

# Stabilnost halogenhidrin-dehalogenaza u prisustvu supstrata

---

**Bartolec, Jan**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*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:149:840123>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-23**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Jan Bartolec

STABILNOST HALOGENHIDRIN – DEHALOGENAZA U  
PRISUSTVU SUPSTRATA

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidat Jan Bartolec

Predao je izrađen završni rad dana: 15. rujna 2021.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Doc. dr. sc. Martina Sudar, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Doc. dr. sc. Dragana Vuk, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, zamjena

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 20. rujna 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Jan Bartolec

STABILNOST HALOGENHIDRIN – DEHALOGENAZA U  
PRISUSTVU SUPSTRATA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj 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. Martina Sudar

Zagreb, rujan 2021.

## SAŽETAK

U ovom radu halogenhidrin-dehalogenaza (HheC) inkubirana je u prisustvu supstrata *p*-fluorstiren oksida i *p*-trifluormetilstiren oksida različitih koncentracija; 2, 5, 10 i 20 mM. Cilj rada bio je ispitati njihov utjecaj na smanjenje aktivnosti enzima HheC.

Aktivnost enzima HheC mjerena je spektrofotometrijskim testom tijekom prvih 24 sata. Iz dobivenih podataka računala se specifična aktivnost enzima i na temelju tih podataka radila se usporedba mjerenja između različitih koncentracija supstrata.

**Ključne riječi:** halogenhidrin-dehalogenaza, specifična aktivnost, supstrat, stabilnost enzima

## **ABSTRACT**

In this work, halohydrin dehalogenase (HheC) was incubated in the presence of *p*-fluoro-styrene oxide and *p*-trifluoromethyl-styrene oxide substrates of different concentrations; 2, 5, 10 and 20 mM. The aim of this study was to examine their impact on the reduction of HheC enzyme activity.

The spectrophotometric assay was used to measure HheC enzyme activity during the first 24 hours. From the obtained data, the specific activity of enzyme was calculated and based on that, the measurements between different substrate concentrations were compared.

**Keywords:** halohydrin dehalogenase, specific activity, substrate, enzyme stability

Ovaj rad financirala je Hrvatska zaklada za znanost u okviru projekta "Enzimaska sinteza fluoriranih kiralnih građevnih blokova (EnzyFluor)", IP-2018-01-4493



# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Enzimi .....	2
2.1.1. Funkcija enzima .....	2
2.1.2. Mehanizam djelovanja enzima.....	3
2.1.3. Podjela enzima .....	5
2.2. Inhibicija enzimske aktivnosti .....	6
2.2.1. Kompetitivni inhibitori.....	6
2.2.2. Nekompetitivni inhibitori.....	7
2.2.3. Mješoviti inhibitori.....	7
2.3. Utjecaj supstrata na enzimsku kinetiku .....	7
2.4. Halogenhidrin-dehalogenaza (HHDH).....	8
2.4.1. Nukleofili .....	9
2.4.2. Procesi u kojima se HDHH mogu koristiti kao katalizatori.....	11
2.4.3. Primjena u industriji .....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	16
3.1. Aparatura .....	16
3.1.1. Tresilica.....	16
3.1.2. Homogenizator .....	16
3.1.3. Centrifuga.....	17
3.1.4. Spektrofotometar .....	17
3.2. Provedba eksperimenta .....	18
3.2.1. Inkubacija enzima .....	18
3.2.2. Centrifugiranje .....	18
3.2.3. Mjerenje aktivnosti enzima HheC – spektrofotometrijskim PNSHH testom ....	19
3.3. Računanje volumne i specifične aktivnosti enzima HheC.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4.1. Aktivnost enzima HheC inkubiranog <i>p</i> -fluorstiren oksidom.....	21
4.2. Aktivnost enzima HheC inkubiranog <i>p</i> -trifluormetilstiren oksidom.....	23
4.3. Usporedba <i>p</i> -fluorstiren oksida i <i>p</i> -trifluormetilstiren oksida s drugim supstratima	25
5. ZAKLJUČAK.....	26
6. POPIS SIMBOLA .....	27
7. LITERATURA .....	29



8. PRILOZI.....	32
9. ŽIVOTOPIS .....	33

## 1. UVOD

Stanica je strukturna i funkcionalna jedinica života - osnovni gradivni element živih sustava. Stanice imaju sposobnost djelotvornog korištenja biokatalizatora, odnosno enzima, koji imaju izvanrednu katalitičku učinkovitost i specifičnost za supstrate i reakcije. Oni su ključni za stanični metabolizam. Svaka kemijska reakcija koja se odvija u biljkama, mikroorganizmima i životinjama odvija se mjerljivom brzinom kao izravna posljedica enzimske katalize [1]. Enzimi su globularni proteini čija molekulska masa varira od 10 000 pa sve do nekoliko milijuna [2].

Oni se također se mogu izolirati iz stanica, a zatim koristiti za katalizu komercijalno važnih procesa široke upotrebe. Na primjer, imaju važnu ulogu u proizvodnji zaslađivača i modifikaciji antibiotika, koriste se u prašcima za pranje i raznim proizvodima za čišćenje, a imaju i ključnu ulogu u analitičkim uređajima i testovima koji imaju kliničku, forenzičku i ekološku primjenu [3].

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Enzimi

Enzimi su proteini s visoko specijaliziranim katalitičkim funkcijama koje proizvode svi živi organizmi. Odgovorni su za mnoge važne biokemijske reakcije u mikroorganizmima, biljkama, životinjama i ljudima. Sastavljeni su od proteina formiranih dugim linearnim lancima aminokiselina povezanih peptidnim vezama kao i svi drugi proteini, ali se razlikuju u funkciji po tome što imaju jedinstvenu sposobnost da olakšaju biokemijske reakcije bez da se i sami podvrgnu promjenama. Važni su za sve metaboličke procese, ali oni nisu živi. Proizvode ih stanice, ali nisu virusi niti bakterije i ne mogu se sami razmnožavati; stoga su "živi" iako nisu biološki aktivni u određenim uvjetima pH, temperature, sastava tekućine i ostalo [4].

Enzimi olakšavaju pretvorbu početnih tvari odnosno supstrata u različite molekule koje zovemo produkti. Nazivi enzima ukazuju na njihove specifične funkcije. Sufiks *-aza* označava da je molekula enzim, iako neki enzimi, poput probavnog enzima pepsina, ne nose ovaj nastavak. Ostatak naziva enzima otkriva njegovu funkciju. Na primjer, proteaza je enzim koji razgrađuje proteine; lipaza je enzim koji razgrađuje lipide. Enzimi koji grade molekule često se nazivaju sintazama. Izomeraza je, poput izomeraze riboze, enzim koji molekulu preuređuje u njezin izomer. Ova konvencija olakšava prepoznavanje prirode reakcije koju pokreće određeni enzim [5].

#### 2.1.1. Funkcija enzima

Funkcija enzima suštinski je povezana s njegovom trodimenzionalnom strukturom, određujući način na koji obavlja vezivanje supstrata, katalizu i regulaciju [6]. Bez enzimске katalize, većina reakcija bila bi prespora i time bez koristi za život, iako u prirodi ne zahtijevaju sve reakcije katalizu [7].

Rentgenska kristalografija bila je najvažnija tehnika u razvoju razumijevanja strukture enzima, a time i funkcije enzima. [6]

Veći proteini skloni su presavijanju u niz manjih domena, od kojih svaka čini samostalnu strukturnu jedinicu. Ove se domene često opisuju kao jedinice evolucije jer se često mogu zamijeniti između proteina bez ometanja presavijanja drugih dijelova proteina i tako mogu nastati nove funkcije iz novih kombinacija domena unutar jednog proteina [6].

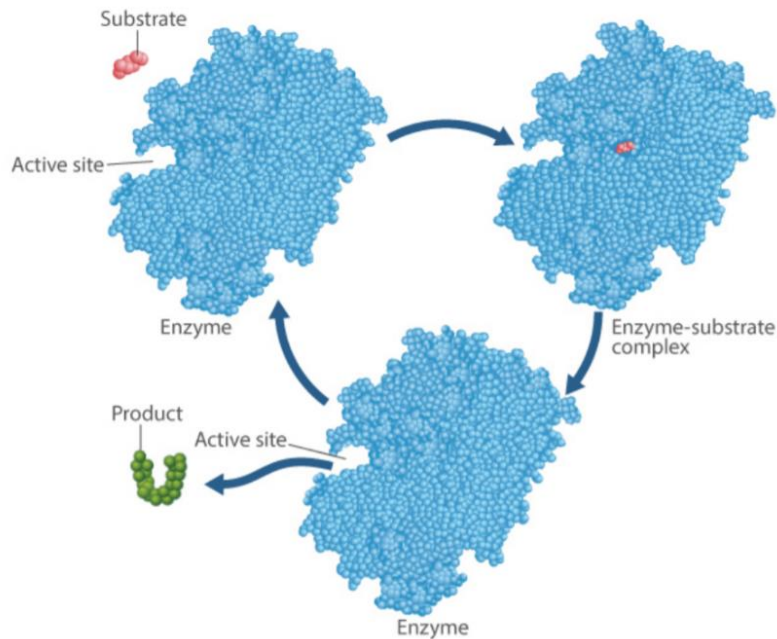
U enzimima su određene funkcije često sadržane unutar domene. Na primjer, Rossmannova domena koja veže nukleotide pronađena je u kombinaciji s različitim zasebnim katalitičkim domenama, dopuštajući svakom enzimu da veže slične nukleotidne kofaktore kao što su nikotinamid adenin dinukleotid (NADH), nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) i flavin mononukleotid (FMN), ali izvodi sasvim drugačiju kemiju [6].

### 2.1.2. Mehanizam djelovanja enzima

Razumijevanje temeljnih procesa koji omogućuju tako učinkovite funkcije ovih makromolekula dugo je zanimalo znanstvenike. Godine 1894. Emil Fischer ponudio je prvi popularni model koji objašnjava funkciju enzima (Fischer, 1894.). Ovaj model je nastao iz njegove fascinacije određenim glikolitičkim enzimima i njihove sposobnosti razlikovanja različitih stereoizomera šećera. U njegovoj "ključ-brava" hipotezi, enzim je "brava" koja može prihvatiti samo jedan ili nekolicinu "ključeva". Iako se sugerira da je aktivno mjesto enzima komplementarno s osnovnim stanjem reakcije, nudeći objašnjenje za izuzetnu specifičnost enzima, ovaj model je krajnje pojednostavljen jer ne govori ništa o tome što se događa nakon što se enzim veže za supstrat. Zanimljivo je pitanje koja se tiču načina na koji se vezani supstrat pretvara u prijelazno stanje. Međutim, treba se sjetiti da se u to vrijeme mislilo da su enzimi zapravo ugljikohidrati [8].

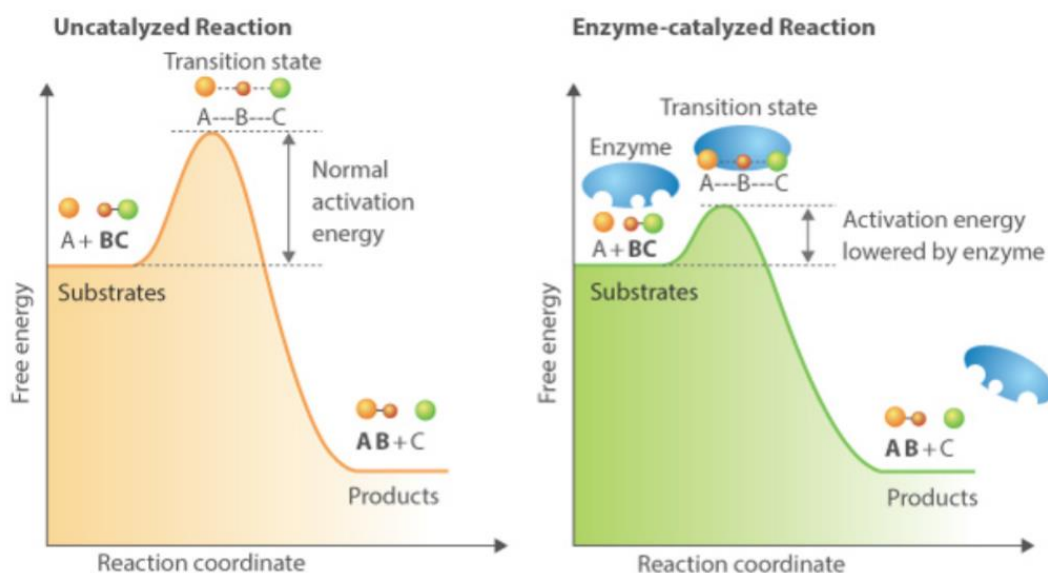
Ovaj pogled na enzimsku katalizu prevladavao je sve do 1930. kada je J.B.S. Haldane svoja razmišljanja usmjerio na tu temu (Haldane, 1930). Haldane je shvatio da izvor katalitičke snage u konačnici mora proizlaziti iz izrazitog afiniteta aktivnog mjesta enzima prema reakciji prijelaznog stanja. Koshland je predložio da bi enzim trebao biti takav tek nakon interakcije osnovnog stanja s enzimom [8].

Prema Haldane/Koshlandovom modelu, enzimске katalitičke skupine nisu sasvim optimizirane za stabilizaciju prijelaznog stanja sve dok se osnovno stanje ne veže. Ova je ideja značajno poboljšanje u tome što ukazuje da polja kemijskih sila enzima i supstrata moraju utjecati jedno na drugo u procesu vezanja. Tako prema Haldaneovom i Koshlandovom mišljenju, supstrat inducira komplementarnost prijelaznog stanja lokalnim preuređivanjem funkcije aktivnog mjesta, podvrgava se sili stabilizacije prijelaznog stanja i pretvara se u produkt (slika 2.1.) [8].



**Slika 2.1.** Katalitički ciklus enzima [5]

Pretvarajući se u produkte, supstrati tijekom kemijske reakcije prolaze kroz prijelazno stanje. Prijelazno stanje je stanje u kojem kemijska reakcija ima najvišu energiju. Razlika između energetskeg nivoa supstrata i energetskeg nivoa prijelaznog stanja naziva se energija aktivacije (slika 2.2.). Aktivacijska energija je energija potrebna za savladavanje energetske barijere cijepanja i ponovnog formiranja veza za nastavak reakcije [5].



**Slika 2.2.** Enzimi i energija aktivacije [5]

Energija aktivacije određuje broj molekula produkta koje mogu nastati putem prijelaznog stanja u određenom vremenskom razdoblju. Povećanjem temperature povećava

se i kinetička energija molekula, što supstratima omogućuje brže savladavanje aktivacijske energetske barijere. Međutim, ova strategija nije izvediva u većini stanica jer proteini denaturiraju i drugi se stanični procesi narušavaju kada temperatura postane previsoka. Stanicama je potreban drugačiji pristup kako bi se savladala aktivacijska energetska barijera. Enzimi olakšavaju kemijske reakcije snižavanjem energije aktivacije potrebne za nastanak reakcije. Ustvari, enzimi mogu odvesti reakciju do kraja drugačijim putem. Ova moć snižavanja aktivacijske energije čini enzime biološkim katalizatorima (slika 2.2.). Unutar živih stanica gotovo svi metabolički putevi oslanjaju se na enzime za pretvaranje supstrata u produkte koje stanica može koristiti za biološku aktivnost [5].

### 2.1.3. Podjela enzima

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

1. Oksidoreduktaze su enzimi koji kataliziraju oksidacijsko/redukcijske reakcije koje uključuju prijenos elektrona, vodikovih ili kisikovih atoma. Postoje 22 podvrste, od kojih su za industriju najznačajniji dehidrogenaze koje oksidiraju supstrat prijenosom vodikova atoma na koenzim ( $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{FAD}^+$ ) koji djeluje kao akceptor.
2. Transferaze su enzimi koji kataliziraju prijenos funkcionalne skupine s donora na prihvatljivog akceptora. Postoji 9 podvrsta, ovisno o kemijskoj prirodi skupine koja se prenosi. Zahtijevaju koenzime za rad te su isključivo unutarstanični.
3. Hidrolaze su enzimi koji kataliziraju reakcije hidrolize tj. reakcije cijepanja kemijske veze djelovanjem vode. Postoji 12 podskupina hidrolaza, ovisno o tipu prihvatljive veze. Ovi su enzimi važni za katabolizam zbog opskrbe stanice hranjivim tvarima koje se mogu apsorbirati. Većina za rad ne zahtijeva koenzime.
4. Liaze su enzimi koji kataliziraju reakcije ne-hidrolitičkog i ne-oksidacijskog cijepanja kemijskih veza. Podijeljene su u sedam podskupina, ovisno o tipu prihvatljive veze. Većina je unutarstanična, a neke ne zahtijevaju koenzime za rad.
5. Izomeraze su enzimi koji kataliziraju reakcije pretvaranja supstrata u izomer tj. molekulu s istim brojem i vrstama atoma. Postoji 6 podvrsta, ovisno o tipu izomera koji se proizvodi.
6. Ligaze su enzimi koji kataliziraju reakcije kovalentnog povezivanja dviju molekula. To su enzimi odgovorni za stanični anabolizam i kao takvi imaju bitnu ulogu u

reakcijama sinteze unutar stanice (ponekad se nazivaju i sintetaze). Postoji 6 podvrsta, ovisno o tipu veze koja se formira [9].

## **2.2. Inhibicija enzimske aktivnosti**

Brzina enzimske reakcije može se usporiti različitim vrstama inhibitora enzima. Inhibitori enzima su molekule koje na određen način stupaju u interakciju s enzimom kako bi spriječili njegov normalan rad. Na primjer, trovanje metanolom događa se zbog oksidacije metanola u formaldehid i mravlju kiselinu koji napadaju vidni živac uzrokujući sljepoću. Etanol se daje kao lijek za trovanje metanolom jer on kompetitivno inhibira oksidaciju metanola. Etanol će se prije oksidirati nego metanol, pa se oksidacija metanola usporava i otrovni se nusprodukti nemaju priliku akumulirati [4].

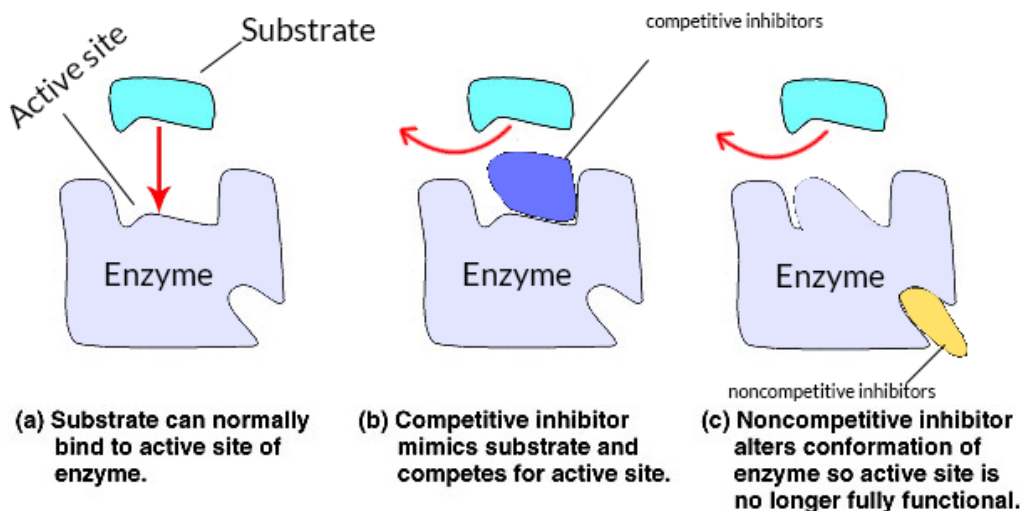
Enzimi su podložni reverzibilnoj inhibiciji zbog nekovalentnog vezanja malih biomolekula ili proteina na podjedinicu enzima, a podložni su i ireverzibilnoj inhibiciji, u kojoj inhibitorna molekula tvori kovalentnu vezu (ili, rjeđe, vrlo jake nekovalentne interakcije) s katalitičkim skupinama na aktivnom mjestu enzima. Postoje tri vrste reverzibilnih inhibitora: kompetitivni inhibitori, nekompetitivni inhibitori i mješoviti inhibitori [10].

### **2.2.1. Kompetitivni inhibitori**

Kompetitivni inhibitori definirani su kao molekule koje inhibiraju vezanje supstrata na aktivnom mjestu (slika 2.3.b). Klasični kompetitivni inhibitor veže se izravno na aktivno mjesto. Međutim, neki kompetitivni inhibitori samo djelomično ometaju vezivanje supstrata, bilo steričkim smetnjama ili djelomičnim zauzimanjem aktivnog mjesta od strane sličnih veznih skupina. Ostali kompetitivni inhibitori vežu se na mjesta na enzimu koja nisu dio aktivnog mjesta, ali time rezultiraju u nemogućnosti aktivnog mjesta da veže supstrat. Na primjer, inhibitor može uzrokovati konformacijsku promjenu koja zatvara aktivno mjesto [10].

### 2.2.2. Nekompetitivni inhibitori

Nekompetitivni inhibitori vežu se na enzim-supstrat komplekse i mijenjaju konformaciju aktivnog mjesta čime enzim postaje manje katalitički aktivan (slika 2.3.c). Ova vrsta inhibitora se ne veže za slobodne enzime. Nekompetitivni inhibitori za enzime s jednim supstratom su rijetki. Češće djeluju na enzime s više uzastopno dodanih supstrata [10].



**Slika 2.3.** Vežanje supstrata za enzim **A.** u normalnim okolnostima **B.** uz kompetitivni inhibitor **C.** uz nekompetitivni inhibitor [11]

### 2.2.3. Mješoviti inhibitori

Mješoviti inhibitori su slični nekompetitivnim inhibitorima po tome što se vežu za mjesta koja nisu dio aktivnog mjesta enzima. Glavna razlika je u tome što se mješoviti inhibitori mogu vezati i za enzim i za enzim-supstrat kompleks, što se može gledati kao mješavina kompetitivne i nekompetitivne inhibicije te od tuda dolazi naziv *mješoviti* [10].

## 2.3. Utjecaj supstrata na enzimsku kinetiku

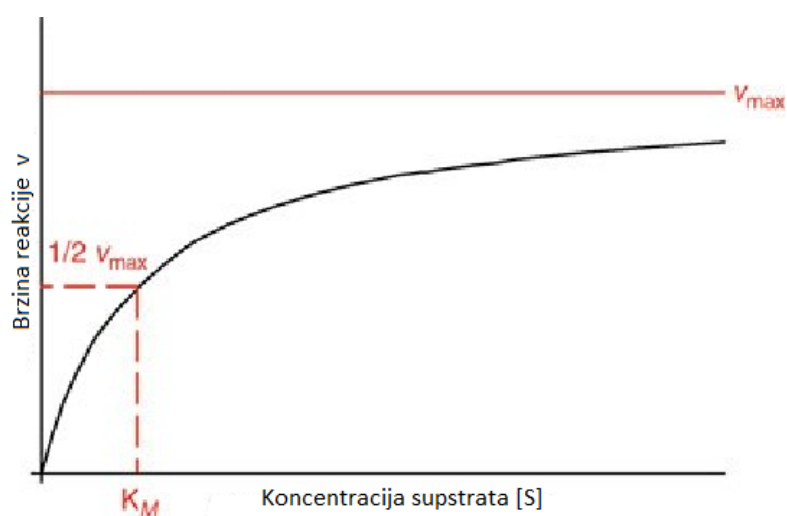
Studije o cjelokupnoj kinetici djelovanja enzima otkrile su da je, u većini slučajeva i u određenim rasponima koncentracija, enzimska aktivnost linearno povezana s koncentracijom enzima, a hiperbolički s koncentracijom supstrata. Na temelju takvih dokaza Michaelis i Menten objasnili su takve odnose pod pretpostavkom da je nastao međuprodukt enzima i supstrata:  $E + S \rightarrow ES \rightarrow E + P$  [12].



Michaelis-Menten jednadžba (jednadžba 2.1.), kako su je predstavili Michaelis i Menten, a dalje razvili Briggs i Haldane, od temeljne je važnosti za kinetiku enzima. Jednadžbu karakteriziraju dvije konstante: Michaelis-Menten konstanta ( $K_m$ ) i posredno dobivena katalitička konstanta,  $k_{cat}$ . Iako je izvedena iz jednostavne, ireverzibilne reakcije s jednim supstratom, Michaelis-Menten jednadžba vrijedi i za složene reakcije [13].

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.1.)$$

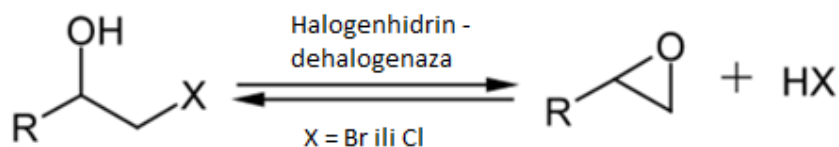
Omjer  $k_{cat}/K_m$  definiran je kao katalitička učinkovitost i može se promatrati kao mjera za specifičnost supstrata [13].



**Slika 2.4.** Ovisnost reakcijske brzine o koncentraciji supstrata kod Michaelis-Menten kinetike [14]

#### 2.4. Halogenhidrin-dehalogenaza (HHDH)

Halogenhidrin-dehalogenaze su bakterijski enzimi koji kataliziraju reakciju stvaranja epoksida iz vicinalnih halogenhidrina (slika 2.5.). [15] HHDH također može katalizirati obrnutu reakciju (otvaranje epoksidnog prstena) u prisutnosti nukleofila kao što su ion cijanida, azida i nitrita [16].



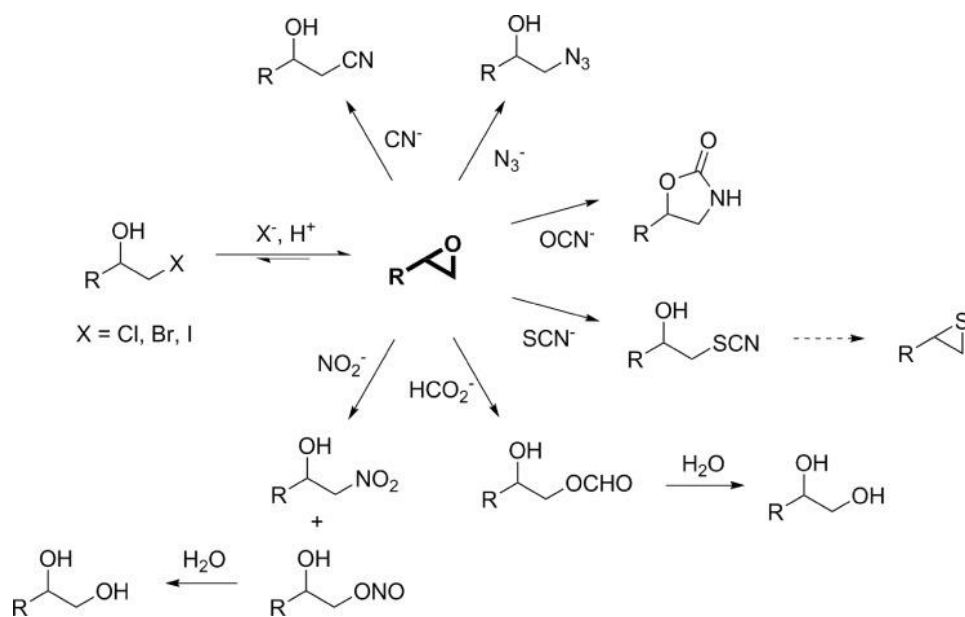
**Slika 2.5.** Reverzibilna reakcija zatvaranja prstena katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom [15]

Na temelju svojih specifičnih aktivnosti prema nizu supstrata halogenhidrin-dehalogenaze podijeljene su u tri različite skupine. Skupinu A halogenhidrin-dehalogenaza karakterizira vrlo visoka aktivnost prema 1,3-dibrom-2-propanolu. Pripadnici ove skupine su HheA (halogenhidrin-dehalogenaza iz *Arthrobacter* sp. AD2), H-liaza A (halogenhidrin-dehalogenaza iz *Corynebacterium* sp. N-1074) i DehC (halogenhidrin-dehalogenaza iz *Arthrobacter erithii* H10a). Pripadnici skupine B su H-liaza B (halogenhidrin-dehalogenaza iz *Mycobacterium* sp. GP1) i DehA (halogenhidrin-dehalogenaza iz *Arthrobacter erithii* H10a). Osim manje aktivnosti prema 1,3-dibrom-2-propanolu, izbor supstrata je sličan kao oni za skupinu A [17].

Enzim iz skupine C, HheC (halogenhidrin-dehalogenaza iz *Agrobacterium radiobacter* AD1) zamjetno se razlikuje od skupina A i B, u smislu visoke enantioselektivnosti prema aromatskim supstratima [17].

#### 2.4.1. Nukleofili

Kao što je spomenuto, HHDH po svojoj prirodnoj funkciji kataliziraju reverzibilnu dehalogenizaciju vicinalnih halogenalkohola stvaranjem odgovarajućih epoksida. U obrnutoj reakciji, odnosno kod otvaranja epoksidnog prstena, ti enzimi ne prihvaćaju samo halogenide ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ) kao nukleofile već i druge neprirodne anionske nukleofile poput azida, cijanida, nitrita, cijanata, tiocijanata i formijata (slika 2.6.) [18]. Ovo daje pristup odgovarajućim neprirodnim alkoholima poput  $\beta$ -nitro i  $\beta$ -azido alkohola, kao i  $\beta$ -hidroksinitrilima i općenito 1,2-difunkcijskim organskim spojevima [19].



**Slika 2.6.** Katalitički opseg HDDH u dehalogenizaciji i otvaranju epoksidnog prstena [20]

Azid je zanimljiv neprirodni nukleofil pomoću kojeg se mogu dobiti optički čisti azidoalkoholi koji su prekursori aminoalkoholima i korisni međuprodukti. [19]. Enzimski katalizirana azidoliza epoksida prvi je put opisana za sirovi enzimski pripravak iz *Rhodococcus sp* [21].

Cijanid je također zanimljiv nukleofil jer nudi daljnju transformaciju spojeva u molekule koje sadrže amino, amidne ili karboksi skupine djelovanjem enzima koji pretvaraju nitril-amid [19]. Prihvatanje cijanida kao nukleofila od strane HDDH prvi je uočio Nakamura koji je istraživao otvaranje epoksidnog prstena 1,2-epoksibutana u  $\beta$ -hidroksivaleronitril, te epiklorhidrina u (*R*)- $\gamma$ -klor-(*R*)- $\beta$ -hidroksibutironitrila pomoću halogenhidrin-dehalogenaze skupine A iz bakterije *Corynebacterium*. Potonji produkt je međuprodukt za pripremu L-karnitina. HheC iz *A. radiobacter* također prihvaća cijanid, pa se mogu stvoriti različiti  $\beta$ -cijanoalkoholi. Enantioselektivnost opet ovisi o upotrijebljenom epoksidu sa tendencijom da bude veća za HheC nego kod HDDH skupine A i B. Enantioselektivnost je također bolja u slučaju velikih supstituenata nego kod jednostavnih alifatskih terminalnih epoksida. Enantioselektivna konverzija  $\alpha,\alpha$ -disupstituiranih epoksida omogućuje stvaranje kiralnih tercijarnih  $\beta$ -hidroksinitrila koji se teško mogu pripremiti na drugi način [21].

Kada nitrit napadne epoksid preko atoma kisika, nastaje nitritni ester. Ovaj spoj je kemijski nestabilan, osobito pri niskom pH i hidrolizira u diol. Na ovaj način halogenhidrin-

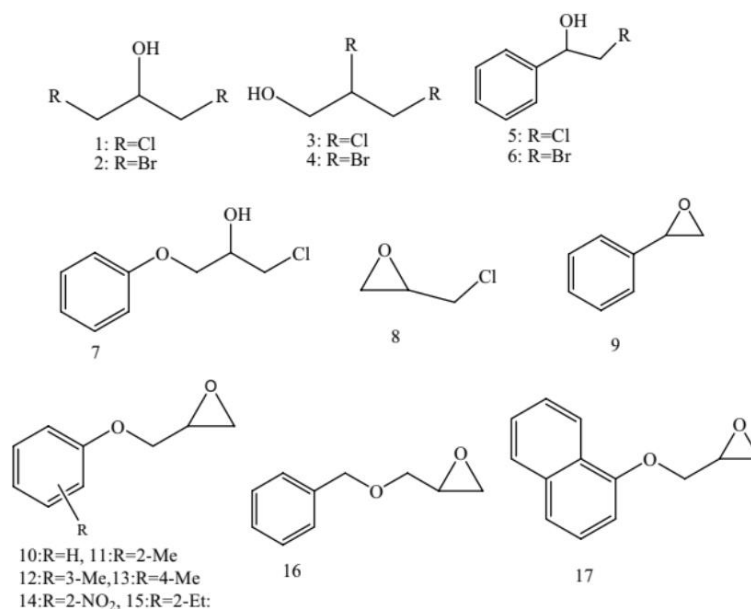
dehalogenaza se ponaša kao alternativa epoksid hidrolaze ovisne o nitritima. Kao i kod azidolize, nitritom posredovano otvaranje prstena epoksida događa se s velikom regioselektivnošću za manje supstituirani ( $\alpha$ ) atom ugljika. Enantioselektivnost ovisi o prirodni epoksidnog supstrata. Visoka je, sa (*R*)-preferencom, za aromatske epoksidge i  $\alpha,\alpha$ -disupstituirane epoksidge, a niska sa većinom jednostavnih terminalnih alifatskih epoksidge [21].

Otvaranje epoksidnog prstena sa cijanatom kao nukleofilom prvo daje odgovarajući izocijanat-cijanat koji prolazi brzu ciklizaciju što rezultira stvaranjem 2-oksazolidinona kao konačnog produkta [20].

Ove reakcije enzima mogu slijediti nukleofilnu supstituciju ( $S_N2$ ) poput kemijske reakcije, ali razlika u afinitetu enzima prema, na primjer, kloridu i cijanidu snažno sugerira da interakcija između enzima i ovih iona utječe na reakcije [22].

#### 2.4.2. Procesi u kojima se HDHH mogu koristiti kao katalizatori

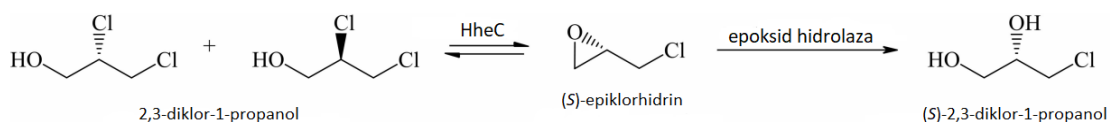
HDDH pokazuju neviđenu sposobnost da kataliziraju formiranje raznih kemijskih veza poput ugljik-ugljik, ugljik-klor, ugljik-dušik, ugljik-kisik i ugljik-brom veze. Mogu se primijeniti za sintezu optički aktivnih epoksidge,  $\beta$ -supstituiranih alkohola, uključujući i kiralne tercijarne alkohole [19].



**Slika 2.7.** Supstrati korišteni u dehalogenaciji i reakcijama otvaranja epoksidnog prstena kataliziranih s HDDH [23]

Važnost ovih enzima je u visokoj  $\beta$ -regioselektivnosti i (*R*)-enantioselektivnosti u reakcijama otvaranja nukleofilnog prstena. Prema već postojećoj literaturi, čini se da je HheC jedini enzim divljeg tipa koji pokazuje visoku enantioselektivnost, dok su drugi neselektivni ili umjereno enantioselektivni. Dostupnost (*S*)-selektivnih enzima je loša, ali očekuje se da će taj nedostatak uskoro biti svladan tehnikama proteinskog inženjeringa [19].

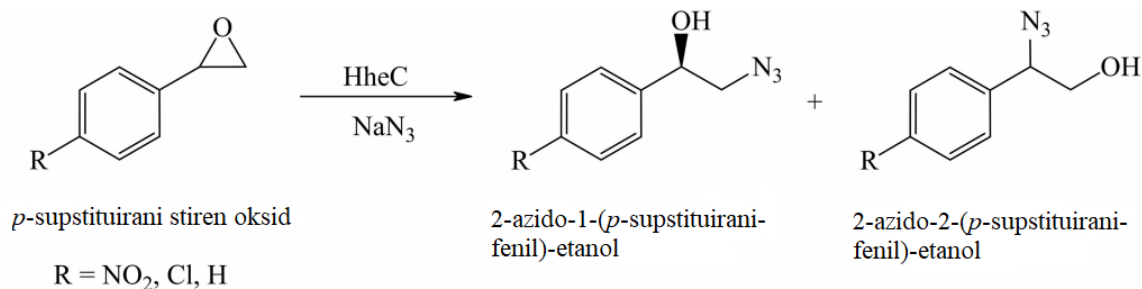
Kako su HHDH prvi put otkrivene u kontekstu enzima povezanih s razgradnjom epihalogenhidrina, to su spojevi koji se pojavljuju u mnogim studijama. O prvoj kinetičkoj rezoluciji za sintezu enantio čistih halogenhidrina i epoksida kataliziranu pomoću HheC (slika 2.8.) izvijestili su Lutje Spelberg i sur. Enzim je bio visoko enantioselektivan prema 2,3-diklor-propanolu i 2,3-dibrom-1-propanolu [19].



**Slika 2.8.** Konverzija 2,3-dikloropropanola uz HheC i epoksid hidrolazu [19]

U drugom radu, Lutje Spelberg i sur. izvijestili su o dinamičkoj kinetičkoj rezoluciji epihalogenhidrina u prisustvu azida kataliziranog pomoću HheC. Postupak je bio vrlo učinkovit u slučaju epibromhidrina kao supstrata. S druge strane, s epiklorhidrinom brzina otvaranja prstena azidom bila je veća od brzine racemizacije što je rezultiralo mješovitom kinetičkom i dinamičkom kinetičkom rezolucijom. Jin i koautori istraživali su sličan sustav kataliziran istim enzimom: prvu kinetičku rezoluciju *rac*-epiklorohidrina u prisutnosti nitrita. Oni su, u istim uvjetima, ispitivali azid, cijanid, klorid i nitrit kao nukleofile i ustanovili da je nitrit bolji od drugih nukleofila. Autori su dobili 41%-tno iskorištenje (*R*)-epiklorhidrina u 99%-tnom enantiomernom suvišku [19].

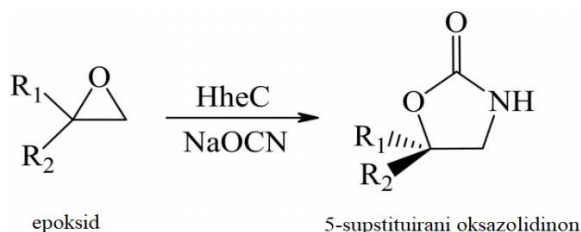
1,2-azidoalkoholi su prekursori 1,2-amino alkoholima i korisni međuprodukti u kemiji ugljikohidrata. Lutje Spelberg i sur. proučavali su transformaciju *p*-supstituiranih stiren oksida u reakciji koju je katalizirao HheC iz *A. radiobacter* AD1 s azidom kao nukleofilom (slika 2.9.). Utvrđeno je da je enzim visoko (*R*)-enantioselektivan i  $\beta$ -regioselektivan. Kinetička rezolucija rezultirala je visokim enantiomernim suviškom produkata: (*R*)-azidoalkohola i preostalog (*S*)-epoksida [19].



**Slika 2.9.** Kinetička rezolucija epoksida uz HheC [19]

Majerić Elenkov i sur. otkrili su vrlo visoku enantioselektivnost HheC u rezoluciji 2,2-disupstituiranih epoksida ( $E = 141\text{--}200$ ) i sintezi odgovarajućih  $\beta$ -hidroksinitrila. Ove reakcije omogućuju proizvodnju enantiočistih tercijarnih alkohola stvaranjem C-C veze. Različiti supstituenti ispitani su s azidom i cijanidom kao nukleofilima. Produkti dobiveni u ovim reakcijama su enantiočisti epoksidi,  $\beta$ -hidroksinitrili i  $\beta$ -azidoalkoholi koje je teško pripremiti drugim metodama. Zamjena vodika metilnim supstituentom na kiralnom središtu značajno je povećala enantioselektivnost ( $E > 200$ ) s cijanidom kao nukleofilom [19].

Objavljeno je i nekoliko radova na temu sinteze oksazolidinona djelovanjem HHDH. Prvi su objavili Majerić Elenkov i sur. i u njemu je niz od 12 epoksida ispitan sa cijanatom kao nukleofilom. Produkti su nastali vrlo brзом ciklizacijom epoksida u 2-oksazolidinone, koji su zanimljivi gradivni elementi u pripravi farmaceutskih međuprodukata budući da pripadaju klasi inhibitora sinteze proteina sa širokim antimikrobnim djelovanjem. Reakcijama (slika 2.10.) dobiveni su 5-supstituirani oksazolidinoni u 69–98%-tnom enantiomernom suvišku na preparativnoj skali uz HheC kao biokatalizator [19].



**Slika 2.10.** Sintaza oksazolidinona s cijanidom kao nukleofilom i katalizirana s HheC [19]

Nekoliko skupina znanstvenika istraživalo je mogućnost proizvodnje kiralnog epoksida ili srodnog kiralnog supstituiranog alkohola iz odgovarajućeg ketona, za razliku od kinetičke rezolucije u kojoj se polovica polaznog materijala pretvara u neželjeni produkt.

Seisser i sur. istraživali su kaskadnu reakciju konverzije  $\alpha$ -kloroaketonu u enantiočiste epoksidge. Enantioselektivne alkohol dehidrogenaze, odnosno *Rhodococcus ruber* ADH-‘A’ i *Lactobacillus brevis* ADH, korištene su kao katalizatori za redukciju ketona. Enzim HheB2, poznat po visokoj regioselektivnosti i niskoj enantioselektivnosti korišten je u drugom stupnju, odnosno u nastanku oba enantiomera iz odgovarajućeg epoksidge. Kako dehidrogenaze zahtijevaju regeneraciju koenzima, izopropanol je korišten kao ko-supstrat što je dodatno olakšalo topljivost supstrata. Korištene su cijele stanice *E. Coli* ekspresijom enzima. Rezultati kaskadne reakcije pokazuju da ima prostora za poboljšanje s obzirom na iskorištenje produkta i to posebno kod redukcije ketona koja je bila loša s *LbADH* [19].

Jin i sur. istraživali su pripravu (*R*)-epiklorhidrina iz 1,3-diklor-2-propanola. Uspostavili su dvostupanjsku reakciju s HheC i epoksid hidrolazom imobiliziranom na perlitu u odvojenim reaktorima. Cikloheksan je korišten kao suotapalo za sprječavanje obrnute reakcije nastalog epiklorhidrina i za smanjenje spontane hidrolize. Uvođenjem cikloheksana u sustav, iskorištenje je povećano s početnih 19,2% na 25,1%, što je značajan rezultat. Nakon završetka prvog, neselektivnog reakcijskog stupnja, reakcijska smjesa je prebačena u drugi reaktor. U drugom reaktoru se odvijao enantioselektivni stupanj, kataliziran epoksidnom hidrolazom i rezultirao je 99%-tnim enantioselektivnim suviškom (*R*)-epiklorhidrina pri 2,51 mM i iskorištenju od 34,3% [19].

#### 2.4.3. Primjena u industriji

U industriji se halogenhidrin-dehalogenaze primjenjuju za sintezu kiralnog epiklorhidrina. Epiklorhidrin se koristi kao međuprodukt u pripremi sintetičkih guma, epoksidnih smola, kemikalija za papir, kao polazni materijal u proizvodnji tenzida, ljepila, insekticida, poljoprivrednih kemikalija, premaza, ionsko izmjenjivačke smole, otapala, plastifikatora i farmaceutskih proizvoda. Također je gradivna jedinica biološki aktivnih spojeva poput beta-adrenalinskog blokatora (*S*)-atenolola i derivata aminokiselina (*R*)-karnitina [19].

Halogenhidrini se mogu smatrati izravnim prekursorima epoksidge. Zatvaranjem prstena enantiomerno čistog halogenhidrina općenito se dobiva enantiomerno čisti epoksid. Aromatični halogenhidrini, poput 2-klor-1-feniletanola, mogu se dobiti enantiomerno čisti mikrobnom redukcijom  $\alpha$ -haloacetofenona ili kinetičkom rezolucijom koristeći lipaze [24]. Optički aktivni epoksidge korisni su kiralni sintoni i važni gradivni elementi za kiralne farmaceutike i agrokemijske proizvode zbog njihove visoke reaktivnosti [25].

Nedavna istraživanja usredotočena su na biotehnološke primjene halogen-dehidrogenaza (HHDH), posebno u pogledu stereoselektivnih biotransformacija. U ranoj fazi, HHDH su korištene za kinetičko razdvajanje racemičnih halogenhidrina kako bi se dobio optički aktivni enantiomer. Kiralni epoksidi vrijedne su i izuzetno važne jedinice za sintezu enantiomerno čistih lijekova i poljoprivrednih kemikalija. Osim toga, kinetička rezolucija racemičnih epoksida pomoću HHDH još je jedan način dobivanja optički čistih izomera. Stereoselektivno otvaranje prstena epoksida katalizirano s HHDH naširoko se koristi u asimetričnoj sintezi enantimerno čistih  $\beta$ -supstituiranih alkohola, koji su važni gradivni elementi za brojne farmaceutske i biološki aktivne spojeve. Najuspješniji primjer je sinteza prekursora bočnog lanca statina, etil (*R*)-4-cijano-3-hidroksibutirata, kombiniranjem modificirane varijante HheC sa stereoselektivnom ketoreduktazom u različitim reakcijskim stupnjevima [23]. Ovo je važan prekursor u proizvodnji atorvastatina, lijeka za snižavanje kolesterola i sastojka Lipitora®, prvog lijeka s godišnjom prodajom većom od 10 milijardi američkih dolara [19].

Korištenje HHDH za sintezu etil (*R*)-4-cijano-3-hidroksibutanoata omogućilo je rad u uvjetima neutralnog pH i sobne temperature. Primjena biokatalize u ovom procesu značajno je smanjila broj nastalih nusproizvoda, otpada, upotrebu organskih otapala, kao i potrošnju energije i emisiju plinova čime je omogućena zelena sinteza. Spomenuti ekološki problemi posebno su izraženi u masovnoj industrijskoj proizvodnji finih kemikalija, a reakcija koju u tom procesu katalizira HHDH dobar je primjer savršene atomske ekonomije [19].



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Aparatura

##### 3.1.1. Tresilica

Svaki pripremljeni reaktor stavljen je na inkubaciju u tresilicu Eppendorf ThermoMixer C pri 25 °C i 1000 rpm tijekom cijelog trajanja eksperimenta (slika 3.1.).



*Slika 3.1.* Tresilica Eppendorf ThermoMixer C (Eppendorf, Njemačka)

##### 3.1.2. Homogenizator

Prije svake analize uzorak je homogeniziran u homogenizatoru Vortex V-1 plus proizvođača Biosan (slika 3.2.).



*Slika 3.2.* Homogenizator Vortex V-1 plus (Biosan, Latvija)

### 3.1.3. Centrifuga

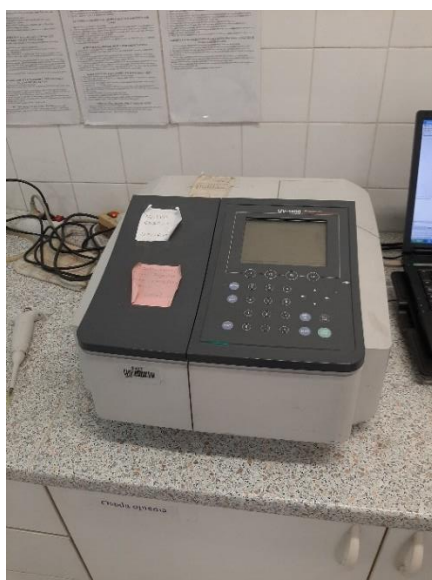
Uzorci su centrifugirani na centrifugi Universal 320/320R (slika 3.3.).



**Slika 3.3.** Centrifuga Universal 320/320R (Hettich, Njemačka)

### 3.1.4. Spektrofotometar

Određivanje aktivnosti enzima HheC provedeno je na UV-1800 spektrofotometru (slika 3.4.).



**Slika 3.4.** UV-Vis spektrofotometar UV-1800 (Shimadzu, Japan)

## 3.2. Provedba eksperimenta

### 3.2.1. Inkubacija enzima

Eksperimenti inkubacije enzima halogenhidrin – dehalogenaze (HheC) provodili su se na Eppendorf tresilici ThermoMixer C (Eppendorf, Njemačka) pri 25 °C i 1000 rpm. Za svaki od dvaju supstrata (*p*-fluorstiren oksid i *p*-trifluormetilstiren oksid), inkubacija se provodila pri koncentracijama od 2 mM, 5 mM, 10 mM i 20 mM (tablica 3.1.). Također, provodio se i nulti eksperiment kojim se željela ispitati aktivnost enzima HheC bez prisustva supstrata. Enzim se inkubirao tijekom 24 sata. Tijekom tog vremena uzeto je osam uzoraka. Uzorkovanje se vršilo odmah po dodatku enzima u reaktor (0 min), a zatim nakon otprilike 15 min, 30 min, 1 sata, 2 sata, 4 sata, 6 sati te 24 sata. Temeljna otopina epoksida je koncentracije 500 mM.

U Eppendorf epruvetu od 2 mL najprije se dodao dimetilsulfoksid (DMSO), zatim epoksid, odnosno supstrat koji ide, pa Tris – SO<sub>4</sub> pufer koncentracije 500 mM i pH 7 i na kraju enzim HheC. Dodatkom enzima započinje mjerenje vremena reakcije.

**Tablica 3.1.** Dodani volumeni kemikalija u svim reaktorima

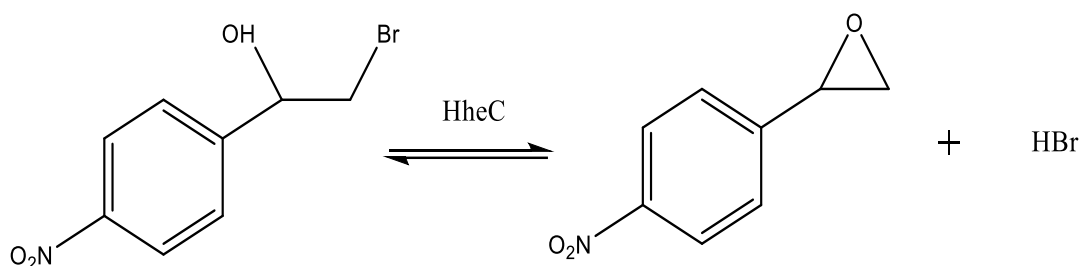
	Nulti eksperiment	2 mM	5 mM	10 mM	20 mM
V(reaktor) [μL]	1000	1000	1000	1000	1000
c(epoksid) [mM]	/	2	5	10	20
V(epoksid) [μL]	/	4	10	20	40
V(DMSO) [μL]	50	46	40	30	10
V <sub>E</sub> [μL]	400	400	400	400	400
V(pufer) [μL]	550	550	550	550	550

### 3.2.2. Centrifugiranje

Kada je vrijeme za uzorkovanje, u Amicon Ultra centrifugalni filter od 0,5 mL dodaje se 50 μL uzorka iz reaktora i 100 μL Tris – SO<sub>4</sub> pufera koncentracije 500 mM i pH 7. Uzorak zatim ide na pet minutno centrifugiranje u Centrifugu Universal 320/320R (Hettich, Njemačka) koje se provodi pri 4°C i 14 000 rpm.

### 3.2.3. Mjerenje aktivnosti enzima HheC – spektrofotometrijskim PNSHH testom

Nakon centrifugiranja provodi se mjerenje aktivnosti enzima HheC, spektrofotometrijskim PNSHH testom. Ova analitička metoda temelji se na razlici apsorbancije koja se mjeri pri između halogenhidrina 1-(*p*-nitrofenil)-2-brometanola (PNSHH) i epoksida *p*-nitrostiren oksida (PNSO) pri valnoj duljini  $\lambda = 310$  nm (slika 3.5.).



**Slika 3.5.** Reakcija dehalogenacije PNSHH u PNSO katalizirana enzimom HheC

Pripremi se temeljna otopina PNSHH koncentracije 25 mM u 100%-tnom DMSO. Ona je stabilna u hladnjaku na  $4^\circ\text{C}$ . U kvarcnu kivetu se dodaje 940  $\mu\text{L}$  Tris –  $\text{SO}_4$  pufera koncentracije 100 mM i pH 7,5 i 10  $\mu\text{L}$  temeljne otopine PNSHH tako da koncentracija PNSHH u kiveti bude 250  $\mu\text{M}$ .

Nakon razdvajanja supstrata i enzima centrifugiranjem, zaostali enzimi na filtru se homogeniziraju na homogenizatoru Vortex V-1 plus (Biosan, Latvija). Za reakciju na spektrofotometru uzima se 50  $\mu\text{L}$  uzorka enzima (ili više kada se primijeti da je nagib linearnog dijela krivulje sve manji zbog manje aktivnosti enzima s vremenom, ali je potrebno prilagoditi količinu dodanog pufera u kvarcnu kivetu tako da ukupni  $V_r$  uvijek bude 1000  $\mu\text{L}$ ). Uzorak se uzima pipetom direktno iz filtera u kvarcnu kivetu i započinje mjerenje.

### 3.3. Računanje volumne i specifične aktivnosti enzima HheC

U ovom testu mjerena je ovisnost apsorbancije (Abs.) o vremenu ( $t$ ). Svako mjerenje je trajalo 300 s, a potreban podatak bio je nagib linearnog dijela krivulje,  $\frac{\Delta A}{t}$ . Primjer jedne krivulje dan je u prilogu 8. na slici 8.1.

Nakon dobivenog nagiba krivulje, prvo se računa volumna aktivnost enzima,  $V.A.$  prema jednadžbi 3.1. pomoću parametara u tablici 3.2.  $V_r$  je volumen uzorka u kiveti koji iznosi 1 mL,  $\epsilon$  je ekstinkcijski koeficijent koji za *p*-fluorstiren oksid iznosi  $4,29 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , a za *p*-trifluormetilstiren oksid  $3,05 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $d$  je širina kivete (put svjetlosti kroz kivetu)

i ona iznosi 1 cm,  $V_E$  je volumen sirovog enzimskog ekstrakta i iznosi 50 ili 100  $\mu\text{L}$  (ovisno o koncentraciji proteina u uzorku),  $\frac{\Delta A}{t}$  je promjena apsorbancije u vremenu.

$$V.A. = \frac{V_r}{\epsilon d V_E} \frac{\Delta A}{t} \quad (3.1.)$$

**Tablica 3.2.** Parametri za izračun volumne aktivnosti enzima

$V_r$ [ $\mu\text{L}$ ]	1000
$\epsilon_1$ [ $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ]	4,289
$\epsilon_2$ [ $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ ]	3,05
$d$ [cm]	1
$V_E$ [ $\mu\text{L}$ ]	50 ili 100

Specifična aktivnost enzima izračunata je prema jednadžbi 3.2. Volumna aktivnost enzima dijeli se s masenom koncentracijom enzima,  $\gamma_{\text{Hbc}}$  koja iznosi 2  $\text{mg mL}^{-1}$ .

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

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

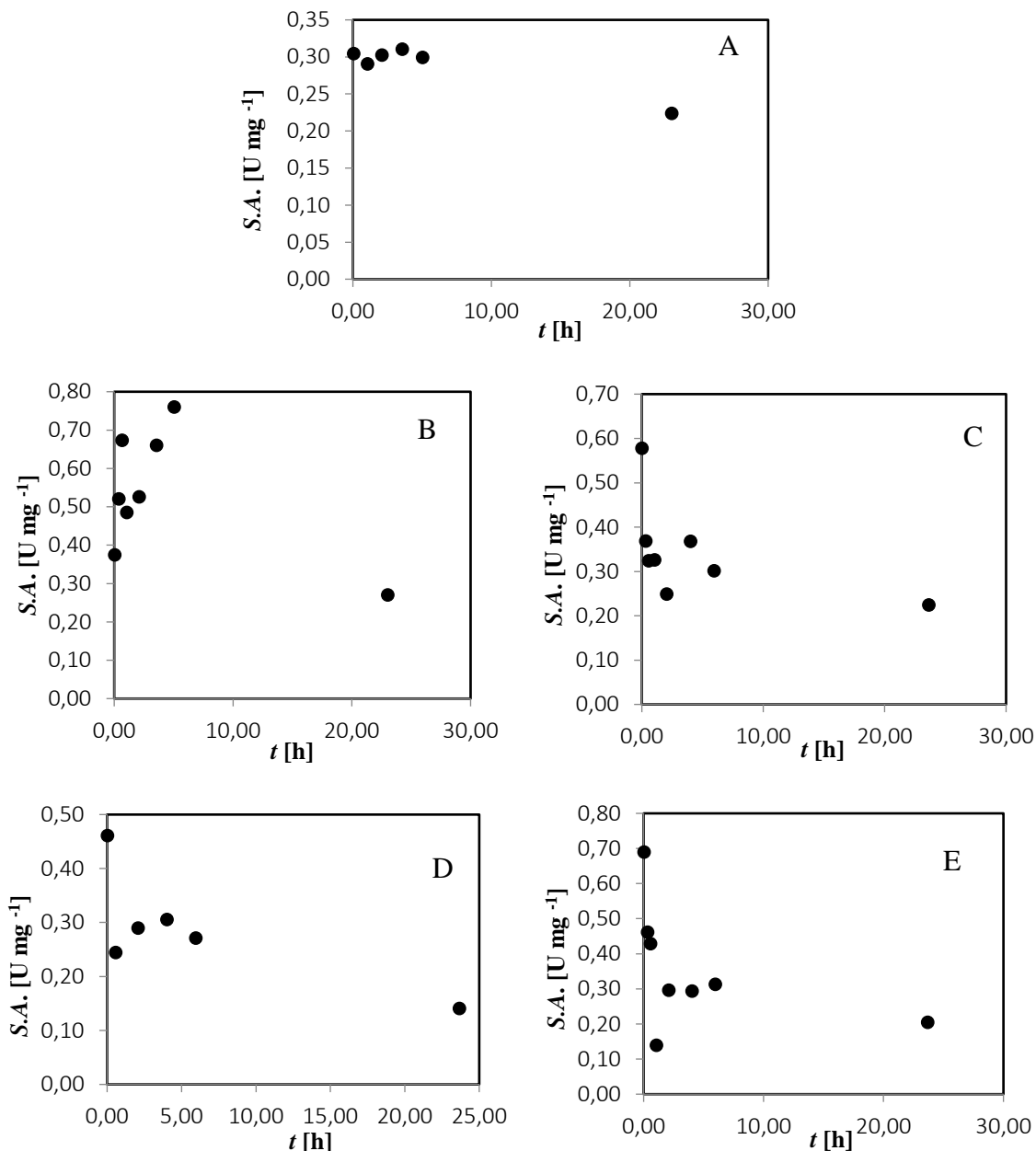
U ovom radu provedeno je ispitivanje stabilnosti enzima halogenhidrin-dehalogenaze (HheC) u prisustvu dvaju supstrata: *p*-fluorstiren oksida i *p*-trifluormetilstiren oksida. Utjecaj tih supstrata na aktivnost enzima ispitana je spektrofotometrijskim PNSHH testom.

### 4.1. Aktivnost enzima HheC inkubiranog *p*-fluorstiren oksidom

Nakon izračunatih specifičnih aktivnosti enzima HheC uz *p*-fluorstiren oksid slijedi usporedba prema koncentracijama supstrata (tablica 4.1.) i grafički prikazi promjene specifične aktivnosti u vremenu (slika 4.1.).

**Tablica 4.1.** Vrijednosti specifične aktivnosti enzima HheC za različite koncentracije supstrata (*p*-fluorstiren oksida) tijekom 24 sata

Točka	S.A. [U mg <sup>-1</sup> ]				
	Nulti eksperiment	2 mM	5 mM	10 mM	20 mM
0	0,30	0,38	0,58	0,46	0,69
1	/	0,52	0,37	/	0,46
2	/	0,67	0,32	0,24	0,43
3	0,29	0,49	0,33	/	0,14
4	0,30	0,53	0,25	0,29	0,30
5	0,31	0,66	0,37	0,31	0,29
6	0,30	0,76	0,30	0,27	0,31
7	0,22	0,27	0,22	0,14	0,20



**Slika 4.1.** Promjena specifične aktivnosti enzima HheC s vremenom **A.** bez utjecaja supstrata, **B.** u prisustvu *p*-fluorstiren oksida koncentracije 2 mM, **C.** 5 mM **D.** 10 mM **E.** 20 mM

Enzim HheC pokazuje malen pad specifične aktivnosti s vremenom. Na početku iznosi 0,30 U mg<sup>-1</sup>, a na kraju mjerenja 0,22 U mg<sup>-1</sup> (slika 4.1.a). Supstrat *p*-fluorstiren oksid koncentracije 2 mM (slika 4.1.b) ima određen utjecaj na smanjenje aktivnosti, ali to opet nije velik pad. Povećanjem koncentracije supstrata na 5 mM, 10 mM i 20 mM, specifična aktivnost je izrazito smanjena i to pogotovo u prvih par sati mjerenja. Kasnije je taj pad polagan. Najveća koncentracija supstrata je dala i najveći pad aktivnosti, od 0,69 U mg<sup>-1</sup> do

0,20 U mg<sup>-1</sup> (slika 4.1.e). Iz dobivenih rezultata je također vidljivo da je specifična aktivnost enzima na samom početku reakcije u prisustvu supstrata veća nego bez njegovog prisustva. Nakon 24 sati u svim reaktorima je bila niska specifična aktivnost HheC. Posebno u onom u kojemu je bila koncentracija epoksida 10 mM (0,14 U mg<sup>-1</sup>) (slika 4.1.d).

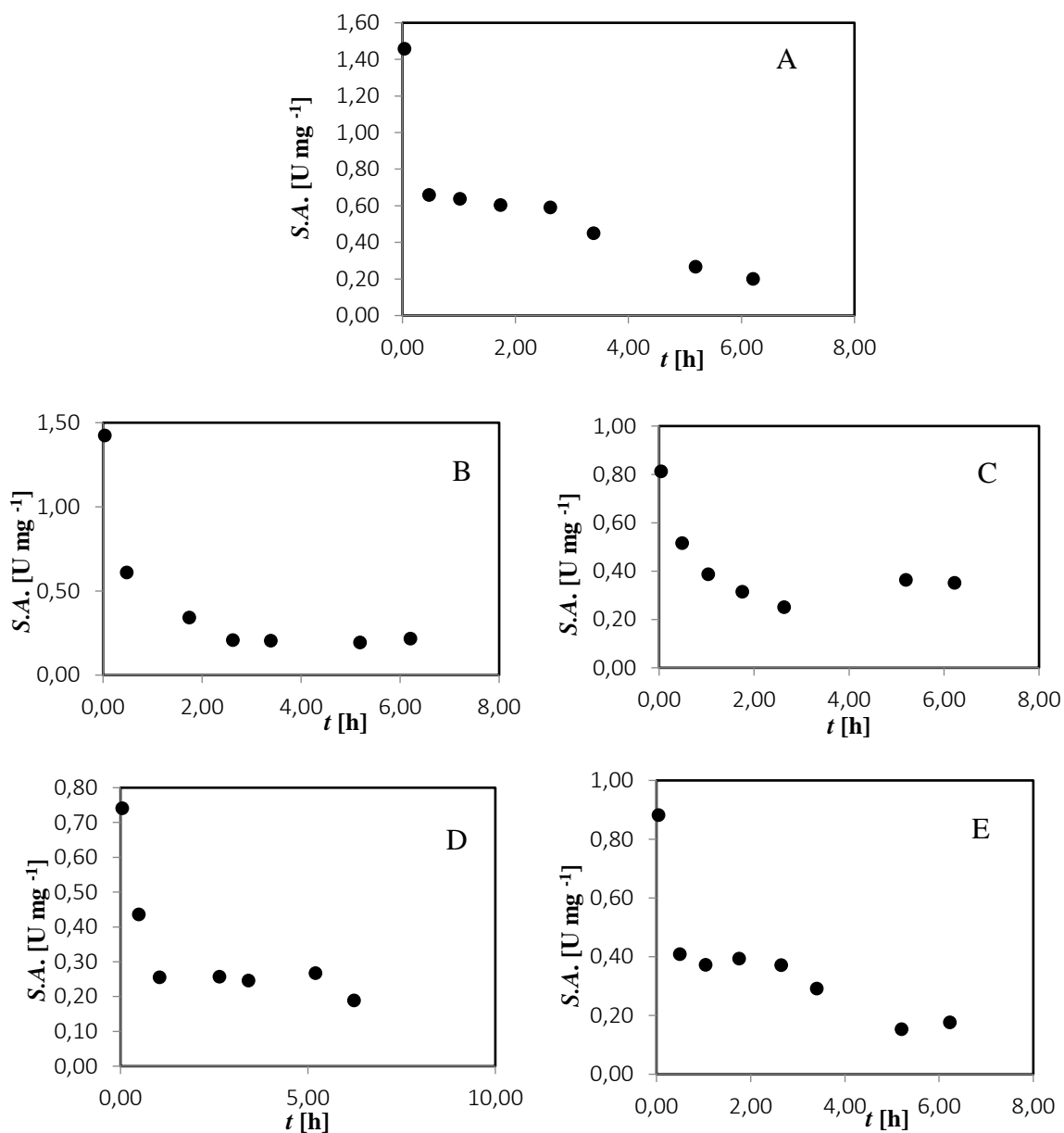
#### 4.2. Aktivnost enzima HheC inkubiranog *p*-trifluormetilstiren oksidom

Nakon izračunatih specifičnih aktivnosti enzima HheC uz *p*-trifluormetilstiren oksid slijedi usporedba prema koncentracijama supstrata (tablica 4.2.) i grafički prikazi promjene specifične aktivnosti u vremenu (slika 4.2.).

**Tablica 4.2.** Vrijednosti specifične aktivnosti enzima HheC za različite koncentracije supstrata (*p*-trifluormetilstiren oksida) tijekom 6 sati

Točka	S.A. [U mg <sup>-1</sup> ]				
	Nulti eksperiment	2 mM	5 mM	10 mM	20 mM
0	1,46	1,43	0,81	0,74	0,88
1	0,66	0,61	0,52	0,44	0,41
2	0,64	/	0,39	0,26	0,37
3	0,60	0,34	0,31	/	0,39
4	0,59	0,21	0,25	0,26	0,37
5	0,45	0,21	/	0,25	0,29
6	0,27	0,20	0,36	0,27	0,15
7	0,20	0,22	0,35	0,19	0,18





**Slika 4.2.** Promjena specifične aktivnosti enzima HheC s vremenom **A.** bez utjecaja supstrata, **B.** u prisustvu *p*-trifluorometilstiren oksida koncentracije 2 mM, **C.** 5 mM **D.** 10 mM **E.** 20 mM

U ovom dijelu eksperimenta sam enzim HheC pokazuje mnogo izraženiji pad specifične aktivnosti s vremenom. Velik pad je i kada je inkubiran najmanjom koncentracijom supstrata od 2 mM. Pri većim koncentracijama supstrata primjećuje se značajno manja specifična aktivnost na samom početku reakcije (~1,50 U mg<sup>-1</sup> naspram ~ 0,80 U mg<sup>-1</sup>). Samim time pad aktivnosti nije toliko izražen. Nakon otprilike 6 sati reakcije u svim reaktorima specifična aktivnost enzima pala je na ~ 0,20 U mg<sup>-1</sup>, osim u reaktoru s 5 mM koncentracijom epoksida gdje je ona viša i iznosi 0,35 U mg<sup>-1</sup>.

### 4.3. Usporedba *p*-fluorstiren oksida i *p*-trifluormetilstiren oksida s drugim supstratima

U odnosu na supstrate kao što su 1,3-dibrom-2-propanol, 1,3-dikloro-2-propanol, (*R*, *S*)-2-brom-1-feniletanol i (*R*, *S*)-2,3-dibrom-2-propanol, izmjerena specifična aktivnost prema *p*-fluorstiren oksidu je niža dok je prema *p*-trifluormetilstiren oksidu slična kao prema (*R*, *S*)-2,3-dibrom-2-propanolu.

Najveća aktivnost izmjerena je kod dehalogenizacije 1,3-dibrom-2-propanola (17,2 U mg<sup>-1</sup>), dok su dobre specifične aktivnosti tijekom reakcije pokazali i 1,3-dikloro-2-propanol, (*R*, *S*)-2-brom-1-feniletanol i (*R*, *S*)-2,3-dibrom-2-propanol, dosežući 48,8%, 12,2% i 6,9% relativne aktivnosti [21].

Ipak, kada se usporede rezultati sa supstratima koji također imaju aromatski prsten, (*R*, *S*)-2-klor-1-feniletanolom i (*R*, *S*)-1-kloro-3-fenoksi-2-propanolom, enzim HheC prema oba ispitivana supstrata u ovom radu pokazuje veću aktivnost.

Specifične aktivnosti prema aromatskim supstratima (*R*, *S*)-2-klor-1-feniletanolu (0,02 U mg<sup>-1</sup>) i (*R*, *S*)-1-klor-3-fenoksi-2-propanolu (0,37 U mg<sup>-1</sup>) općenito su niske. Jedan od razloga mogle bi biti steričke smetnje za koje je uočeno da značajno utječu na reaktivnost [21].

## 5. ZAKLJUČAK

U ovome radu provedena je inkubacija enzima halogenhidrin-dehalogenaze tipa C (HheC) supstratima i spektrofotometrijski PNSHH test kako bi se ispitala aktivnost enzima u prisustvu supstrata različitih koncentracija. Ono što se mjerilo jest razlika apsorbancije između molekula PNSHH i PNSO pošto je reakcija dehalogenizacije između njih katalizirana ovim enzimom. Dobivena je promjena apsorbancije s vremenom,  $dA/dt$ . Uvrštavanjem tako dobivenih vrijednosti i drugih parametara u jednadžbe za volumnu aktivnost odnosno specifičnu aktivnost moglo se zaključiti kakva je aktivnost enzima HheC u takvim uvjetima.

Enzim HheC pokazuje mnogo nižu specifičnu aktivnost u prisustvu supstrata *p*-fluorstiren oksida i *p*-trifluormetilstiren oksida nego u prisustvu na primjer, 1,3-dibrom-2-propanola ili 1,3-dikloro-2-propanola što se može vidjeti iz literaturnih podataka. Također, ako se ova dva supstrata uspoređuju sa drugim aromatskim supstratima kao što su (*R*, *S*)-2-klor-1-feniletanol ili (*R*, *S*)-1-klor-3-fenoksi-2-propanol, može se vidjeti da je aktivnost enzima HheC prema *p*-fluorstiren oksidu i *p*-trifluormetilstiren oksidu poprilično veća.

Specifična aktivnost enzima pada s vremenom, a najviše na samom početku reakcije. Porast koncentracije supstrata imao je utjecaj na smanjenje aktivnosti čime je enzim pokazao manju stabilnost u njihovom prisustvu.

## 6. POPIS SIMBOLA

*Abs*, *A* - apsorbancija [-]

$\frac{\Delta A}{t}$  - promjena apsorbancije u vremenu [ $\text{min}^{-1}$ ]

$\gamma$  - masena koncentracija [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]

*d* - udaljenosti kroz koju prolazi svjetlost u kiveti [cm]

DMSO - dimetilsulfoksid

$\epsilon$  - ekstinkcijski koeficijent [ $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

E - enzim

ES - kompleks enzim-supstrat

FAD<sup>+</sup> - flavin adenin dinukleotid

FMN - flavin mononukleotid

HHDH - halogenhidrin-dehalogenaza

HheC - C-tip halogenhidrin-dehalogenaze

$k_{cat}$  - katalitička konstanta [ $\text{s}^{-1}$ ]

$K_m$  - Michaelis-Menten konstanta [M]

NAD<sup>+</sup> - nikotinamid adenin dinukleotid

NADP<sup>+</sup> - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

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

PNSO - *p*-nitrostiren oksid

*rpm* - broj okretaja u minuti [ $\text{min}^{-1}$ ]

S - supstrat

S.A. - specifična aktivnost enzima [ $\text{U mg}^{-1}$ ]

*v* - brzina reakcije [ $\text{M s}^{-1}$ ]

$v_{max}$  - maksimalna brzina reakcije [ $\text{M s}^{-1}$ ]

$V.A.$  - volumna aktivnost enzima [ $U\ mL^{-1}$ ]

$V_E$  - volumen sirovog enzimskog ekstrakta [ $\mu L$ ]

$V_r$  - volumen uzorka u kivetu [ $mL$ ]

## 7. LITERATURA

- [1] Bhatia, S., Introduction to Pharmaceutical Biotechnology vol. 2, IOP Publishing, Bristol, 2018., str. 1-29
- [2] Koschland Jr., D. E., Correlation of Structure and Function in Enzyme Action, *Science*, 142 (1963) 1533
- [3] Robinson, P. K., Enzymes: principles and biotechnological applications, *Essays Biochem*, 59 (2015) 1-41
- [4] Christy, P. B., Kavitha, S., Role of enzymes, *IJSRP*, 5 (2014) 1181-1183
- [5] Nature Education, Principles of Biology, [https://dls.ym.edu.tw/course/hb/doc/lecture4-\(11\)%2011-Enzymes.pdf](https://dls.ym.edu.tw/course/hb/doc/lecture4-(11)%2011-Enzymes.pdf) (pristup 9. kolovoza 2021.)
- [6] Gutteridge, A., Understanding the Relationship Between Enzyme Structure and Catalysis, Darwin College, Cambridge, 2005., str. 14-17
- [7] Martínez Cuesta, S., Rahman, S. A, Furnham, N., Thornton, J. M.: Biophysical Perspective: The Classification and Evolution of Enzyme Function, *Biophys. J.*, 109 (2015) 1082-1086
- [8] Britt, B. M., Understanding Enzyme Structure and Function in Terms of the Shifting Specificity Model, *J. Biochem. Mol. Biol.*, 37 (2004) 394-401
- [9] A. Illanes (ed.): Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications, Springer Science + Business Media B.V., New York, 2008., str. 1, 16-29
- [10] Miesfeld, R. L., McEvoy, M. M.: Biochemistry, W. W. Norton & Company, New York, 2017., str. 351-355
- [11] Tuition Tube – The Best Online Education Website, <https://tuitiontube.com/wp-content/uploads/2016/10/Enzyme-Inhibitors-and-Classification-of-Enzyme-Inhibition.png> (pristup 11. kolovoza 2021.)
- [12] Chance, B.: The Kinetics of Enzyme-Substrate Compound of Peroxidase, University of Cambridge, Cambridge, England, 1943., str. 553
- [13] Rogers, A., Gibon, Y., Enzyme Kinetics: Theory and Practice, u: Schwender, J., Plant Metabolic Networks, Springer Science + Business Media, New York, 2009., str. 73-103

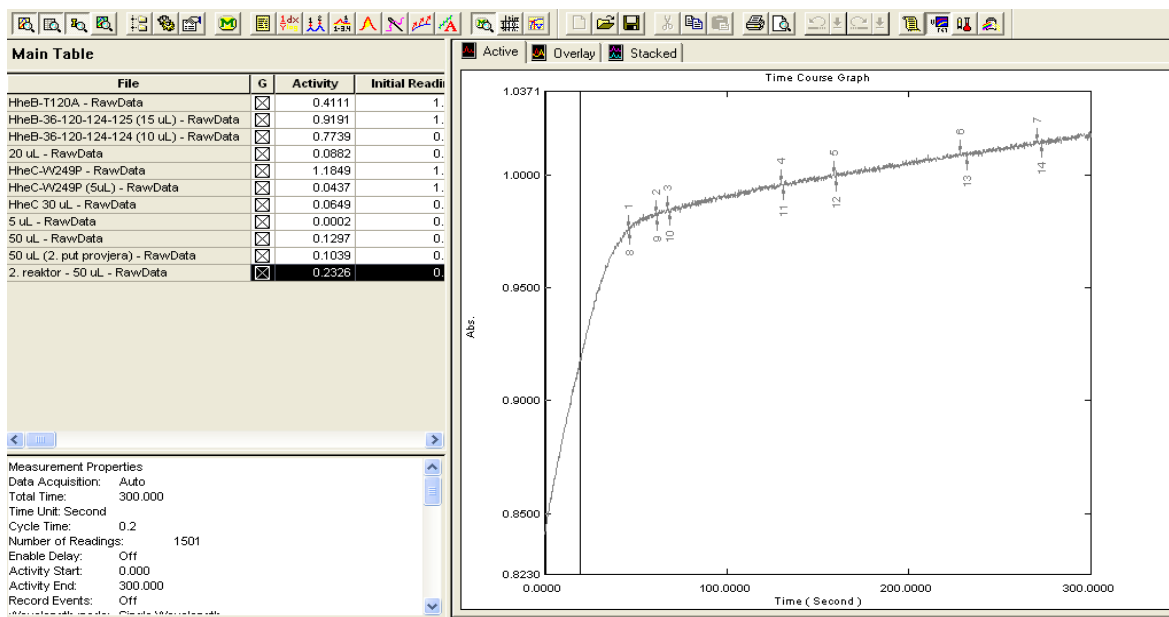
- [14] Enzyme Assays, Substrate Specificities Kinetic Parameters: Measurement of Enzyme Activities, [https://media.springernature.com/lw785/springer-static/image/chp%3A10.1007%2F978-3-540-77587-4\\_327/MediaObjects/978-3-540-77587-4\\_327\\_Fig2\\_HTML.jpg](https://media.springernature.com/lw785/springer-static/image/chp%3A10.1007%2F978-3-540-77587-4_327/MediaObjects/978-3-540-77587-4_327_Fig2_HTML.jpg) (pristup 17. kolovoza 2021.)
- [15] Lutje Spelberg, J. H., Tang L., van Gelder, M., Kellogg, R. M., Janssen, D. B.: Explration of the biocatalytic potential of a halohydrin dehalogenase using chromogenic substrates, *Tetrahedron: Asymmetry*, 13 (2002) 1083-1089
- [16] You, Z., Liu, Z., Zheng, Y.: Chemical and enzymatic approaches to the synthesis of optically pure ethyl (R)-4-cyano-3-hydroxybutanoate, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98 (2014) 11-21
- [17] Drauz, K. (ed.), H. Gröger (ed.), O. May (ed.): Enzyme Catalysis in Organic Synthesis vol.1, Wiley, Hoboken, 2002., str. 363-387, 408-411
- [18] Hasnaoui-Dijoux, G., Majeric Elenkov, M., Lutje Spelberg, J. H., Hauer, B. & Janssen, D. B.: Catalytic promiscuity of halohydrin dehalogenase and its application in enantioselective epoxide ring opening, *ChemBioChem*, 9 (2008) 1048–1051
- [19] Findrik Blažević, Z., Milčić, N., Sudar, M., Majerić Elenkov, M.: Halohydrin Dehalogenases and Their Potential in Industrial Application – A Viewpoint of Enzyme Reaction Engineering, *Adv. Synth. Catal.*, 362 (2020), 1-24
- [20] Schallmey, A., Schallmey, M.: Recent advances on halohydrin dehalogenases - from enzyme identification to novel biocatalytic applications, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 100 (2016) 7827-7839
- [21] Janssen, D. B., Majerić-Elenkov, M., Hasnaoui, G., Hauert, B., Lutje Spelberg, J.H.: Enantioselective formation and ring-opening of epoxides catalysed by halohydrin dehalogenases, *Biochem. Soc. Trans.*, 34 (2006) 291-295
- [22] Nakamura, T., Nagasawa, T., Yu, Watanabe, F., I., Yamada, H.: A new catalytic function of halohydrin hydrogen-halide-lyase, synthesis of  $\beta$ -hydroxinitriles from epoxides and cyanide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180 (1991) 124-130
- [23] F. Xue, X. Ya, Y. Xiu, Q. Tong, Y. Wang, X. Zhu, H. Huang: Exploring the Biocatalytic Scope of a Novel Enantioselective Halohydrin Dehalogenase from an Alphaproteobacterium, *Catal. Lett.*, 149 (2019) 629-637

[24] Lutje Spelberg, J. H., van Hylckama Vlieg, J. E. T., Bosma, T., Kellogg, R. M., Janssen, D. B.: A tandem enzyme reaction to produce optically active halohydrins, epoxides and diols, *Tetrahedron: Asymmetry*, 10 (1999) 2863-2870

[25] Jin, H., Hu, Z., Liu, Z., Zheng, Y.: Nitrite-mediated synthesis of chiral Applied Biochemistry epichlorohydrin using halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 59 (2012) 170-177



## 8. PRILOZI



**Slika 8.1.** Primjer jedne od dobivenih spektrofotometrijskih krivulja i očitavanje vrijednosti aktivnosti/nagiba linearnog dijela krivulje,  $\frac{\Delta A}{t}$

