogenases/reductases, *Journal of Bacteriology*, **183**, 5058 – 5066 (2001)
10. Illanes A.; *Enzyme biocatalysis-principles and applications*, Springer Dordrecht, Chile, str. 1 – 106 (2008)
11. Illanes A., Cauerhff A., Wilson L., Castro R. G.; Recent trends in biocatalysis engineering, *Bioresource Technology Reports*, **115**, 48 – 57 (2012)
12. Janssen D. B., Majerić-Elenkov M., Hasnaoui G., Hauer B., Lutje Spelberg J. H.; Enantioselective formation and ring-opening of epoxides catalysed by halohydrin dehalogenases, *Biochem. Soc. Trans.*, **34(2)**, 291 – 295 (2006)
13. Kataoka M., Kita K., Wada M., Yasoharra Y., Hasegawa J., Shmizu S.; Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols, *App. Micr. Bio.*, **62(5)**, 437 – 445 (2003)
14. Kereselidze J., Mikuchadze G.; Quantum-Chemical Description of the Propensity of Amino Acids of Formation of the Peptide Bond, *Austin J. Comput. Biol. Bioinform.*, **3(1)**, 1 – 5 (2016)
15. Kuddus M.; *Enzymes in food biotechnology-production, applications and future prospects*, Academic Press, London, str. 1 – 18 (2019)
16. Liu S.; *Bioprocess engineering: kinetics, sustainability and reactor design*, Elsevier, Amsterdam, str. 297 – 373 (2016)

17. Lutje Spelberg J. H., Tang L., Kellogg R. M., Janssen D. B.; Enzymatic dynamic kinetic resolution of epihalohydrins, *Tetrahedron Asymmetry*, **15**, 1095 – 1102 (2004)
18. Ma K. S., Gruber J., Davis C., Newman L., Gray D., Wang A., Grate J., Huisman W. G., Sheldon A. R.; A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate, *Green Chemistry*, **12**, 81 – 86 (2010)
19. Majerić-Elenkov M., Hoeffken H. W., Tang L., Hauer B., Janssen D. B.; Enzyme-catalyzed nucleophilic ring opening of epoxides for the preparation of enantiopure tertiary alcohols, *Adv. Synth. Catal.*, **349**, 2279 – 2285 (2007)
20. May O., Nguyen P. T., Arnold F. H.; Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improves production of L-methionine, *Nature Biotechnology*, **18(3)**, 317 – 320 (2002)
21. McDonald G. A., Boyce S., Tipton F. K.; Enzyme classification and nomenclature, u: John Wiley & Sons, *Encyclopedia of life sciences*, Chichester, Wiley, 1 – 11 (2015)
22. 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**, 595 – 621 (2007)
23. Ottone C, Romero O., Urrutia P., Bernal C., Illanes A., Wilson L.; Enzyme biocatalysis and sustainability, u: Piumetti M., Bensaid S., *Nanostructured catalysts for environmental applications*, Cham, Springer Nature Switzerland, 383 – 413 (2021)
24. Paul P. E., Sangeetha V., Deepika R. G.; Emerging trends in the industrial production of chemical products by microorganisms, *Academic Press.*, 107 – 125 (2019)

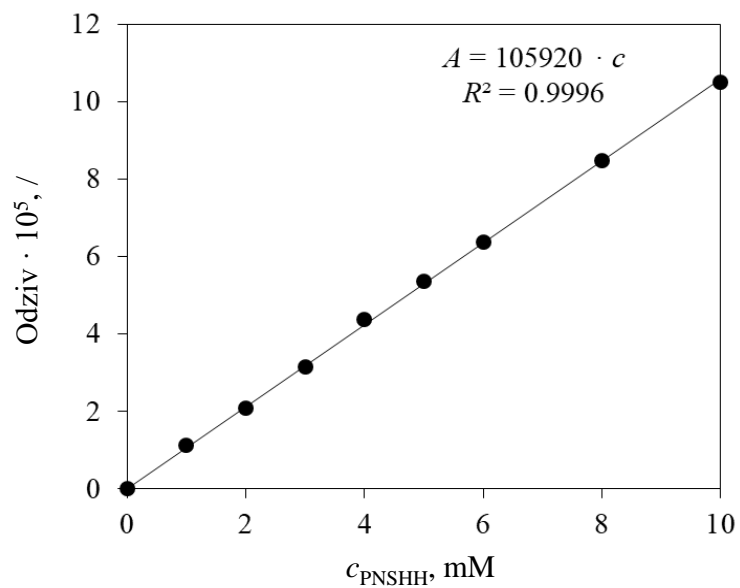
25. Pauling L.; Molecular architecture and biological reactions, *Chem. Ing. News*, **24**, 1375 – 1377 (1946)
26. Pera L. M., Baigori M. D., Pandey A., Castro G. R.; Biocatalysis, u: Höfer R., Taherzadeh M., Nampoothiri M. K., Larroche C., *Industrial biorefineries & white biotechnology*, Amsterdam, Elsevier, 391 – 408 (2015)
27. Ran N., Zhao L., Chen Z., Tao J.; Recent applications of biocatalysis in developing green chemistry for chemical synthesis at the industrial scale, *Green Chem.*, **10**, 361 – 372 (2008)
28. Roskoski R.; Enzyme structure and function, u: Enna S. J., Bylund D. B., *xPharm: The comprehensive pharmacology reference*, New York, Elsevier, 1 – 7 (2007)
29. Roskoski R.; Michaelis-Menten kinetics, u: Caplan M., *Reference module in biomedical sciences*, New York, Elsevier, 206 – 224 (2015)
30. Schallmey A.; Schallmey M.; Recent advantages on halohydrin dehalogenases- from enzyme identification to novel biocatalytic applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 7827 – 7839 (2016)
31. Schmid A., Dordick J. S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B.; Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature*, **409 (6817)**, 258 – 268 (2001)
32. Settle F. A.; *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*, Prentice Hall PTR, New Jersey, str. 147 – 165 (1997)
33. Sharma R.; Enzyme inhibition and bioapplications, *InTech*, Rijeka, str. 3 – 5 (2012)

34. Sheldon A. R., Woodley J. M.; Role of biocatalysis in sustainable chemistry, *Chem. Rev.*, **118** (2), 801 – 838 (2018)
35. Shoda S., Uyama H., Kadokawa J., Kimura S., Kobayashi S.; Enzymes as green catalysts for precision macromolecular synthesis, *Chem. Rev.*, **116** (4), 2307 – 2413 (2016)
36. Silva C., Cavaco-Paulo A. M., Fu J. J.; Enzymatic biofinishes for synthetic textiles, Woodhead Publishing, Cambridge, str. 153 – 191 (2015)
37. Sin G., Woodley J. M., Germaey K. V., Application of modeling and simulation tools for the evaluation of biocatalytic processes: a future perspective, *Biotechnol. Progress*, **25**, 1529 – 1538 (2009)
38. Solomons T. W. G., Fryhle C. B., Snyder S. A.; Organic chemistry, John Wiley & Sons, 191 – 239 (2013)
39. Šinko G.; Preparations and biological properties of chiral compounds, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, **56**, 351 – 361 (2005)
40. Tomljenović E.; Validacija modela biokatalitičke sinteze (*R*)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola u šaržnom reaktoru, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2021)
41. Torrelo G., Hanefeld U., Holmann F.; Biocatalysis, *Catal Lett*, **145**, 309 – 345 (2015)
42. Vasić-Rački Đ., Findrik Blažević Z., Vrsalović Presečki A.; Modeling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **91**, 845 – 856 (2011)

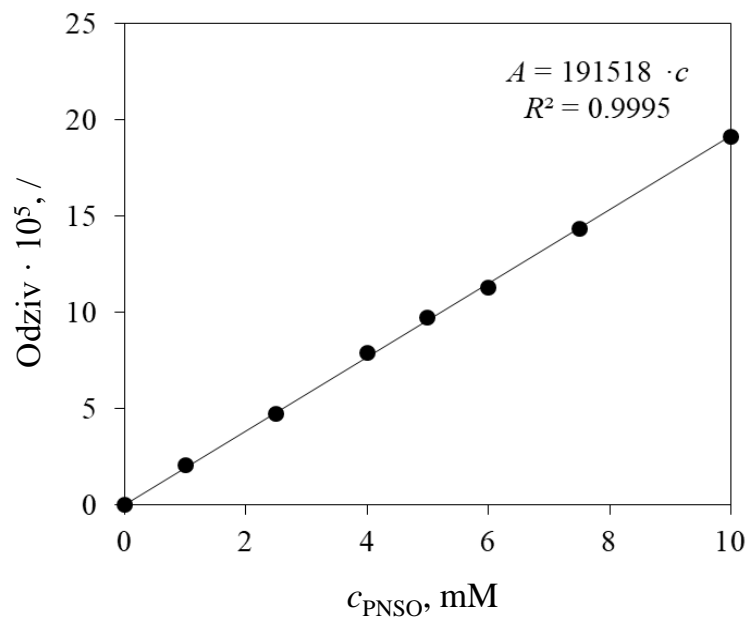
43. de Vries E.J.; Janssen B. D.; Biocatalytic conversion of epoxides, *Curr. Op. Biotech.*, **14**(4), 414 – 420 (2003)
44. Wan N-W., Liu Z-Q, Xue F., Zheng Y-G; An enzymatic method for determination of azide and cyanide in aqueous phase, *J. Biotechnol.*, **214**, 27-32 (2015)
45. Yaseen F., Siddique A., Idrees N., Fateh A., Ahmad R., Ali A., Ali I.; Enzyme biocatalysis in organic synthesis, *Biol. Clin. Sci. Res. J.*, **73**, 1 – 6 (2021)
46. You Z-Y., Liu Z-Q., Zheng Y-G.; Properties and biotechnological applications of halohydrin dehalogenases: current state and future perspectives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 9-21 (2013)

9. PRILOZI

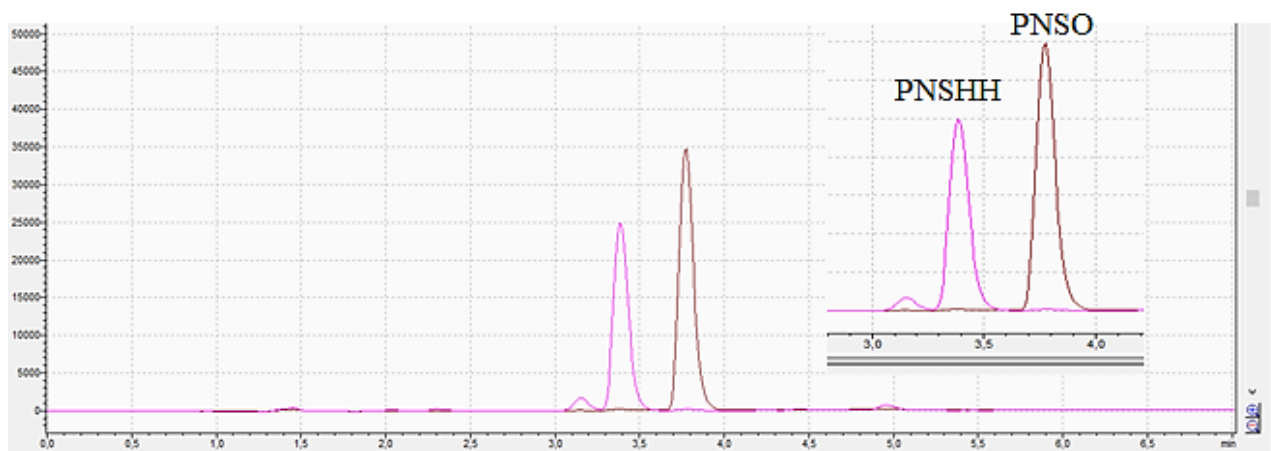
PRILOG 1. Baždarni pravac za PNSHH



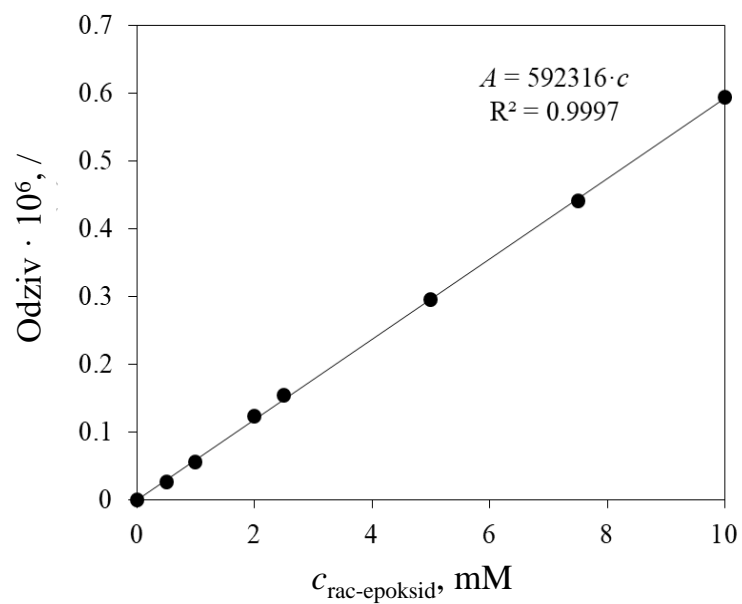
PRILOG 2. Baždarni pravac za PNSO



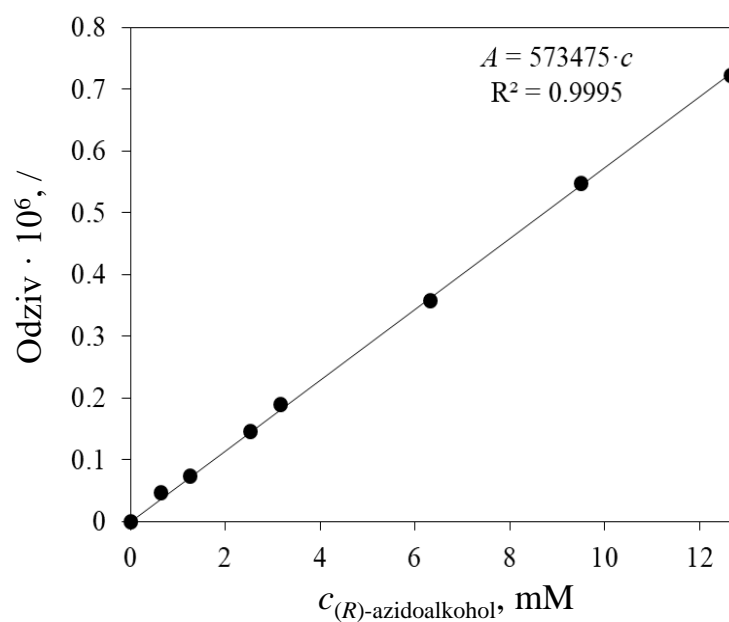
PRILOG 3. Kromatogram za PNSHH i PNSO



PRILOG 4. Baždarni pravac za *rac*-2-[4-(trifluorometil) fenil] oksiran



PRILOG 5. Baždarni pravac za (*R*)-2-azido-1-[4-(trifluorometil) fenil] etanol



PRILOG 6. Kromatogram za *rac*-2-[4-(trifluorometil) fenil] oksiran i (*R*)-2-azido-1-[4-(trifluorometil) fenil] etanol

