

Evaluacija nitrilaza kao biokatalizatora za sintezu (R)-4-kloro-3-hidroksimaslačne kiseline

Antolović, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:769393>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ EKOINŽENJERSTVO

DIPLOMSKI RAD

Ana Antolović

Zagreb, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ EKOINŽENJERSTVO

Ana Antolović

EVALUACIJA NITRILAZA KAO BOKATALIZATORA ZA
SINTEZU (R)-4-KLORO-3-HIDROKSIMASLAČNE KISELINE

DIPLOMSKI RAD

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

Zagreb, rujan 2022.

SAŽETAK

Enzimi nitrilaze kataliziraju reakcije hidrolize nitrila u karboksilne kiseline i amonijak, bez stvaranja slobodnih amidnih međuprodukata. Iz tog razloga nitrilaza se može koristiti kao biokatalizator u reakcijama pretvorbe (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila (KHB) u (*R*)-4-klor-3-hidroksibutansku kiselinu, pri čemu dolazi do spontane ciklizacije produkta u (*R*)-3-hidroksi- γ -butirolakton (HBL). HBL se koristi u sintezi različitih polimera, otapala i farmaceutika kao kiralni građevni blok. Enzimski katalizirani procesi sve se češće primjenjuju za sintezu HBL-a jer koriste blage reakcijske uvjete, postižu visoku selektivnost te mogu pružiti ekonomski isplativ postupak sinteze ove vrijedne kemikalije. Brojni, već postojeći kemijski putevi sinteze HBL-a, pokušavaju se što manje koristiti jer ih većina ima nedostatke poput skupih ili opasnih reaktanata, intenzivnih procesnih uvjeta, te niskih iskorištenja i selektivnosti, što uzrokuje poskupljenje procesa izdvajanja produkta.

U ovom radu provedena je evaluacija 24 nitrilaze u reakciji sinteze HBL-a. Tijekom ispitivanja korišteni su isti početni uvjeti, koncentracija supstrata (KHB) i masena koncentracija nitrilaza te je reakcija praćena 6 sati. Enzim s najvećim iskorištenjem na produktu izabran je za sljedeći korak, kinetičko istraživanje. Određeni su kinetički parametri, nitrilazom katalizirane sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutanske kiseline iz (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila, iz kojih je razvijen matematički model. Sastoji se od kinetičkog modela i bilanci tvari u reaktoru. Utvrđeno je da enzim ima nizak afinitet prema supstratu te da reakcija prati Michaelis-Menteničinu kinetiku uz inhibicijski učinak supstrata i produkta.

Model je uspješno validiran provedbom reakcije u šest različitih kotlastih reaktora s različitim početnim uvjetima u reaktoru. Uzorci reakcijske smjese su analizirani na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti i plinskom kromatografu. Iz navedenih eksperimenata procijenjena je konstanta deaktivacije te je zaključeno da početni uvjeti u reaktoru utječu na stabilnost enzima.

ABSTRACT

Nitrilases catalyze nitrile hydrolysis reactions to carboxylic acids and ammonia, without the formation of free amide intermediates. For this reason, nitrilases can be used as a biocatalyst in conversion reactions (*R*)-4-chlorine-3-hydroxybutyronitrile (KHB) into (*R*)-4-chlorine-3-hydroxybutane acid, where spontaneous cyclizing of the product occurs in (*R*)-3-hydroxy- γ -butyrolactone (HBL). HBL is used in the synthesis of various polymers, solvents and pharmaceuticals as a chiral building block. Enzyme catalyzed processes are increasingly used for the synthesis of HBL because of the mild reaction conditions, high selectivity and can provide an economically viable synthesis process for this valuable chemical. While numerous, already existing chemical pathways of HBL synthesis are attempted to be used as little as possible because most of them have defects such as expensive or dangerous reactants, intense process conditions, and low utilization and selectivity, which causes the product extraction process to increase.

In this work, a panel of 24 nitrilases was evaluated. During the study, the same initial conditions were used, the concentration of the substrate (KHB) and the mass concentration of nitrilase, while the reaction was monitored for 6 hours. The enzyme with the highest obtained product yield was chosen for the next step, i.e., kinetic research. Kinetic parameters of nitrilase catalyzed synthesis (*R*)-4-chlorine-3-hydroxybutanic acid from (*R*)-4-chlorine-3-hydroxybutyronitrile were determined, from which the mathematical model was developed. It consists of a kinetic model and a balance of substances in the reactor. It was found that the enzyme has a low affinity for the substrate and that the reaction accompanies Michaelis-Menten's kinetics and the inhibition effect of the substrate and the product.

The model was successfully validated by the implementation of the reaction in six different batch reactors with different initial conditions in the reactor. Samples of the reaction mixture were analyzed on a high-efficiency liquid chromatograph and a gas chromatograph. From these experiments, the deactivation constant was evaluated and it was concluded that the initial conditions in the reactor affect the stability of the enzyme.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Enzimi	2
2.1.1. Faze savijanja strukture proteina	2
2.1.2. Nomenklatura i klasifikacija enzima	3
2.1.3. Djelovanje enzima	4
2.1.4. Biokataliza	6
2.1.5. Nitrilaza	8
2.2. Optički čiste tvari.....	10
2.2.1. Kiralnost.....	10
2.2.3. 3-Hidroksi- γ -butirolakton (3HBL).....	11
2.3. Modeliranje biokatalitičkih reakcija	12
2.3.1. Kinetički modeli enzimskih reakcija.....	13
2.3.2. Model kotlastog reaktora	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. Aparatura.....	17
3.1.1. Reakcijski sustav	17
3.1.2. Plinski kromatograf.....	18
3.1.3. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti	19
3.1.4. Ostala aparatura	20
3.2. Analitičke metode	21
3.2.1. Evaluacija enzima	21
3.2.2. Priprema i analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti	22
3.2.3. Priprema i analiza uzoraka plinskom kromatografijom.....	23
3.2.4. Kinetička ispitivanja	24
3.2.5. Provedba reakcije u kotlastom reaktoru.....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. Rezultat evaluacije enzima	30
4.2. Rezultati kinetičkih ispitivanja	30
4.2.1. Rezultat testa količine enzima.....	30
4.2.2. Kinetika reakcije	31
4.3. Sinteza (R)-4-klor-3-hidroksibutanske kiseline u kotlastom reaktoru.....	34
5. ZAKLJUČAK.....	40
6. LITERATURA.....	41
7. PRILOZI.....	47

1. UVOD

Pojam biokataliza odnosi se na uporabu enzima, kako kao pročišćenih proteina, tako i kao cijelih stanica, za kataliziranje reakcije prtvorbe supstrata u željeni produkt, a trenutno je popularna tema u sintetičkim istraživanjima.¹ Od 1858. godine, kada je Louis Pasteur iznio dokaze da su sve fermentacije uzrokovane mikroorganizmima i da specifični mikroorganizmi uzrokuju specifične vrste fermentacije,² enzimi su široko proučavani i iskorištavani za kataliziranje organskih kemijskih transformacija. Velik interes za biokatalitičke primjene počinje u drugoj polovici 20. stoljeća, motiviran potrebom za zelenijim i održivijim kemijskim procesima.³

Biokataliza je počela dobivati značajnu pozornost kemijske industrije, zahvaljujući zelenijim i održivijim značajkama, koje ispunjavaju 10 od 12 načela zelene kemije.^{4,5} Tijekom tisuća godina evolucije, priroda je opremila stanice visoko učinkovitim i iznimno selektivnim katalitičkim sustavima za promicanje sinteze svake vrste prirodnog proizvoda uz smanjenje stvaranja otpada. Štoviše, otkriveno je i da "prirodni" enzimi kataliziraju "ne-prirodne" sintetičke reakcije i sposobni su povećati svoju stabilnost izravnom evolucijom kako bi se bolje prilagodili "ne-prirodnim" uvjetima reakcije.⁶ Ta veća selektivnost dovodi do jednostavnijih sintetičkih putova s minimalnim brojem koraka, što rezultira smanjenjem otpada.⁷ Osim toga, enzimi su biorazgradivi spojevi (proteini) proizvedeni iz obnovljivih izvora kao što su biljke ili mikroorganizmi, i djeluju pri blagim uvjetima, kao što su relativno niske temperature, atmosferski tlak i u netoksičnim, jeftinim i lako dostupnim otapalima, kao što je voda.^{8,9}

Navedene koristi pridonijele su industrijskoj uporabi biokatalizatora za sintezu komercijalno zanimljivih spojeva kao što su farmaceutski proizvodi ili optički čiste kemikalije¹⁰, s ciljem zadovoljavanja ekonomskih zahtjeva uz poštovanje zahtjeva zelene kemije. Nadalje, suvremeni napredak u biotehnologiji i tehnikama imobilizacije kao i nedavni razvoj proteinskog inženjerstva i izravne evolucije, pomogli su poboljšati korištenje biokatalize u sintezi omogućavanjem jeftinije proizvodnje enzima i omogućavanjem pristupa velikom broju svestranih biokatalizatora.^{11,12}

2. OPĆI DIO

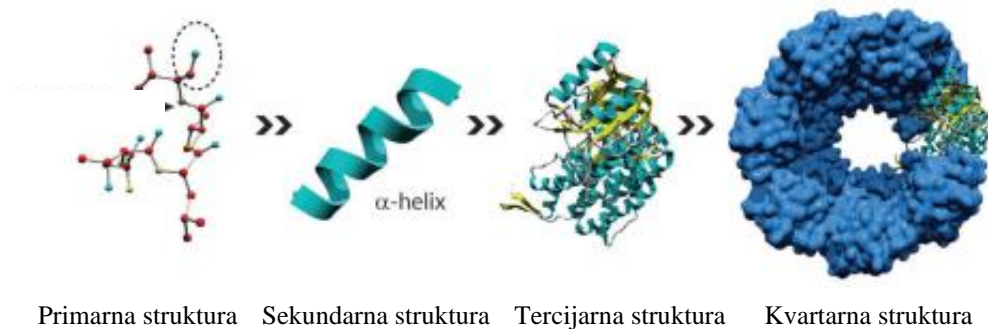
2.1. Enzimi

Kataliza u biološkim sustavima prvi puta spominje se ranih 1800.-ih. Godine 1837. Berzelius je dokumentirao katalitičku prirodu fermentacije. 1850.-ih godina Louis Pasteur je izvijestio da je fermentacija proces koji pokreću živi organizmi. U tom radu objavljeno je da je fermentacija šećera u alkohol putem kvasca katalizirana fermentima. Ti su fermenti kasnije nazvani enzimima.¹³ Enzimi su složene proteinske molekule proizvedene u stanicama živih organizama.¹⁴ Enzimi, često zvani biokatalizatori, su neizostavne komponente u svim živim organizmima jer brzo, selektivno i učinkovito kataliziraju kemijske reakcije potrebne za njihov opstanak. Po svom kemijskom sastavu oni su proteini, iako u manjem postotku postoje i kao ribonukelinske kiseline zvane ribozimi.¹⁵ Stanice imaju sposobnost učinkovitog korištenja biokatalizatora, s nevjerojatnom katalitičkom moći i visokom razinom specifičnosti za supstrat, što ih čini pogodnima za biološke reakcije. Oni su ključni za stanični metabolizam. Svaka kemijska reakcija koja se odvija u biljkama, mikroorganizmima ili životinjama odvija se mjerljivom brzinom kao izravan rezultat enzimske katalize.¹⁶ Većina karakteristika enzima kao katalizatora proizlazi iz njihove molekularne strukture. Enzimi su proteini sastavljeni od niza aminokiselinskih ostataka u rasponu od 100 pa sve do nekoliko stotina.¹⁷ Proteini su najsvestraniji predstavnici biopolimera, a obično se sastoje od 20 različitih prirodno prisutnih aminokiselina. Specifičan raspored tih aminokiselina omogućuje izgradnju bezbroj različitih proteina s jedinstvenim svojstvima.¹⁸

2.1.1. Faze savijanja strukture proteina

Savijanje proteina je složen proces, uključuje četiri faze, koji dovodi do 3D proteinskih struktura bitnih za različite funkcije u organizmu. Struktura proteina hijerarhijski je raspoređena, od primarne do kvartarne strukture prikazane na slici 1. Široka varijacija u sekvenci aminokiselina objašnjava različite konformacije u strukturi proteina.¹⁹ Primarna struktura odnosi se na linearni slijed aminokiselinskih ostataka u polipeptidnom lancu. Ove aminokiseline su kovalentno vezane peptidnom vezom koja se stvara između ugljikovog atoma karboksilne skupine jedne aminokiseline i atoma dušika α -amino skupine sljedeće.²⁰ Sekundarna struktura nastaje stvaranjem vodikovih veza između atoma u okosnici polipeptida, koja preklapa lance u α -zavojnice ili β -listove. Tercijarna struktura nastaje preklapanjem sekundarnih strukturnih beta listova ili alfa zavojnica jedne u drugu. Obično ima polipeptidni

lanac kao kičmu, s jednom ili više sekundarnih struktura. Tercijarna struktura određena je interakcijama i lijepljenjem aminokiselinskih bočnih lanaca u proteinu. Kvartarna struktura rezultat je presavijanja aminokiselinskih lanaca u tercijarnim strukturama koji dalje međusobno djeluju kako bi doveli do funkcionalnog proteina kao što su hemoglobin ili DNA polimeraza.²¹



Slika 1. Hijerarhijska struktura proteina. Primarna struktura definirana je slijedom aminokiselinskih ostataka i odgovorna je za naknadni proces savijanja. Sekundarna struktura opisuje lokalne konformacije, npr. α -zavojnice ili β -listovi. Prostorni trodimenzionalni raspored pojedinog proteina je njegova tercijarna struktura. Nekoliko proteina može međudjelovati i formirati kvaternarne strukture.²²

2.1.2. Nomenklatura i klasifikacija enzima

Klasifikacija i nomenklatura enzima je sustav koji omogućuje nedvosmislenu identifikaciju enzima u smislu reakcija koje kataliziraju. Ovo se oslanja na numeričku vrijednost sustava za klasificiranje enzima u skupine prema tipovima kataliziranih reakcija i sustavno imenovanje koje opisuje uključenu kemijsku reakciju.²³ Prije uspostave današnjeg sustava, u raznim priručnicima i udžbenicima, nalazile su se skupine enzima klasificiranih prema najrazličitijim načelima; novootkriveni enzimi često nisu nalazi mjesta u tim sustavima. Što se tiče nomenklature, samo u nekim slučajevima imena enzima bila su povezana sa djelovanjem katalizatora; druge oznake, međutim, dovodile su u zabludu u svakom pogledu.²⁴ U 1950-ima, dvije skupine enzimologa krenule su s rješavanjem ovog problema klasificirajući enzime prema njihovoj funkciji, a ne prema njihovoj strukturi; pristup koji je bio radikalno drugačiji od onoga koji se koristi u drugim granama nomenklature.²⁵ Ovaj sustav usvojila je i do kraja razvila Međunarodna unija za biokemiju i molekularnu biologiju (eng. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* - IUBMB). Formulirana su detaljna pravila za imenovanje i klasifikaciju enzima te mu je danas relativno lako dodijeliti klasu i dati mu ime koje opisuje njegovu funkciju.²⁶ Po reakcijama koje kataliziraju enzimi se svrstavaju u šest skupina (tablica 1.) oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze. Unutar

svake skupine enzimi se dijele po decimalnoj enzimskoj klasifikaciji u tri dodatne razine. Tvari na koje enzim djeluje nazivaju se njegovim supstratima, a naziv enzima obično se tvori dodatkom sufiksa -aza nazivu supstrata ili nazivu reakcije, npr. alkohol-dehidrogenaza, DNK-polimeraza. Često se rabe i stara trivijalna imena, kao za probavne enzime tripsin, pepsin i druga.²⁷

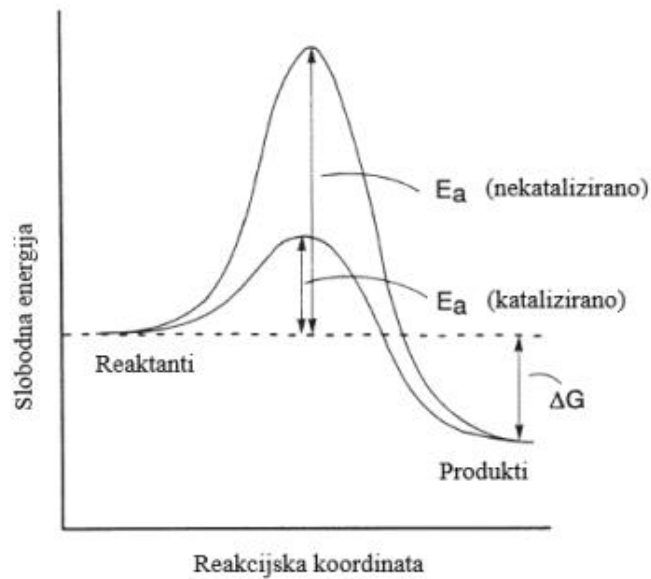
Tablica 1. Osnovne skupine enzima i vrste reakcija koje kataliziraju²⁸

<i>NAZIV</i>	<i>VRSTA KATALIZIRANE REAKCIJE</i>
<i>OKSIDOREDUKTAZE</i>	Oksidacija-redukcija
<i>TRANSFERAZE</i>	Prijenos funkcionalnih skupina
<i>HIDROLAZE</i>	Hidroliza
<i>LIAZE</i>	Adicija ili eliminacija skupina radi stvaranja/uklanjanja dvostruke veze
<i>IZOMERAZE</i>	Izomerizacija
<i>LIGAZE</i>	Vezanje dvaju supstrata na teret hidrolize ATP

2.1.3. Djelovanje enzima

Enzimi su aktivni proteini koji mogu katalizirati biokemijske reakcije. Poput kemijskih katalizatora, enzimi povećavaju brzinu reakcije snižavanjem njezine energije aktivacije, stoga produkti nastaju brže i reakcije brže postižu svoje ravnotežno stanje. Enzimске reakcije su milijunima puta brže od onih nekataliziranih reakcija.²⁹ Mehanizam djelovanja enzima temelji se na kemijskoj reakciji u kojoj se enzim veže za supstrat pri čemu se stvara kompleks enzim-supstrat. Ova reakcija odvija se u relativno malom području enzima koje se naziva aktivno ili katalitičko mjesto. Drugim riječima, mehanizam djelovanja enzima temelji se na prirodni interakcije enzim-supstrat, što objašnjava specifičnost reakcije bioloških katalizatora.³⁰ Oni ne utječu na promjenu slobodne energije ili konstante ravnoteže reakcija. Slika 2. ilustrira djelovanje enzima sa stajališta aktivacijske energije.³¹ Dakle, biokatalizatori ubrzavaju pretvorbu supstrata u produkte reakcije (S→P), zbog toga što se u prisutnosti enzima ta pretvorba ne ostvaruje izravno, nego se molekule supstrata (S) povezuju s molekulom enzima (E) u kompleks enzim-supstrat (ES), koji se nakon vrlo kratkog vremena raspada na slobodni enzim i produkte reakcije što je prikazano jednadžbom 2.1.³²

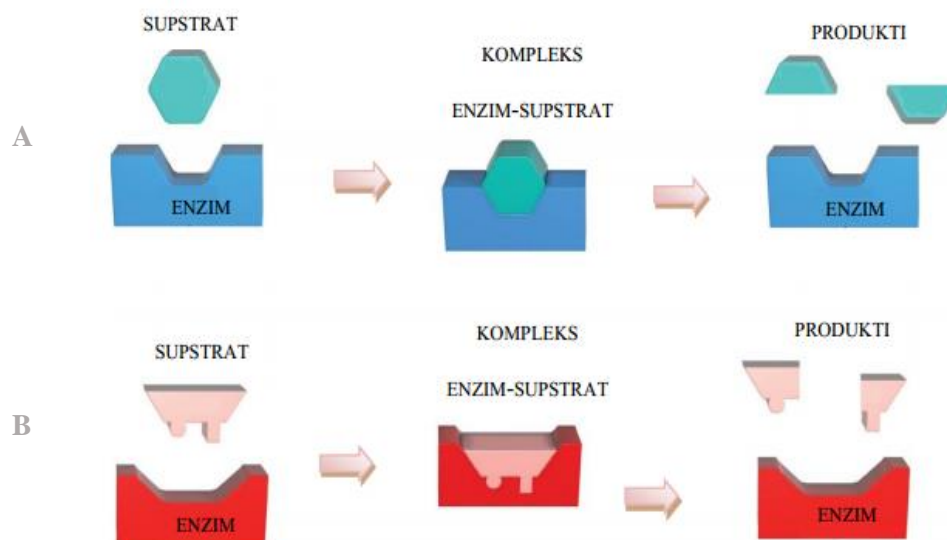




Slika 2. Shematski prikaz reakcijskog mehanizma nekatalizirane i katalizirane reakcije³³

Specifičnost enzima, tj. pojava da svaki enzim može djelovati samo na određeni supstrat ili na grupu srodnih supstrata (supstratna specifičnost), odnosno katalizirati samo određenu reakciju tog supstrata (reakcijska specifičnost) pripisuje se podudarnosti prostorne strukture enzima i supstrata što ga enzim može aktivirati.³⁴ Kada se ostvari fizički kontakt između enzima i supstrata dolazi do ubrzanja reakcije. Postoje dva modela (slika 3.) prema kojima se opisuje reakcija enzimske katalize, a to su :

- model ključ-brava
- model pobuđene prilagodbe



Slika 3. Shematski prikazi djelovanja enzima: **A)** ključ-brava i **B)** pobuđene prilagodbe³⁵

2.1.3.1. Model ključ brava

Ovo je kruti model koji je predložio Emil Fischer 1894. Model objašnjava interakciju između supstrata i enzima u smislu analogije brave i ključa. U ovom modelu, pretpostavlja se da je katalitičko mjesto unaprijed oblikovano.³⁶ Budući da je molekula supstrata (odn. onaj dio molekule koji sudjeluje u kataliziranoj reakciji) uvijek mnogo manja od molekule enzima, aktivno područje predstavlja po pravilu vrlo mali dio ukupne molekule enzima. Selektivnim povezivanjem supstrata na aktivnom području stvara se jedinstveni kompleks unutar kojeg se zbivaju kemijske reakcije (preraspodjela elektrona, prekidanje postojećih i stvaranje novih kovalentnih veza itd) te se reakcije završavaju odcjepljivanjem nastalih produkata i regeneracijom aktivnog područja enzima.³⁷ Nedostatak ovog modela je implicirana krutost katalitičkog mjesta.³⁸

2.1.3.2. Model pobudene prilagodbe

Za razliku od gornje teorije, model pobudene prilagodbe predviđa fleksibilnost katalitičkog mjesta. Kako bi se prevladali problemi modela brave i ključa zbog krutog katalitičkog mjesta, Koshland je 1963. godine predložio inducirani model prilagodbe.³⁹ Važna značajka ovog modela je fleksibilnost aktivnog mjesta. U slučaju pobudene prilagodbe, supstrat izaziva konformacijsku promjenu u aktivnom mjestu enzima tako da supstrat stane u aktivno mjesto na najprikladniji način kako bi se pospješila kemijska reakcija. Navedena teorija čini razumljivom reakcijsku specifičnost i supstratnu specifičnost enzima. Prema strukturi aktivnog područja enzima, različiti enzimi aktiviraju isti supstrat za različite reakcije (supstratna specifičnost) ili selektivno aktiviraju za istu vrstu reakcije različite supstrate (reakcijska specifičnost).⁴⁰

2.1.4. Biokataliza

Dok se kataliza odnosi na primjenu kemijskih katalizatora za ubrzanje kemijskih reakcija, biokataliza je uporaba prirodnih katalizatora, kao što su enzimi, za izvođenje kemijskih transformacija na organskim spojevima. Biokatalitički procesi kao biokatalizator koriste slobodne enzime ili enzime koji još uvijek borave unutar živih stanica.^{41,42} Primjena biokatalizatora u proizvodnji alkohola i sireva odavno je poznata, a otkrićem strukture i funkcije brojnih proteina, povećana je i njihova primjena u industriji, zbog mogućnosti brze prilagodbe poželjnih svojstava biokatalizatora za određene kemijske procese. Danas je približno 100

različitih biokatalitičkih procesa implementirano u farmaceutskoj, kemijskoj, prehrambenoj i poljoprivrednoj industriji.⁴³

2.1.4.1. Prednosti i nedostaci biokatalize u odnosu na kemijsku katalizu

Enzimi, odnosno biokatalizatori, prilagođeni su za rad u fiziološkim uvjetima. Međutim, biokataliza se odnosi na uporabu enzima kao procesnih katalizatora u uvjetima *in vitro*, tako da je veliki izazov u biokatalizi pretvaranje tih fizioloških katalizatora u procesne katalizatore koji mogu obavljati u uvjetima reakcije industrijskog procesa. Enzimski katalizatori (biokatalizatori), kao i svaki katalizator, djeluju smanjenjem energetske barijere biokemijskih reakcija, a da se ne mijenjaju kao posljedica reakcije koju promiču. Međutim, enzimi pokazuju prilično različita svojstva u usporedbi s kemijskim katalizatorima. Većina tih svojstava posljedica je njihove složene molekularne strukture.^{44,45}

Prva prednost biokatalizatora, koja je ujedno i najznačajnija, je visoka selektivnost koja doprinosi minimaliziranju popratnih reakcija te olakšava separaciju, štedi vrijeme, energiju i sirovine. Biokatalizatori pokazuju tri vrste selektivnosti koje se očekuju kada je riječ o industrijski učinkovitim katalizatoru, a to su:

- stereoselektivnost – ukoliko u kemijskoj reakciji iz početnog supstrata može nastati više stereoizomera u stereoselektivnoj će pretežno nastajati samo jedan,
- regioselektivnost - kojom se reducira broj sintetskih stupnjeva i količina nusprodukata
- kemoselektivnost - u reakciju stupa samo jedna od više prisutnih funkcijskih skupina u supstratu čime se također smanjuje broj reakcijskih stupnjeva.⁴⁶

Osim prethodno navedenog biokatalizatori imaju čitav niz drugih prednosti pred klasičnim kemijskim katalizatorima. Ne djeluju na reakcijsku ravnotežu, puno su aktivniji, prihvatljivi su za okoliš jer se dobivaju iz obnovljivih izvora i biorazgradivi su. Procesi koje kataliziraju provode se u blagim reakcijskim uvjetima (temperature okoline, atmosferski tlak i neutralne pH vrijednosti) stvaraju malo otpada, troše manje sirovina vode i obično imaju manji broj procesnih stupnjeva. Kemijski poželjna svojstva u industriji su i visoka učinkovitost te blagi uvjeti rada. Prethodno navedene prednosti biokatalizu čine održivim izborom za industrijsku primjenu u organskoj sintezi. Štoviše, primjena enzima usklađena je s načelima zelene kemije koja vodi kemijsku industriju u posljednjih nekoliko desetljeća. Potencijalni nedostaci biokatalizatora su smanjene stabilnosti u uvjetima koji nisu fiziološki odnosno optimalni. Stabilnost i aktivnost

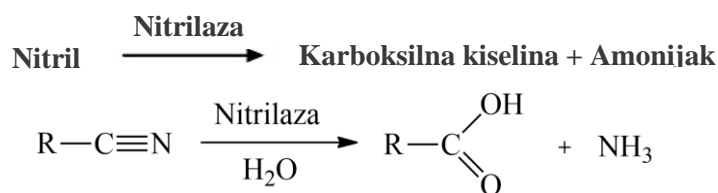
im pada porastom temperature, često dolazi do inhibicija supstratom i produktima te se ponekad teško regeneriraju.^{47,48}

2.1.4.2. Primjena biokatalize

Zbog navedenih razloga ne iznenađuje da u posljednjih 30 godina interes za područje biokatalize kontinuirano raste. Biokataliza je pronašla brojne primjene u različitim područjima kao alternativu kemijskoj katalizi. Visoka selektivnost enzima korištena je u farmaceutskoj industriji, posebno za pojednostavljenje mnogih sinteza aktivnih farmaceutskih sastojaka (API) radi smanjenja broja reakcijskih stupnjeva. Danas je uspostavljeno nekoliko stotina industrijskih procesa, a proširen je raspon produkata u farmaceutskoj industriji na koje je primijenjena biokataliza, kao i primjena biokatalize u otkrivanju lijekova.^{49,50} Biokataliza se ostvaruje u brojnim novim primjenama kao što su industrija hrane i stočne hrane, poljoprivreda, papirna, kožarska i tekstilna industrija, što rezultira značajnim smanjenjem troškova. U isto vrijeme, brz tehnološki razvoj sada još više potiče kemiju i farmaceutske industrije da prihvate tehnologiju enzima, održiv trend ojačan zabrinutošću za zdravlje, energiju, sirovinu materijale i okoliš.⁵¹

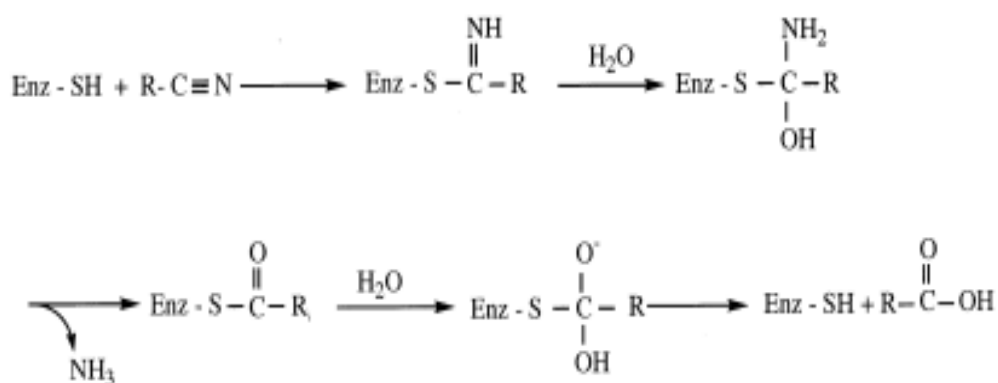
2.1.5. Nitrilaza

Enzimi nitrilaze kataliziraju hidrolizu spojeva nitrila u odgovarajuću karboksilnu kiselinu i amonijak te imaju širok raspon industrijskih i biotehnoloških primjena. Identificirani su i okarakterizirani u biljkama, bakterijama i gljivama. Od prve identifikacije aktivnosti nitrilaze u biljkama 1958. i bakterijama 1964. godine, karakterizirano je preko 30 nitrilaza. Nadporodica nitrilaze, koja se naziva i hidrolazama CN-a, sastoji se od enzima koji kataliziraju hidrolizu nepeptidnih veza ugljika i dušika. Članovi nadporodice podijeljeni su u 13 grana prema identitetu slijeda i katalitičkoj aktivnosti. Najpoznatije grane su alifatska amidaza, N-terminalna amidaza, biotinidaza, karbamilaza i nitrilazne grane. Nitrilaze su možda najbolje okarakterizirane od svih članova nadporodice.^{52,53,54} Reakcija katalizirana nitrilazama prikazana je na slici 4.



Slika 4. Reakcija katalizirana nitrilazom⁵²

Svi članovi nadporodice nitrilaza imaju katalitičku trijadu aminokiselina – glutaminske kiseline, lizina i cisteina. Grana nitrilaze može se razlikovati od ostalih članova nadporodice konzerviranim motivom cisteina-triptofana-glutaminske kiseline smještenim na ostacima cisteina katalitičke trijade. Smatra se da ovaj ostatak cisteina čini aktivno mjesto za enzimsku aktivnost i može biti točka na koju se skupine supstrata pričvršćuju prije hidrolize.^{55,56} Nitrilaze čine važnu klasu hidrolaza. Postoji znatan industrijski interes za enzimsku pretvorbu nitrila, u njihove odgovarajuće karboksilne kiseline visoke vrijednosti, zbog poželjnosti provođenja takvih reakcija u blagim uvjetima koji ne bi mijenjali druge labilne reaktivne skupine.⁵⁷ Osim toga, postojanje nitril-hidrolizirajućih enzima koji pokazuju visok stupanj enantio- i regio-selektivnosti, nudi sintetičke mogućnosti koje je teško postići konvencionalnim katalitičkim pristupima.⁵⁸ Mogući mehanizam (slika 5.) za reakciju kataliziranu nitrilazom ukazuje na nukleofilni napad tiolske skupine na ugljikov atom nitrila s istodobnom protonacijom dušika kako bi se stvorio tetraedralni tiomidatni intermedijer. Sljedeći koraci uključuju napad dviju molekula vode i protonaciju atoma dušika, koji se gubi kao amonijak. U nekim slučajevima formirani tetraedarski srednji dio može se nepravilno razgraditi kako bi proizveo amid umjesto normalnog kiselog proizvoda.⁵⁹

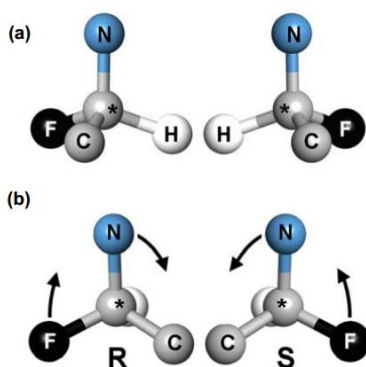


Slika 5. Mehanizam reakcije katalizirane nitrilazom⁵⁹

2.2. Optički čiste tvari

2.2.1. Kiralnost

Za neku molekulu kažemo da je kiralna ako se u potpunosti ne preklapa sa svojom zrcalnom slikom. S druge strane ako su molekula i njena zrcalna slika identični, tj. mogu se preklopiti tako da se svi dijelovi podudaraju, molekula je akiralna. Dvije molekule koje su kiralne imaju iste atome i iste atomske veze, ali se ne mogu u potpunosti nadograđivati. Stoga su one stereoizomeri koji se nazivaju enantiomerima (slika 6.a) i pojavljuju se kao zrcalne slike u trodimenzionalnim prikazima. Središnji atom stoga se smatra kiralnim središtem (stereocentar). Stereocentar je najčešće atom tetraedrnog ugljika koji je povezan s četiri različite skupine i označava se s zvjezdicom (*). Kako bi se razlikovala dva enantiomera, koristi se sustav Cahn-Ingold-Prelog ili jednostavno R (rectus) / S (sinister) notacija (slika 6.b), prema preporuci Međunarodne unije čiste i primijenjene kemije (IUPAC).^{60,61} Enantiomerni parovi imaju istu masu, atomski sastav, točke taljenja, točke vrelišta i druge fizičke karakteristike osim rotacije polariziranog svjetla. Iako se fizički i kemijski enantiomeri mogu ponašati bitno identično, u kiralnom okruženju (kao što su biomolekularni sastojci u živom organizmu) ishodi njihovih reaktivnosti mogu biti dramatično različiti.⁶²



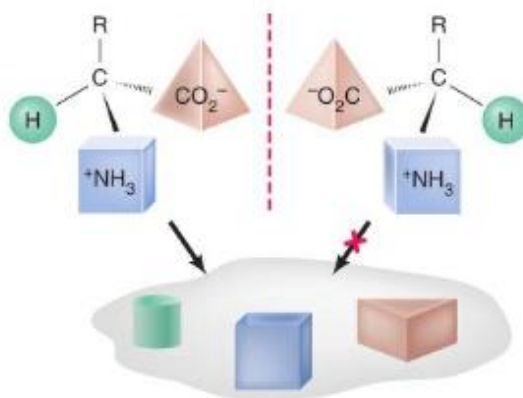
Slika 6. a) Enantiomerni par b) Cahn-Ingold-Prelog notacija⁶¹

Kada su oba enantiomera prisutna u jednakim koncentracijama u uzorku, on se naziva racemat ili racemička smjesa. Obično samo jedan od enantiomera pruža željeni učinak, dok je drugi često neaktivan ili, u najboljem slučaju, manje aktivan. U nekim slučajevima zapravo ima ozbiljne nuspojave ili toksičnost. Upravo zbog slučajeva kod kojih je jedan enantiomer

toksičan, priprava enantiomerno čistih spojeva sve više dobiva na važnosti, naročito u farmaceutskoj industriji. Enantiomerna čistoća, $[ee]$ (jednadžba 2.2.) kiralnog spoja izražava se kao enantiomerni suvišak i predstavlja omjer razlike i sume molarnih udjela enantiomera u smjesi dvaju enantiomera^{63,64}. Ako u produktu ima jednaka količina oba enantiomera dobiveni produkt se naziva racemična smjesa ($ee = 0\%$). U slučaju da ima više jednog enantiomera od drugog naziva se enatiomerno obogaćen spoj ($ee = 0 - 100\%$), a ako je sintetiziran samo jedan enantiomer, onda se naziva enatiomerno čisti spoj ($ee = 100\%$).⁶⁵

$$ee [\%] = \frac{n(R)-n(S)}{n(R)+n(S)} \cdot 100 \quad (2.2.)$$

Podrijetlo bioloških svojstava koja se odnose na kiralnost često se uspoređuje sa specifičnošću ruku i rukavica; specifičnost vezanja za kiralnu molekulu (poput ruke) na mjestu kiralnog receptora (rukavica) povoljna je samo na jedan način. Ako supstrat ili mjesto biološkog receptora ima imalo pogrešnu "ruku", prirodni fiziološki odgovor (npr. neuronski impuls, kataliza reakcije) neće se dogoditi. Dijagram koji pokazuje kako samo jedna aminokiselina u paru enantiomera može na optimalan način komunicirati s hipotetskim mjestom vezanja (npr. u enzimu) prikazan je na slici 7. Zbog kiralnog centra aminokiseline, može doći do vezanja u tri točke s pravilnim poravnanjem samo za jedan od dva enantiomera.⁶⁶

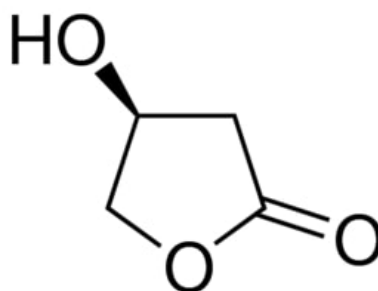


Slika 7. Prikaz enantiomera i enantioselektivnosti receptora u živim organizmima⁶⁶

2.2.3. 3-Hidroksi- γ -butirolakton (3HBL)

3-Hidroksi- γ -butirolakton (3HBL), prikazan na slici 8., svestrani je kiralni građevni blok s primjenama u sintezi raznih lijekova, polimera i otapala. Zahvaljujući brojnim primjenama, 3HBL je identificiran kao jedna od najboljih kemikalija s dodanom vrijednošću iz biomase u

izvješću Ministarstva energetike SAD-a.⁶⁷ Konkretno, 3HBL može poslužiti kao prekursor različitih enantiočistih intermedijera za kiralne lijekove kao što su statini za smanjenje kolesterola, antibiotici poput karbapenema i linezolida. Artovastatin sintetizira se putem hidroksinitrila, intermedijera koji se može lako sintetizirati iz 3HBL.⁶⁸ Može se također koristiti u sintezi dodatka prehrani (L-karnitin). Nadalje, iz HBL-a mogu se dobiti različiti zamjenski tetrahidrofurani, amidi, laktoni, nitrili i epoksidi koji zauzvrat mogu poslužiti kao kiralni građevni blokovi i otapala.⁶⁸ Iako se u literaturi mogu pronaći brojni kemijski i kemo-enzimski putovi prema 3HBL-u, oni imaju različite nedostatke. Takvi procesi uključuju uporabu opasnih materijala i uvjete obrade, skupe polazne materijale, reagense i katalizatore, te slabo iskorištenje i teško odvojive nusproizvode, čemu je posljedica povećavanje cijene proizvoda. Biološka sinteza pojavila se kao vrlo obećavajuća sinteza za različite kemijske spojeve. Jedna od prepreka širem usvajanju bioloških sustava za proizvodnju molekula poput ove je nedostatak utvrđenih putova za njihovu sintezu. Očekuje se da će biosinteza ublažiti mnoge od ovih problema i ponuditi elegantno rješenje prema ekonomičnoj proizvodnji ove vrijedne kemikalije. Međutim, to zahtijeva dizajn novih biosintetičkih puteva.⁶⁹



Slika 8. 3-Hidroksi- γ -butirolakton (3HBL)

2.3. Modeliranje biokatalitičkih reakcija

Biokatalitički procesi slični su konvencionalnim kemijskim procesima na mnogo načina. Najznačajnija razlika je u tome što biokatalitički procesi moraju uzeti u obzir enzimsku kinetiku i operacijsku stabilnost enzima. Pri ispitivanju novog biokatalitičkog sustava koriste se matematički modeli procesa s ciljem optimiranja produktivnosti. Njegovom primjenom moguće je odrediti optimalne radne uvjete kao i mikrookoliš za bioreaktore. Matematički model enzimske reakcije sastoji se od kinetičkog modela te reaktorskog modela. 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. Strategija razvoja modela za enzimske reakcije podijeljena je na pet koraka. Prvi je korak karakterizacija

biokatalizatora u ovisnosti o pH vrijednosti, temperaturi i supstratu u koncentracijama relevantnim za industrijsku skalu te određivanje mehanizma enzimske reakcije. Nakon toga slijedi prikupljanje eksperimentalnih podataka metodom početnih reakcijskih brzina i ispitivanje utjecaja koncentracije svih spojeva reakcijskog medija na brzinu reakcije. Treći je korak procjena kinetičkih parametara nelinearnom regresijskom analizom, nakon kojeg je potrebno napraviti validaciju modela u reaktoru pri različitim koncentracijama biokatalizatora i supstrata. I zadnji, peti korak je upotreba modela koja podrazumijeva provedbu reakcija u različitim tipovima reaktora, optimizaciju koncentracija enzima i supstrata te izradu simulacija produktivnosti procesa u ovisnosti o prostoru i vremenu.⁷⁰

2.3.1. Kinetički modeli enzimskih reakcija

Enzimska reakcijska kinetika se razlikuje od kemijske reakcijske kinetike jer proizlazi iz mehanizma biokatalitičke reakcije. Brzina enzimske reakcije prikazuje se Michaelis-Menteničinim tipom kinetike koji se temelji na mehanizmu reakcije prikazanom jednadžbom 2.3. Uključuje reakciju enzima (E) i supstrata (S) pri čemu se stvara međukompleks ES. Ovaj se kompleks u nepovratnoj reakciji raspada na produkt i enzim koji ostaje nepromijenjen. Poznata je i pod nazivom kinetika zasićenja jer su njezini predlagači pretpostavili da aktivna mjesta enzima u slučaju visokih koncentracija supstrata budu zasićena, zbog toga što je broj aktivnih mjesta u enzimu fiksna.



Michaelis-Menteničina kinetika (jed. 2.4.) predstavlja jednosupstratnu enzimsku kinetiku, pri čemu r_s [mmol dm³ min⁻¹] predstavlja brzinu enzimske reakcije, c_s [mmol dm⁻³] koncentraciju supstrata, V_m [mmol dm³ min⁻¹] maksimalnu brzinu enzimske reakcije i K_m [mmol dm⁻³] Michaelisovu konstantu.

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m + c_s} \quad 2.4.$$

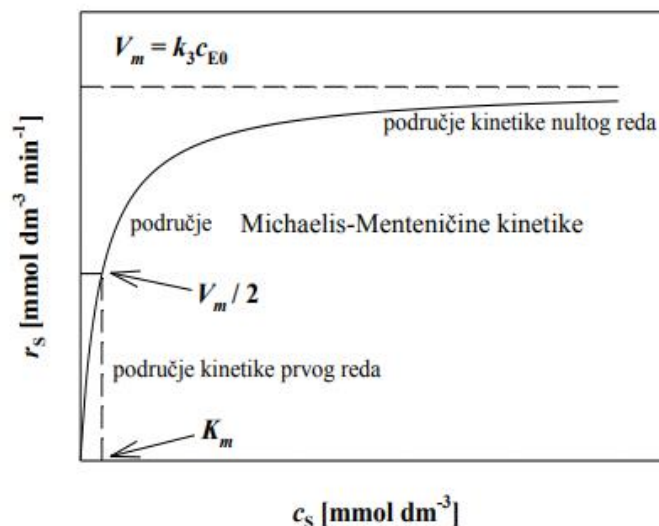
Parametri Michaelis-Menteničine kinetike, maksimalna brzina enzimske reakcije (V_m) i Michaelisova konstanta (K_m), matematički su definirane jednadžbama 2.5. i 2.6., pri čemu c_{E0} [mg mL⁻¹] predstavlja početnu koncentraciju enzima, a k_1 , k_2 i k_3 konstante iz reakcijske sheme 2.3.

$$V_m = k_3 \cdot c_{E0} \quad 2.5.$$

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

Maksimalna brzina enzimske reakcije je umnožak katalitičke konstante enzima, odnosno konstante brzine reakcije nastajanja produkta i početne koncentracije enzima iz čega se može zaključiti da na maksimalnu brzinu reakcije možemo utjecati promjenom koncentracije enzima. Michaelisova konstanta predstavlja omjer kinetičkih konstanti. U slučaju da je K_m velika znači da enzim nema dobar afinitet prema supstratu. Definira se kao koncentracija supstrata kod koje je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine enzimske reakcije, a ovisi o procesnim uvjetima poput pH i temperature.^{47,71}

Na slici 9. prikazana je hiperbolična ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata koja se može podijeliti na tri područja. Prvo područje je pri niskim koncentracijama supstrata gdje je koncentracija supstrata manja od Michaelisove konstante. U ovom slučaju brzina reakcije proporcionalno raste porastom koncentracije supstrata, iz tog razloga ovo se područje naziva područjem kinetike 1. reda. Drugo područje prikazuje Michaelis-Menteničinu ovisnost. Zadnje područje kod visokih koncentracija supstrata, kada je $K_m \ll c_s$, brzina reakcije ne ovisi o koncentraciji supstrata, stoga ovo područje nazivamo područjem kinetike 0. reda.⁷²



Slika 9. Grafički prikaz Michaelis-Menteničine kinetike

Jednosupstratna Michaelis-Menteničina kinetika je temeljni model enzimske reakcije. U slučajevima da reakcije imaju više supstrata ovaj kinetički model postaje kompleksniji. Određene molekule mogu utjecati na smanjenje enzimske reakcije vezanjem za enzim čime smanjuju ili blokiraju katalitičko djelovanje. Takve molekule nazivaju se inhibitori. Razlikujemo nekoliko vrsta inhibicije, a to su kompetitivna, nekompetitivna i antikompetitivna.

Kompetitivna inhibicija (jed. 2.7.) objašnjava slučaj kada je molekula inhibitora strukturno slična supstratu i konkurira mu za vezanje na aktivno mjesto. Ova pojava očituje se smanjenjem brzine enzimske reakcije koje je istaknutno pri niskim koncentracijama supstrata. Nekompetitivna inhibicija (jed. 2.8.) smanjuje broj dostupnih i funkcionalnih molekula enzima, brzina reakcije se smanjuje jer nakon promjene oblika enzim nije u mogućnosti katalizirati reakciju. Antikompetitivna inhibicija (jed. 2.9.) jest mješavina kompetitivne i nekompetitivne inhibicije.⁷³

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m \cdot (1 + \frac{c_i}{K_i}) + c_s} \quad 2.7.$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m + c_s \cdot (1 + \frac{c_i}{K_i})} \quad 2.8.$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{(K_m + c_s)(1 + \frac{c_i}{K_i})} \quad 2.9.$$

Pri povišenim koncentracijama supstrata jedno od odstupanja koje se često javlja prilikom Michaelis-Menteničine kinetike jest inhibicija supstratom. U enzimskoj kinetici je široko rasprostranjen fenomen i igra važnu ulogu u metaboličkim putovima živih organizama.

Prilikom procjene kinetike enzimske reakcije osim što je važno poznavati potencijalne inhibicije također treba znati i enzimsku operacijsku stabilnost koja utječe na volumnu produktivnost s vremenom u reaktoru. Stabilnost ovisi o očuvanju aktivne enzimske konformacije, a izražava se kao vrijeme poluživota, $t_{1/2}$ [min], tj. vrijeme potrebno da se enzimska aktivnost snizi na polovinu svoje početne vrijednosti. Vrijednost konstante deaktivacije k_d [min⁻¹] može se izračunati prema izrazu 2.10. i uvrstiti u Michaelis-Menteničinu kinetiku prema izrazu 2.11., pod uvjetom da se kinetika deaktivacije može opisati modelom 1. reda.⁴⁷

$$k_d = -\frac{\ln 0.5}{t_{1/2}} \quad 2.10.$$

$$\frac{dV_m}{dt} = -k_d \cdot V_m \rightarrow V_m = V_{m0} \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad 2.11.$$

2.3.2. Model kotlastog reaktora

Kotlasti ili šaržni reaktori (eng. *batch reactors*) su kemijski reaktori koji su u obliku zatvorenog sustava. U ovom tipu reaktora sva količina reakcijske smjese unosi se na početku

kemijske reakcije, te se za vrijeme iste reakcijska smjesa ne izmjenjuje s okolinom. Reakcija započinje, traje određeno vrijeme, završava i tek po završetku, reaktor se prazni.⁷⁴ Kotlasti reaktor najčešće se u laboratoriju koristi za ispitivanje enzimskih reakcija. Razlog tomu leži u tome što šaržni reaktorski sustavi imaju prednosti jednostavnog rukovanja i mogućnosti ispitivanja različitih parametara u isto vrijeme, posebno kada se radi s malim volumenima u laboratorijskim ispitivanjima.⁷⁵ Za postavljanje modela koji opisuju promjenu tvari u kotlastom reaktoru potrebno je u obzir uzeti pretpostavke kojima se pojednostavljuje matematički opis procesa:

- kotlasti reaktor je zatvoreni sustav, tijekom reakcije ne dolazi do izmjene tvari s okolinom što za posljedicu ima konstantan volumen reakcijske smjese
- idealno miješanje što pretpostavlja da su sastav reakcijske smjese i temperatura u svakoj točki reakcijskog volumena isti

Kotlasti reaktor uvijek radi u nestacionarnom radu, zbog toga što tijekom provođenja vremenski ovisne reakcije u konstantnom volumenu dolazi do promjene veličina stanja. Promjena koncentracije u kotlastom reaktoru s vremenom može se opisati jednadžbom 2.12.⁷⁴

$$r_s = -\frac{dc_s}{dt} \quad 2.12.$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Aparatura

3.1.1. Reakcijski sustav

Reakcije su provođene u sustavu prikazanom na slici 9. Reakcijski sustav sastojao se od kotlastog reaktora (KR) koji je predstavljala Eppendorf epruveta na tresilici ThermoMixerC (Eppendorf). Sve su se reakcije radi sigurnosti, provedene u digestoru prikazanom na slici 10.



Slika 9. Reakcijski sustav



Slika 10. Aparatura za provedbu eksperimenata smještena u digestoru

3.1.2. Plinski kromatograf

Plinska kromatografija (GC) je analitička metoda za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzoraka. Prema vremenu zadržavanja, vrijeme koje uvedeni sastojak provede u kromatografskom sustavu, specifično za pojedinačne komponente, uzorak se kvalitativno analizira. Kvantitativna analiza uzorka određuje se prema intenzitetu odziva, odnosno integracijom površine ispod krivulje. Osnovni princip rada plinske kromatografije uključuje isparavanje uzorka u zagrijanom dijelu za injektiranje, nakon čega slijedi razdvajanje komponenata smjese na koloni. U GC analizi uzorak, koji može biti plin ili kapljevina, ubrizgava se u struju inertne plinovite pokretne faze, često se naziva plin nosilac. Najčešće pokretne faze za GC su He, Ar i N₂, čija prednost je što su kemijski inertne i prema uzorku i prema stacionarnoj fazi. Nepokretna faza može biti u tekućem ili čvrstom agregatnom stanju, a uzorak u tekućem ili plinovitom te se injektira kroz gumenu pregradu. Zatim uzorak, zajedno s pokretnom fazom, prolazi kroz kolonu (gdje dolazi do razdvajanja i različitog zadržavanja komponenti na temelju njihove sposobnosti da se raspodijele između mobilne i stacionarne faze) zadanom brzinom protoka, do detektora koji je spojen na računalo na kojem se prikazuje kromatogram. Primjenjuje se za analizu plinovitih tvari ili lako hlapljivih tvari koje isparavaju na radnoj temperaturi kolone (do 400°C), a da pritom ne dođe do njihove razgradnje. Volumeni injektiranih uzoraka u plinovitom stanju kreću se od 1 do 10 mL, dok se volumeni uzoraka u tekućem stanju kreću od 0,1 do 1 µL.^{76,77} U ovom radu uzorci su analizirani na uređaju Nexis GC-2030 (Shimadzu, Japan) prikazanom na slici 11.



Slika 11. Plinski kromatograf

3.1.3. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. High-Performance Liquid Chromatography) je analitička tehnika za odvajanje, identificiranje i kvantificiranje komponenata u smjesi. Kod HPLC-a tekući se uzorak injektira u tekuću pokretnu fazu koja nosi uzorak kroz kromatografsku kolonu te se komponente uzorka međusobno odjeljuju na temelju njihove mogućnosti raspodjele između pokretne i nepokretne faze. Vrijeme zadržavanja komponenti određeno je na osnovi njihove interakcije s pokretnom i nepokretnom fazom. Zbog potreba za bržim i djelotvornijim odjeljivanjem prilikom kojeg se koriste visoki tlakovi neizostavna je primjena složene instrumentacije. HPLC sustav sastavljen je od spremnika pokretne faze, pumpe za stalan protok mobilne faze kroz kolonu, injektora za unošenje tekućeg uzorka, HPLC kolone i detektora spojenog na računalo. Sustav za opskrbu pokretnom fazom sadržava pumpu koja omogućuje stalan protok pokretne faze stalnom brzinom i pod visokim tlakom u kolonu. Moraju osiguravati ponovljive volumene eluiranja te površine pikova bez obzira na začepljenost kolone i promjenu viskoznosti. Raspon protoka kod modernih pumpi je od 0,01 do 10 mL/min, a maksimalan tlak kojeg postižu je 34 500 kPa. Injektor služi za injektiranje tekućeg uzorka različitih volumena (0,1-100 mL) pri visokom tlaku. Otapala koja se upotrebljavaju moraju biti vrlo visoke čistoće i mjehurići plina moraju biti uklonjeni iz njih. Detektori koji se u tekućinskoj kromatografiji najčešće upotrebljavaju temelje se na apsorpciji vidljivog ili ultraljubičastog zračenja.^{78,79,80} U ovom radu analize su provedene na HPLC-u s UV detektorom proizvođača *Shimadzu* prikazanog na slici 12.



Slika 12. HPLC uređaj s UV detektorom proizvođača *Shimadzu*

3.1.4. Ostala aparatura

AUW120 vaga (Shimadzu, Japan) prikazana na slici 13. korištena je za vaganje pojedinih uzoraka.



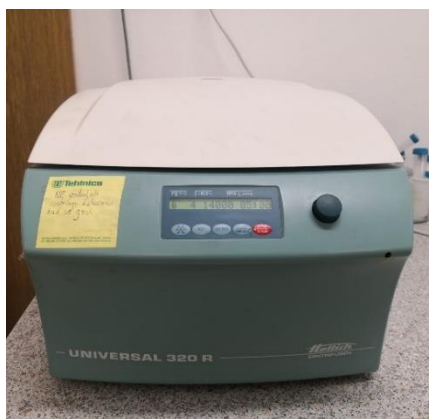
Slika 13. Analitička vaga

Za miješanje uzoraka korišten je homogenizator Vibromix 10 (Tehtnica) prikazan na slici 14.



Slika 14. Homogenizator

Odvajanje enzima od reakcijske smjese provedeno je u centrifugi Universal 320 R (Hettich Zentrifugen) koja je prikazana na slici 15.



Slika 15. Centrifuga

3.2. Analitičke metode

3.2.1. Evaluacija enzima

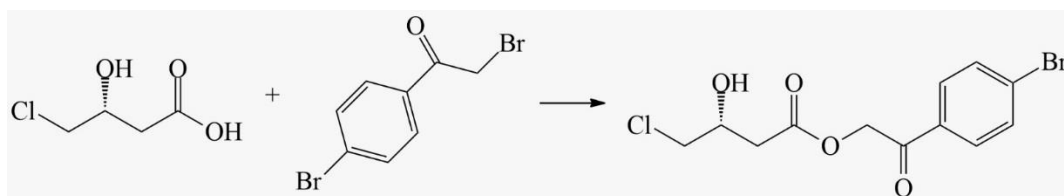
U ovome radu provedena je evaluacija 24 nitrilaze prikazane na slici 16. Za ispitivanje je bilo potrebno pripremiti temeljne otopine (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila (KHB). Temeljna otopina 1, koncentracije 200 mM, pripravljena je dodavanjem odgovarajućeg volumena (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila u reakcijski pufer (500 mM Tris-SO₄, pH 7.3). Iz prve temeljne otopine pripremljena je temeljna otopina 2, koncentracije KHB 6 mM, koja je korištena u eksperimentima. Na analitičkoj vagi odvagano je po 1 mg svakog enzima. Prije početka reakcije uzorkovan je 0. uzorak iz temeljne otopine cijanoalkohola. Reakcija je pokrenuta u trenutku dodavanja 500 µL temeljne otopine cijanoalkohola u epruvetu s enzimom, u tako pripremljenom sustavu koncentracija enzima iznosila je 2 mg mL⁻¹. Svi uzorci inkubirani su na tresilici, pri temperaturi 25°C i brzini okretaja 1000 okr/min, u digestoru tijekom 6 sati. Nakon provedene inkubacije uzorke je bilo potrebno pripremiti za analize na GC-u i HPLC-u. Ispitivanjima je prethodila izrada baždarnih pravaca putem kojih je praćena promjena koncentracija supstrata i produkta (prilog 1). U slučajevima kada su koncentracije izlazile iz granica baždarnih pravaca bilo je potrebno napraviti razrjeđenja. Ukoliko se uzorak mora razrijediti na primjer 100 puta, potrebno je alikvot od 10 µL uzorka, automatskom pipetom, prebaciti u Eppendorf epruvetu koja sadrži 990 µL reakcijskog pufera. Tako pripremljen uzorak kratko se miješa na homogenizatoru i spreman je za daljnju analizu.



Slika 16. 23 nitrilaze proizvođača Prozomix i jedna od proizvođača Sigma Aldrich (SA)

3.2.2. Priprema i analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Uzorke je prije analize na HPLC-u bilo potrebno derivatizirati, što podrazumijeva dodatak kromofornih skupina kako bi se traženi spoj vidio pri određenoj valnoj duljini UV zračenja. Obzirom da u reakciji sinteze HBL-a kao primarni produkt nastaje (*R*)-4-klor-3-hidroksibutanska kiselina iz KHB-a, kao derivatizacijsko sredstvo koristila se 100 mM otopina 2,4'-dibrom-acetofenona koja djeluje za derivatizaciju kiselina. Iz sheme procesa derivatizacije, prikazane na slici 17., može se vidjeti da je u ovom slučaju kromoforna skupina fenilni prsten koji omogućava detekciju na UV detektoru pri 197 nm prilikom HPLC analize. Derivatizacijska otopina pripravljena je otapanjem 51.05 mg dibromacetofenona u 1.8 mL acetonitrila.^{81,82}



Slika 17. Shema reakcije derivatizacije (*R*)-4-klor-3-hidroksibutanske kiseline

Alikvot od 10 μ L uzorka prebačen je automatskom pipetom u Eppendorf epruvetu s 40 μ L derivatizacijske otopine te je kratko promiješan na homogenizatoru te tako pripravljen stavljen na tresilicu na temperaturu od 60°C i pri 600 okr/min. Nakon sat vremena u epruvetu je dodano 200 μ L metanola, homogenizirano je te stavljeno u centrifugu na 5 minuta, 4°C i 14000 okr/min. Centrifugom je odvojen enzim od ostatka smjese te se gornji sloj otpipetirao u vijalu za HPLC analizu.

Uzorci su analizirani kapljevinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, na HPLC uređaju s UV detektorom. Analize su provedene metodom gradijentnog eluiranja pri temperaturi od 30 °C i valnoj duljini 197 nm. Stacionarna faza je bila Kinetex kolona veličine čestica 5 μ m i pora 100 Å te dimenzija 250 mm x 4.6 mm. Mobilne faze su bile organska [ACN (1600 mL) + TFA (2 mL) + H₂O (400 mL)] i anorganska [H₂O (2 L) + TFA (2 mL)]. Protok mobilne faze je bio 1,5 mL/min. Volumen injektiranog volumena po analizi je 20 μ L. Uzorci su po izlasku iz kolone detektirani na UV-detektoru pri valnoj duljini od 197 nm. Ukupno trajanje metode je 16 min, analiza je krenula od 90 % vodene faze i 10 % organske faze, u 10-toj min je 100 % organska faza, a u 15-toj min se vratilo na početne uvjete od 90 % vodene faze, odabrani uvjeti metode prikazani su u prilogu 2. Retencijsko vrijeme 3-hidroksi- γ -butirolaktona je 6,58 min, a 4-klor-

3-hidroksibutironitrila (KHB) nije moguće vidjeti HPLC analizom. Kromatogram dobiven analizom je prikazan u prilogu 3. Radi slabe vidljivosti HBL-a te nemogućnosti praćenja KHB-a odlučeno je da se u nastavku analize provode samo na GC-u.

3.2.3. Priprema i analiza uzoraka plinskom kromatografijom

3.2.3.1. Optimiranje metode

GC analizama prethodilo je optimiranje metode, zbog teško vidljivih pikova HBL koje je kao takve bilo teško kvantificirati. Pripremljeni su uzorci HBL-a sa 4 različite koncentracije (5, 3, 1, 0.2 mM) te su pušteni na GC analizu. Ispitivanja su se provodila u intervalu temperatura od 40°C do maksimalne moguće (300°C), mijenjani su injektirani volumeni kao i "split ratio" te omjeri uzorka i otapala (uzorka naprema MTBE). Nakon provedenih analiza odabrana je optimalna metoda čiji su uvjeti prikazani u prilogu 4. Zaključeno je kako su najbolji pikovi HBL-a pri injektiranom volumenu od 1,5 μL , omjeru uzorka prema otapalu 1:2 te sa temperaturnim gradijentom 2,5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ u intervalu 80-115°C.

3.2.3.2. Analiza uzoraka

Uzorci za GC analizu pripremljeni su na sljedeći način. Alikvot od 50 μL uzorka prebačen je automatskom pipetom u epruvetu s 100 μL metil terc-butil etera (MTBE). Tako pripremljen uzorak miješan je 20 s na homogenizatoru kako bi došlo do ekstrakcije uzorka u MTBE pri čemu nastaju dva međusobno nemješljiva sloja. Gornji organski sloj je prebačen u nastavak za pipetu punjenu slojem natrijevog sulfata i vate. Uzorak je osušen potiskivanjem, kroz nastavak za pipetu, u vijalicu za GC analizu. Ovako pripremljeni uzorci čuvani su na ledu do neposredno prije analize.

U ovom radu uzorci su analizirani na uređaju Shimadzu Nexis GC-2030 (Shimadzu, Japan). Pri analizi uzoraka plinskom kromatografijom uzorak se unosio pomoću sustava za automatsko injektiranje pri sljedećim uvjetima: $T(\text{injektora}) = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, i $V(\text{injektirani volumen}) = 1,5\text{ }\mu\text{L}$. Mobilna faza je N_2 iz boce pod tlakom dok je stacionarna faza bila kolona HP-5, Agilent. Kolona je napravljena od kvarcnog stakla, duljine 30 m, promjera 0,32 mm i debljine filma 0,25 μm te je moguća maksimalna temperatura 325°C. Uređaj sadrži detektor ($T_{\text{detektor}} = 300\text{ }^{\circ}\text{C}$) na kojemu su uzorci spaljivani u smjesi sintetskog zraka iz spremnika i vodika. Dobiveni podaci

su obrađivani uz programsku podršku GC Solutions (Shimadzu, Japan). Ukupno trajanje metode bilo je 15 min. Retencijsko vrijeme za 3-hidroksi- γ -butirolakton (HBL) bilo je 11,4 min, a 4-klor-3-hidroksibutironitrila (KHB) 8,0 min. Kromatogram dobiven analizom prikazan je u prilogu 5.

3.2.4. Kinetička ispitivanja

Nakon što se odredila nitrilaza s najvećim iskorištenjem na produktu krenulo se u daljnja ispitivanja. U ovome dijelu eksperimentalnog rada provedeno je pet različitih ispitivanja:

- Test potrebne količine enzima
- Utjecaj supstrata (KHB) na aktivnost enzima
- Utjecaj produkta (HBL) na aktivnost enzima
- Utjecaj 1,3-dikloro-2-propanola na aktivnost enzima
- Utjecaj cijanida na aktivnost enzima

3.2.4.1. Test potrebne količine enzima

Ispitivanje potrebne količine enzima provodilo se u svrhu određivanja koncentracije enzima pri kojoj se dobiva najveća koncentracija traženog produkta. Za provedbu ispitivanja bilo je potrebno napraviti suspenziju enzima, na način da je u Eppendorf epruvetu odvagana potrebna masa enzima kojoj se dodao određen volumen reakcijskog pufera. Eksperiment je proveden u reakcijskom sustavu koji se sastojao od Eppendorf epruveta, u koje je razdijeljena reakcijska smjesa (25 mM KHB, 2.00 mg mL⁻¹ enzima i reakcijski pufer) nakon pripreme u staklenoj boci, koje su imale ulogu reaktora i tresilice (25°C i 940 okr/min). Uzorkovanje je provedeno u 0., 10., 20., 30., 45. minuti, te nakon proteklih 1, 3, 6, 24 i 48 sati. Svi uzorci pripremljeni su kako je opisano u poglavlju 3.2.3.2.

3.2.4.2. Utjecaj supstrata (KHB) na aktivnost enzima

Kako bi se odredio utjecaj koncentracije supstrata na aktivnost enzima, provedeno je 15 eksperimenata u reakcijskom sustavu prikazanom na slici 10. pri 940 okr/min i 25°C. Utjecaj

koncentracije supstrata određivan je na način da je koncentracija enzima u svim eksperimentima stalna dok se koncentracija supstrata u slučaju ovog rada KHB-a mijenja. Prije provedbi eksperimenata napravljene su temeljne otopine, TO, enzima ($\gamma_{enzim} = 20 \text{ mg mL}^{-1}$) i KHB-a ($c_{KHB} = 200 \text{ mM}$). Prilikom ispitivanja koncentracije enzima bila je konstanta dok su se koncentracije KHB-a mijenjale u svakom eksperimentu. Koncentracija enzima i KHB-a kao i volumeni pripremljenih temeljnih otopina te volumeni reaktora prikazani su u tablici 2. Osim toga, reakcijska smjesa sadržavala je i pufer, a uzrokovanje se provodilo u 0., 1., 15. i 30. minuti te nakon 1, 2 i 4 sata. Takvi uzorci pripremljeni su kako je opisano u poglavlju 3.2.3.2.

Tablica 2. Sastav reakcijskih smjesa prilikom ispitivanja utjecaja KHB-a na aktivnost enzima

Exp. No.	c_{KHB} / mM	$V_{TO}^{KHB} / \mu\text{L}$	$\gamma_{enzim} / \text{mg mL}^{-1}$	$V_{TO}^{enzim} / \mu\text{L}$	$V_{reaktor} / \mu\text{L}$
1	500	171	2	340	3400
2	300	300	2	40	400
3	200	200	2	40	400
4	140	1750	2	250	250
5	100	200	2	40	200
6	75	150	2	40	400
7	60	120	2	40	400
8	50	100	2	40	400
9	40	500	2	250	2500
10	25	688	2	550	5500
11	10	40	2	80	800
12	5	50	2	200	2000
13	2.5	25	2	200	2000
14	1	5	2	200	2000
15	0.5	2.5	2	200	2000

3.2.4.3. Utjecaj produkta (HBL) na aktivnost enzima

Nakon određenog utjecaja supstrata krenulo se u ispitivanje utjecaja produkta (HBL) na aktivnost enzima, provedeno je 9 eksperimenata u reakcijskom sustavu prikazanom na slici 10. pri 1000 okr/min i 25°C. Prije provedbi eksperimenata napravljene su temeljne otopine, TO, enzima ($\gamma_{enzim} = 20 \text{ mg mL}^{-1}$), KHB-a ($c_{KHB} = 500 \text{ mM}$) i HBL-a ($c_{HBL} = 200 \text{ mM}$). Ovo ispitivanje provedeno je uz konstante koncentracije enzima i KHB-a. U reakcijsku smjesu je u ovom slučaju osim pufera dodan i HBL čije su koncentracije mijenjane. Sastav reakcijskih smjesa prikazan je u tablici 3. Svi su uzorci uzorkovani prije dodatka enzima, a nakon početka reakcije smjesa je uzorkovana 5 puta unutar 15 minuta. Svi uzorci pripremljeni su kako je opisano u poglavlju 3.2.3.2.

Tablica 3. Sastav reakcijskih smjesa prilikom ispitivanja utjecaja HBL-a na aktivnost enzima

Exp. No.	$c_{\text{KHB}} / \text{mM}$	$V_{\text{TO}}^{\text{KHB}} / \mu\text{L}$	$\gamma_{\text{enzim}} / \text{mg mL}^{-1}$	$V_{\text{TO}}^{\text{enzim}} / \mu\text{L}$	$c_{\text{HBL}} / \text{mM}$	$V_{\text{TO}}^{\text{HBL}} / \mu\text{L}$	$V_{\text{reaktor}} / \mu\text{L}$
1	250	150	2	30	50	75	300
2	250	150	2	30	20	30	300
3	250	150	2	30	16	24	300
4	250	200	2	40	8	16	400
5	250	200	2	40	4	8	400
6	250	350	2	70	2	7	700
7	250	350	2	70	1	3.5	700
8	250	350	2	70	0.4	1.75	700
9	250	350	2	70	0	0	700

3.2.4.4. Utjecaj 1,3-dikloro-2-propanola na aktivnost enzima

Nakon određenog utjecaja HBL-a, krenulo se u ispitivanje utjecaja 1,3-dikloro-2-propanola (DCP) na aktivnost enzima. Ova komponenta je početni reaktant u prvom stupnju reakcije prikazane na slici 18. stoga je provedeno 10 eksperimenata kako bi se odredio kakav utjecaj on ima na HBL koji je tema ovog rada. Ispitivanja su provedena u reakcijskom sustavu prikazanom na slici 10. pri 1000 okr/min i 25°C. Prije provedbi eksperimenata napravljene su temeljne otpoine, TO, enzima ($\gamma_{\text{enzim}} = 40 \text{ mg mL}^{-1}$), KHB-a ($c_{\text{KHB}} = 500 \text{ mM}$) i DCP-a ($c_{\text{DCP}} = 200 \text{ mM}$). Koncentracije enzima i KHB-a bile su konstantne, a u reakcijsku smjesu je u ovom slučaju osim pufera dodan i 1,3-dikloro-2-propanol u različitim koncentracijama. Sastav reakcijskih smjesa prikazan je u tablici 4. Svi su uzorci uzorkovani prije dodatka enzima, a nakon početka reakcije smjesa je uzorkovana 6 puta unutar 15 minuta. Svi uzorci pripremljeni su kako je opisano u poglavlju 3.2.3.2.

Tablica 4. Sastav reakcijskih smjesa prilikom ispitivanja utjecaja DCP-a na aktivnost enzima

Exp. No.	$c_{\text{KHB}} / \text{mM}$	$V_{\text{TO}}^{\text{KHB}} / \mu\text{L}$	$\gamma_{\text{enzim}} / \text{mg mL}^{-1}$	$V_{\text{TO}}^{\text{enzim}} / \mu\text{L}$	$c_{\text{DCP}} / \text{mM}$	$V_{\text{TO}}^{\text{DCP}} / \mu\text{L}$	$V_{\text{reaktor}} / \mu\text{L}$
1	250	200	2	20	30	60	400
2	250	200	2	20	20	40	400
3	250	200	2	20	14	28	400
4	250	200	2	20	8	16	400
5	250	200	2	20	4	8	400
6	250	200	2	20	2	4	400
7	250	250	2	25	1	2.5	500
8	250	400	2	40	0.5	2	800
9	250	400	2	40	0.25	1	800
10	250	150	2	15	0	0	300

3.2.4.5. Utjecaj cijanida na aktivnost enzima

Cijanidi se kao jedan od reaktanata koriste u drugom stupnju reakcije prikazane na slici 18. iz tog razloga provelo se ispitivanje utjecaja cijanida na aktivnost enzima. Provedeno je 10 eksperimenata u reakcijskom sustavu prikazanom na slici 10. pri 1000 okr/min i 25°C. Prije provedbi eksperimenata napravljene su temeljne otpoine, TO, enzima ($\gamma_{enzim} = 40 \text{ mg mL}^{-1}$), KHB-a ($c_{KHB} = 500 \text{ mM}$) i CN-a ($c_{CN} = 200 \text{ mM}$). Prilikom ispitivanja koncentracije enzima i KHB-a bile su konstantne dok je u ovom slučaju u reakcijsku smjesu osim pufera dodan i NaCN u različitim koncentracijama. Sastav reakcijskih smjesa prikazan je u tablici 5. Svi su uzorci uzorkovani prije dodatka enzima, a nakon početka reakcije smjesa je uzorkovana 6 puta unutar 15 minuta. Svi uzorci pripremljeni su kako je opisano u poglavlju 3.2.3.2.

Tablica 5. Sastav reakcijskih smjesa prilikom ispitivanja utjecaja CN-a na aktivnost enzima

Exp. No.	c_{KHB} / mM	$V_{TO}^{KHB} / \mu\text{L}$	$\gamma_{enzim} / \text{mg mL}^{-1}$	$V_{TO}^{enzim} / \mu\text{L}$	c_{NaCN} / mM	$V_{TO}^{NaCN} / \mu\text{L}$	$V_{reaktor} / \mu\text{L}$
1	250	150	2	15	50	75	300
2	250	150	2	15	20	30	300
3	250	150	2	15	16	24	300
4	250	150	2	15	12	18	300
5	250	150	2	15	8	12	300
6	250	150	2	15	4	6	300
7	250	150	2	15	2	3	300
8	250	150	2	15	1	1.5	300
9	250	150	2	15	0.5	0.75	300
10	250	150	2	15	0	0	300

3.2.5. Provedba reakcije u kotlastom reaktoru

Reakcijski sustav za ispitivanje reakcije u kotlastom reaktoru se sastojao od Eppendorf epruvete koja je predstavljala reaktor na tresilici. Reakcija je provedena pri 1000 okr/min i temperatura 25°C. Prije provedbi eksperimenata napravljene su temeljne otpoine, TO, enzima ($\gamma_{enzim} = 40 \text{ mg mL}^{-1}$) i KHB-a ($c_{KHB} = 500 \text{ mM}$). Reakcijska smjesa pripremila se na način da su se u jednu epruvetu dodaje određeni volumeni reakcijskog pufera (TrisSO₄, pH 7.3) i KHB-a nakon čega se uzorkuje kako bi dobili 0. uzorak. Zadnji se dodaje enzima, kojim se pokreće sama reakcija, te se uzima uzorak u prvoj minuti. Tada se ostatak smjese razdjeljuje u 10-ak epruveta koje služe za uzorkovanje svih ostalih točaka (1 epruveta = 1 uzorak). Sastav reakcijskih smjesa, iz provedenih 6 eksperimenata, dan je u tablici 6. Uzorci za analizu su

uzimani u vremenima 0, 1, 15, 30 min, 1, 1.5, 2, 3, 4.5, 6 i 24 h. Pripremljeni su prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.3.2.

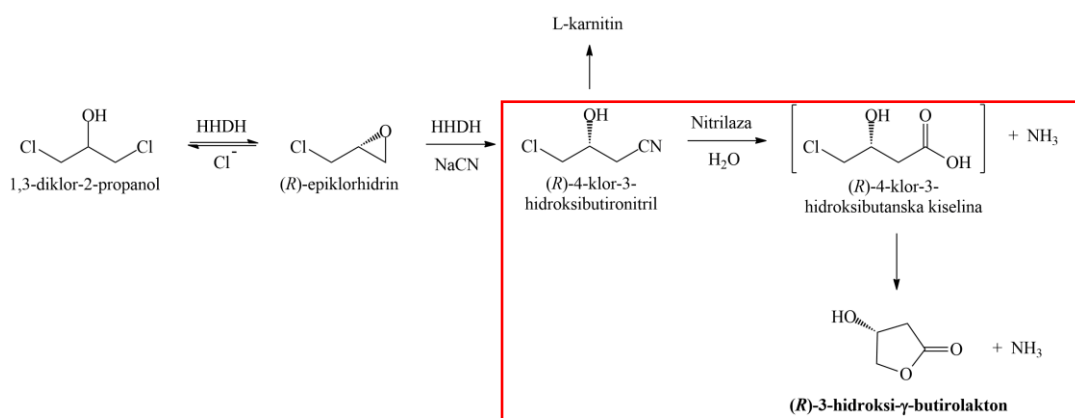
Tablica 6. Sastav reakcijske smjese prilikom provedbi reakcija u kotlastom reaktoru; 500 mM TrisSO₄, pH 7.3, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 940 okr/min

Exp. No.	$c_{\text{KHB}} / \text{mM}$	$V_{\text{TO}}^{\text{KHB}} / \mu\text{L}$	$\gamma_{\text{enzim}} / \text{mg mL}^{-1}$	$V_{\text{TO}}^{\text{enzim}} / \mu\text{L}$	$V_{\text{reaktor}} / \mu\text{L}$
Batch-1	25	275	2	550	5500
Batch-2	10	40	3	150	2000
Batch-3	50	170	2.5	106	1700
Batch-4	100	340	3	128	1700
Batch-5	250	850	2.5	106	1700
Batch-6	400	1360	2	85	1700

4. REZULTATI I RASPRAVA

Na slici 18. prikazana je reakcijska shema kaskadne reakcije u kojoj je konačan produkt (*R*)-3-hidroksi- γ -butirolakton (HBL). Reakcija kreće od 1,3-diklor-2-propanola (DCP) koji kataliziran halogenhidrin-dehalogenazom (HHDH) prelazi u (*R*)-epiklorhidrin, što je zapravo reverzibilna reakcija zatvaranja epoksidnog prstena. U drugom stupnju reakcije dodaje se, nukleofil, cijanid (CN) i HHDH koji katalizira otvaranje epoksidnog prstena (*R*)-epiklorhidrina u (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitril (KHB). U 3. stupnju reakcije odvija se sinteza (*R*)-4-klor-3-hidroksibutanske kiseline, pri čemu dolazi do spontane ciklizacije produkta u HBL, iz KHB-a, katalizirane nitrilazom. Ideja je provesti ovu kaskadnu reakciju u jednom reaktoru čija bi se reakcijska smjesa sastojala od DCP-a, CN-a i dva enzima (nitrilaze i HHDH), tako da rezultat reakcije bude sinteza HBL-a.

U ovome radu proučava se 3. stupanj prethodno navedene reakcije. Provedena je evaluacija 24 nitrilaze. Cilj rada bio je odrediti enzim s najvećim iskorištenjem na produktu u ispitivanoj reakciji. Nakon što je isti enzim određen krenulo se s kinetičkim istraživanjima. Procijenjeni su kinetički parametri iz kojih je razvijen kinetički model ispitivane reakcije čija je validacija provedena u kotlastom reaktoru. Iz rezultata niza eksperimenata, u cilju validacije modela, određena je i konstanta deaktivacije enzima. Sve reakcije su provedene u kotlastom reaktoru. Koncentracije utrošenog supstrata u reakciji te nastalog produkta su praćene na kapljevinskom kromatogramu visoke djelotvornosti i plinskom kromatogramu.

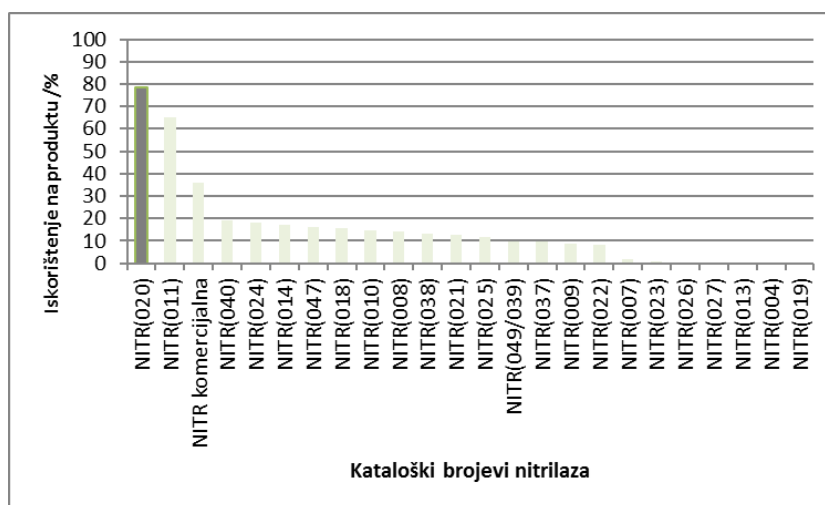


Slika 18. Potpuna reakcijska shema ispitivane reakcije s označenom konverzijom (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila u (*R*)-4-klor-3-hidroksibutansku kiselinu uz spontana ciklizacija u (*R*)-3-hidroksi- γ -butirolakton, koja se ispituje u ovom radu

4.1. Rezultat evaluacije enzima

Analizom uzoraka uzorkovanih i pripremljenih kako je opisano u poglavljima 3.2.1. i 3.2.2. dokazano je da nitrilaza uspješno katalizira ispitivanu reakciju. Od ukupno 24 ispitivane nitrilaze uz nitrilazu katališkog broja NITR(020) postignuto je najveće iskorištenje na produktu koje je iznosilo 78,50 %, a izračunato je putem jednadžbe 4.1. Rezultati evaluacije 24 uzorka nitrilaze prikazani su na slici 19.

$$Y = \frac{c_{HBL}}{c_{0KHB}} \cdot 100 \quad 4.1.$$

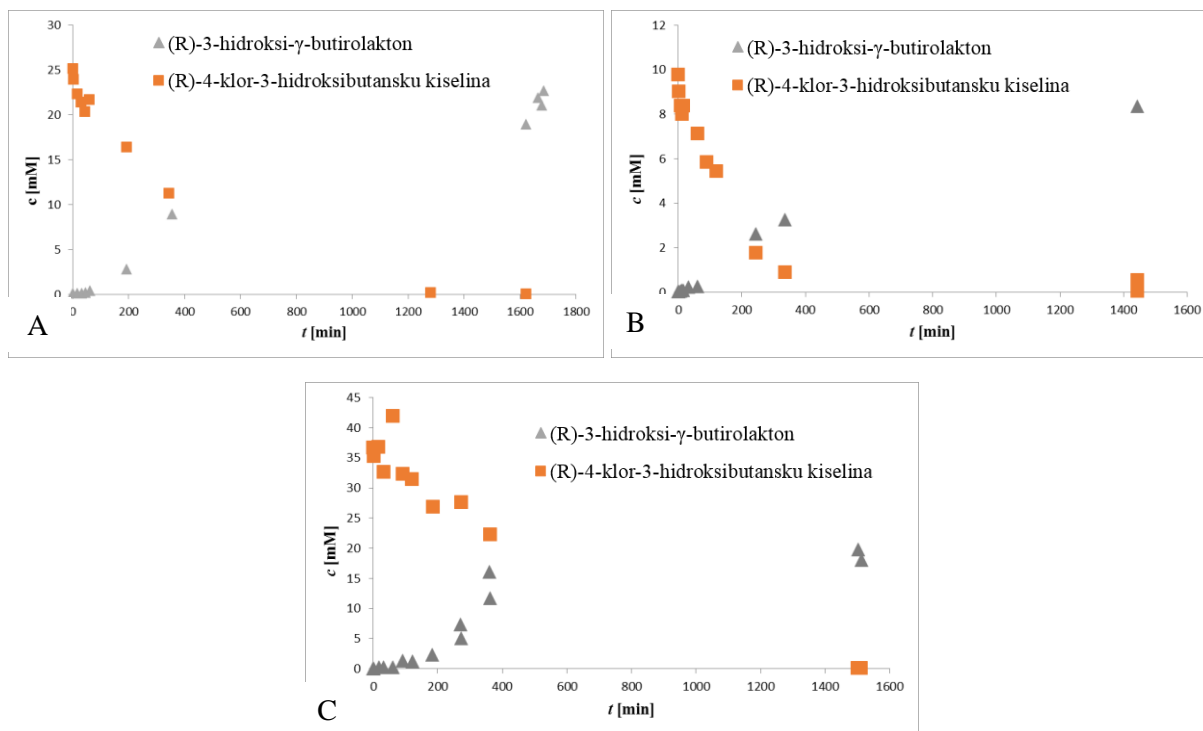


Slika 19. Rezultati evaluacije enzima nitrilaze.

4.2. Rezultati kinetičkih ispitivanja

4.2.1. Rezultat testa količine enzima

Rezultati ispitivanja potrebne količine enzima, koja se dodaje reakcijskoj smjesi, a da se pritom može vidjeti i pratiti promjena koncentracije produkta, prikazani su na slici 20. A-C. Bit ovog ispitivanja bila je odrediti koncentraciju enzima s kojom bi reakcija tekla dovoljno sporo, da je reakciju moguće pratiti uz 10 % konverziju supstrata jer bi u protivnom bilo nemoguće odrediti kinetiku reakcije.



Slika 20. Rezultati ispitivanja količine enzima [NITR(020)]; **A.** $c_{\text{KHB}} = 25 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ENZIMA}} = 2 \text{ mg mL}^{-1}$, **B.** $c_{\text{KHB}} = 10 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ENZIMA}} = 3 \text{ mg mL}^{-1}$, **C.** $c_{\text{KHB}} = 50 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ENZIMA}} = 2.5 \text{ mg mL}^{-1}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 940 okr/min, $V_{\text{reaktor}} = 5500 \text{ }\mu\text{L}$

Na temelju rezultata prikazanih na slici 20. izabrana je koncentracija enzima od 2 mg mL^{-1} . Razlog tome je što je u prvih 15 minuta provedbe reakcije konverzija manja od 10 %, u linearnom dijelu, te smo upravo tu koncentraciju enzima iz tog razloga koristili u daljnjim kinetičkim istraživanjima.

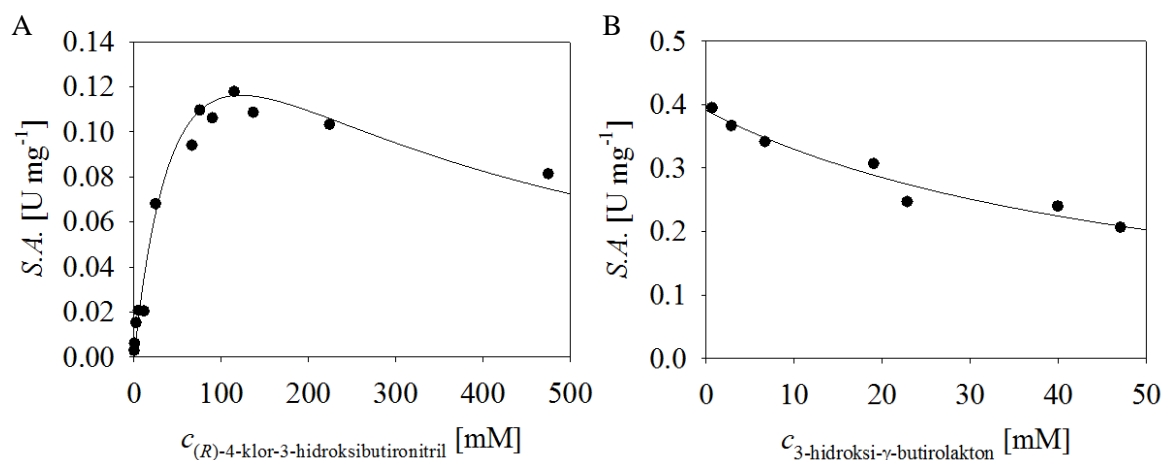
4.2.2. Kinetika reakcije

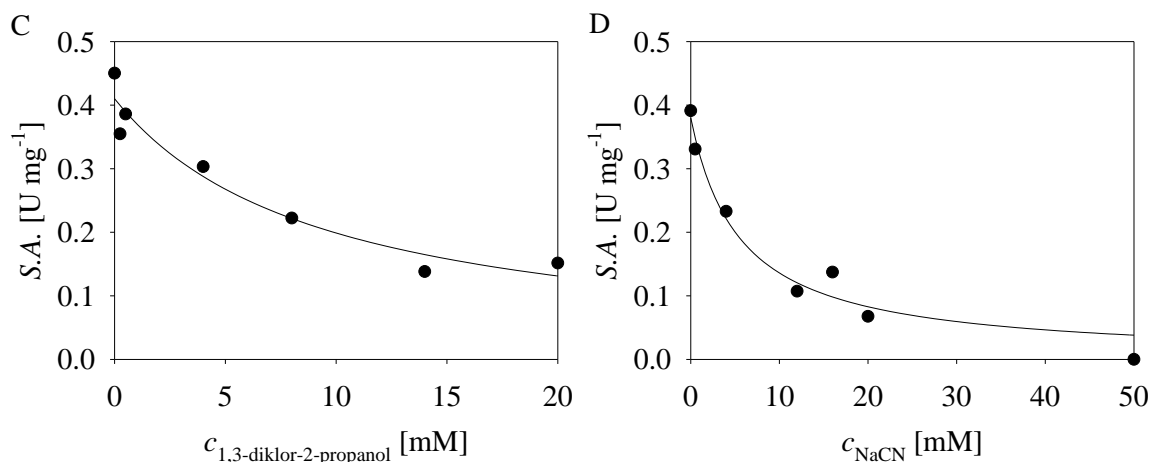
Nakon što je odabrana koncentracija enzima, provedena su kinetička mjerenja koja se sastoje od ispitivanja utjecaja koncentracije supstrata i produkta na specifičnu aktivnost enzima s ciljem određivanja kinetičkog modela, te cijanida i 1,3-diklor-2-propanola radi određivanja njihovog utjecaja na aktivnost enzima zbog toga što nastaju u prva dva stupnja ispitivane reakcije prikazane na slici 18.

Rezultati mjerenja kinetike prikazani su na slici 21. Slike prikazuju ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentracijama supstrata (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila (21.-A) i produkta (*R*)-3-hidroksi- γ -butirolaktona (21.-B). Obzirom da je krajnji cilj istraživanja provesti kaskadnu reakciju s konačnim produktom HBL-om, u svakom stupnju reakcije ispituje se

utjecaj svih komponenti na enzim. Iz tog razloga ispitani su utjecaji DCP-a te cijanida na aktivnost nitrilaze. Rezultati ovisnosti specifične aktivnosti enzima o koncentracijama 1,3-dikloro-2-propanola i cijanida, komponenti iz prva dva stupnja reakcije, prikazani su na slikama 21.-C i 21.-D.

Ispitivanjima je utvrđeno da supstrat prati Michaelis-Menteničinu kinetiku uz inhibicijski učinak na enzim pri višim koncentracijama. U slučaju produkta iz grafičkog prikaza može se vidjeti kako se povećanjem koncentracija smanjuje aktivnost enzima odnosno da dolazi do inhibicije produktom. Vrijednosti procijenjenih kinetičkih parametara navedeni su u tablici 7. V_m označava maksimalnu brzinu reakcije, a njegova relativno niska vrijednost označava nižu aktivnost enzima prema supstratu. Vrijednost Michaelisove konstante, K_m^{KHB} , upućuje na niži afinitet enzima prema ovom supstratu. Konstanta inhibicije supstratom, K_i^{KHB} , ima visoku vrijednost, što upućuje na slabu inhibiciju. Pokazalo se da povećanjem koncentracije produkta dolazi do pada specifične aktivnosti enzima što upućuje na inhibiciju produktom. Vrijednost konstante inhibicije, K_i^{HBL} , upućuje na blažu inhibiciju. Također je vidljiv i inhibicijski učinak CN-a na nitrilazu (slika 21.-C), a na slici 21.-D prikazan je inhibicijski učinak 1,3-diklor-2-propanola na nitrilazu, a procijenjena konstanta inhibicije, $K_i^{1,3\text{-diklor-2-propanol}}$ i K_i^{CN} , imaju niske vrijednosti te su također prikazane su u tablici 7. Inhibicije s prethodno 2 navedena inhibitora okarakterizirane su kao nekompetitivne s obzirom na činjenicu da se ne radi o potencijalnim supstratima za nitrilazu, za razliku od produkta reakcije koji je zbog strukturne sličnosti supstratu okarakteriziran kompetitivnom inhibicijom.





Slika 21. Utjecaj koncentracije **A.** (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila (KHB), **B.** (*R*)-3-hidroksi- γ -butirolakton (HBL), **C.** 1,3-diklor-2-propanola i **D.** cijanida na specifičnu aktivnost enzima [NITR(020)], $\gamma_{ENZIMA} = 2 \text{ mg mL}^{-1}$, 500 mM Tris-SO₄, pH 7.3, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 940 okr/min, $V_{reaktor} = 0,5 \text{ mL}$

Tablica 7. Procijenjeni kinetički parametri

Parametar	Jedinica	Vrijednost
V_m	U mg ⁻¹	0.242 ± 0.036
K_m^{KHB}	mM	66.469 ± 15.801
K_i^{KHB}	mM	226.12 ± 21.235
K_i^{HBL}	mM	12.114 ± 1.691
$K_i^{1,3\text{-diklor-2-propanol}}$	mM	9.417 ± 1.432
K_i^{CN}	mM	5.576 ± 0.876

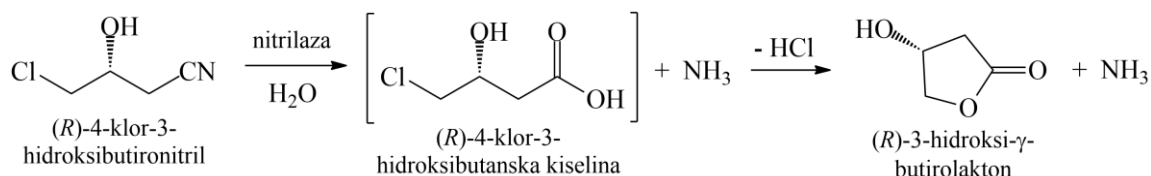
4.2.2.1. Kinetički model procesa

Na temelju sheme reakcije (slika 18.) i kinetičkih parametara (tablica 7.) razvijen je kinetički model za treći stupanj reakcije koji se može prikazati jednadžbom 4.2. Pretpostavljeno je da bi moglo doći do pada operacijske stabilnosti enzima u reaktoru što je opisano kinetikom prvoga reda te je uključeno u kinetički model. Inhibicije s 1,3-diklor-2-propanolom i cijanidom za sada ovdje nisu relevantne s obzirom na to da nisu bili prisutni u reaktoru za vrijeme reakcije.

$$r = \frac{V_m \cdot c_{KHB} \cdot \gamma_{nitrilaza} \cdot e^{-k_d \cdot t}}{\left(K_m^{KHB} \cdot \left(1 + \frac{c_{HBL}}{K_i^{HBL}}\right) + c_{KHB} + \frac{c_{KHB} \cdot c_{KHB}}{K_i^{KHB}}\right) \cdot \left(1 + \frac{c_{1,3\text{-diklor-2-propanol}}}{K_i^{1,3\text{-diklor-2-propanol}}} + \frac{c_{NaCN}}{K_i^{NaCN}}\right)} \quad 4.2.$$

4.2.2.2. Reaktorski model procesa

Reaktorski model reakcije, ispitivane u ovom radu, prikazane na slici 22. sastoji se od bilančnih jednadžbi 4.3 i 4.4. koje opisuju promjene koncentracija supstrata i produkta reakcija u vremenu.



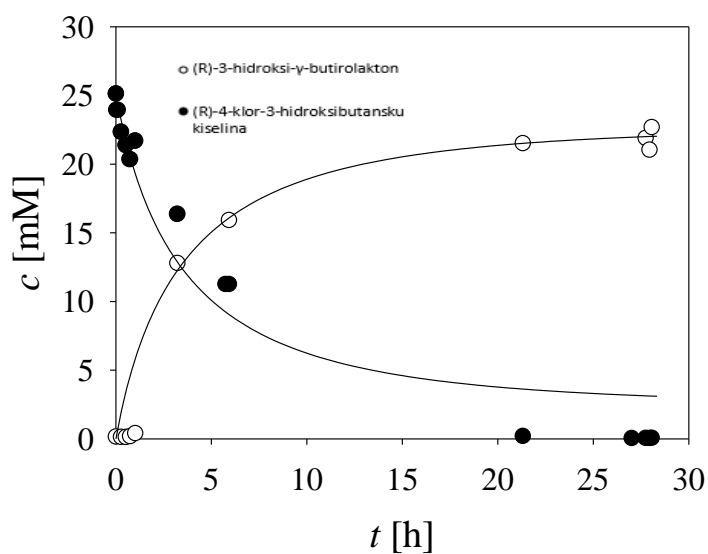
Slika 22. Reakcijska shema konverzije (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila u (*R*)-4-klor-3-hidroksibutansku kiselinu te spontana ciklizacija u (*R*)-3-hidroksi- γ -butirolakton

$$\frac{dc_{(R)-4-klor-3-hidroksibutironitril}}{dt} = -r \quad 4.3.$$

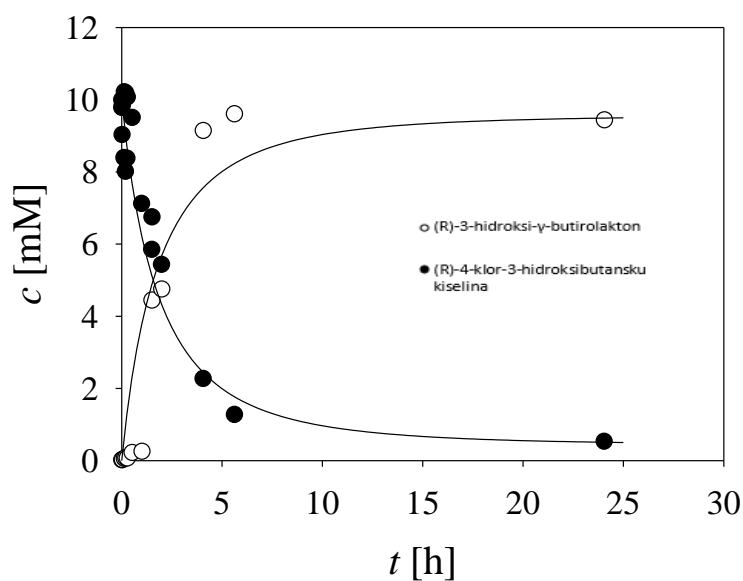
$$\frac{dc_{(R)-3-hidroksi-\gamma-butirolakton}}{dt} = r \quad 4.4.$$

4.3. Sinteza (*R*)-4-klor-3-hidroksibutanske kiseline u kotlastom reaktoru

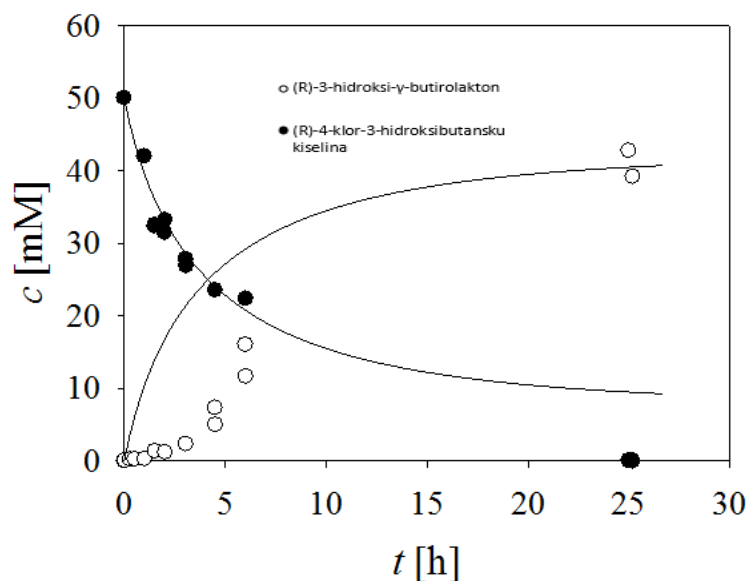
Navedeni kinetički model (jed. 4.2.-4.4.) validiran je u kotlastom reaktoru. Provedeni eksperimenti, kao i njihovo slaganje s predloženim kinetičkim modelom prikazani su u nastavku. Eksperimenti su provedeni u kotlastom reaktoru pri različitim početnim koncentracijama komponenata reakcijske smjese prikazanim u tablici 6. Na slikama 23.-28. prikazani su eksperimentalni rezultati enzimske sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutanske kiseline u kotlastom reaktoru, prikazani preko koncentracija krajnjeg produkta, (*R*)-3-hidroksi- γ -butirolaktona. Na slici 23. vidljivo je kako se koncentracija produkta povećava s trajanjem reakcije dok se koncentracija supstrata, očekivano, smanjuje u vremenu. Nakon 24 sata dolazi do gotovo potpune konverzije KHB u HBL. Isti se trend može uočiti i kod eksperimenata prikazanih na slikama 24., 25. i 26.. Na slikama 27. i 28. prikazani su eksperimenti u kojima ne dolazi do potpune potrošnje supstrata te je koncentracija nastalog produkta niska.



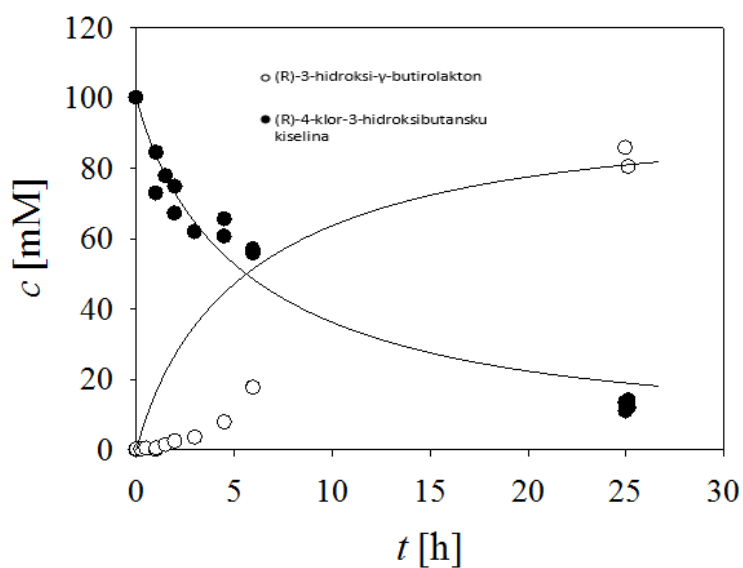
Slika 23. Batch-1: Reakcija sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutanske kiseline u KR; praćenje koncentracija GC analizom, $c_{\text{KHB}} = 25 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ENZIM}} = 2.0 \text{ mg mL}^{-1}$, 500 mM TrisSO_4 , $\text{pH } 7.3$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 940 okr/min , $V_{\text{reaktor}} = 5.5 \text{ mL}$,



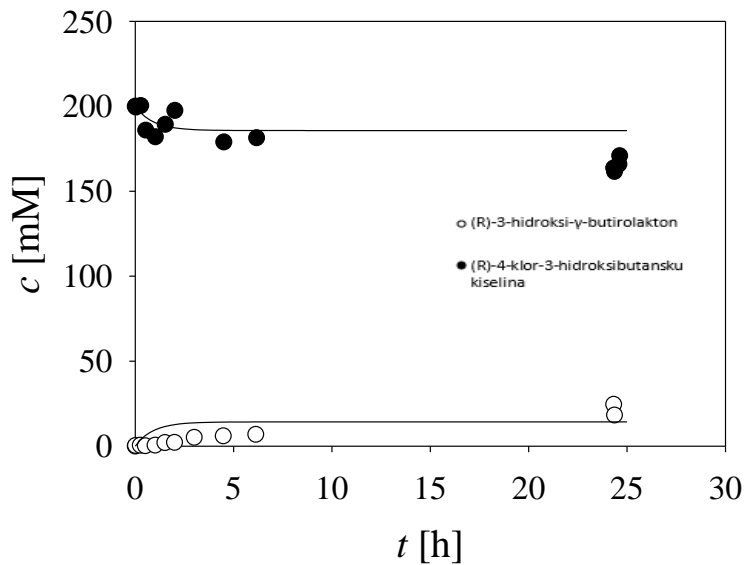
Slika 24. Batch-2: Reakcija sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutanske kiseline u KR; praćenje koncentracija GC analizom, $c_{\text{KHB}} = 10 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ENZIM}} = 3.0 \text{ mg mL}^{-1}$, 500 mM TrisSO_4 , $\text{pH } 7.3$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 940 okr/min , $V_{\text{reaktor}} = 2.0 \text{ mL}$



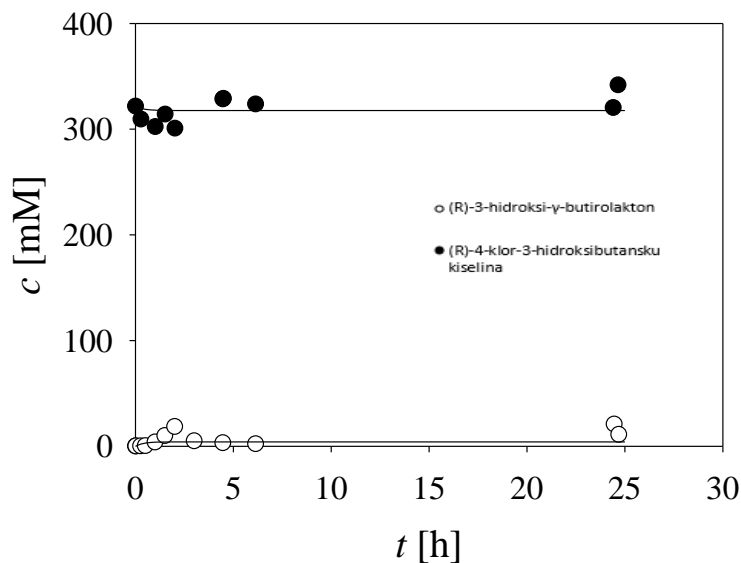
Slika 25. Batch-3: Reakcija sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutanske kiseline u KR; praćenje koncentracija GC analizom, $c_{\text{KHB}} = 50 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ENZIM}} = 2.5 \text{ mg mL}^{-1}$, 500 mM TrisSO_4 , $\text{pH } 7.3$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 940 okr/min , $V_{\text{reaktor}} = 1.7 \text{ mL}$



Slika 26. Batch-4: Reakcija sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutanske kiseline u KR; praćenje koncentracija GC analizom, $c_{\text{KHB}} = 100 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ENZIM}} = 3.0 \text{ mg mL}^{-1}$, 500 mM TrisSO_4 , $\text{pH } 7.3$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 940 okr/min , $V_{\text{reaktor}} = 1.7 \text{ mL}$



Slika 27. Batch-5: Reakcija sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutanske kiseline u KR; praćenje koncentracija GC analizom, $c_{\text{KHB}} = 250 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ENZIM}} = 2.5 \text{ mg mL}^{-1}$, 500 mM TrisSO_4 , $\text{pH } 7.3$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 940 okr/min , $V_{\text{reaktor}} = 1.7 \text{ mL}$



Slika 28. Batch-6: Reakcija sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutanske kiseline u KR; praćenje koncentracija GC analizom, $c_{\text{KHB}} = 400 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ENZIM}} = 2.0 \text{ mg mL}^{-1}$, 500 mM TrisSO_4 , $\text{pH } 7.3$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 940 okr/min , $V_{\text{reaktor}} = 1.7 \text{ mL}$

Iz prethodno prikazanih rezultata (slika 23.-28.) vidljivo je kako se u svih 6 reaktora uspješno provodi reakcija sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutanske kiseline pri čemu dolazi do spontane ciklizacije produkta u (*R*)-3-hidroksi- γ -butirolakton (HBL). Koncentracija (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila smanjuje se s vremenom te u 4 od 6 provedenih reakcija dolazi do potpune potrošnje supstarta. Također je vidljivo kako se s povećanjem koncentracija supstrata

konverzija smanjuje što se može objasniti inhibicijskim učinkom KHB-a. Optimalni uvjeti provedbe reakcije, obzirom na konverziju supstrata (99,76%) i iskorištenje na produktu (90,26%), su oni u reaktoru 1. Na grafičkim prikazima, slikama 23.-28., uz eksperimentalne rezultate prikazana je i simulacija modelom. Model (jed. 4.2.-4.4.) u svih 6 eksperimenata dobro opisuje eksperimentalne podatke, uz određena odstupanja u slučaju produkta kod eksperimenata prikazanih na slikama 25. i 26. Konverzije KHB-a i iskorištenja na produktu u svih 6 slučajeva, prikazane u tablici 8, definirane su jednadžbama 4.5. i 4.6.

$$X_{KHB} = \frac{c_{KHB_0} - c_{KHB}}{c_{KHB_0}} \quad 4.5.$$

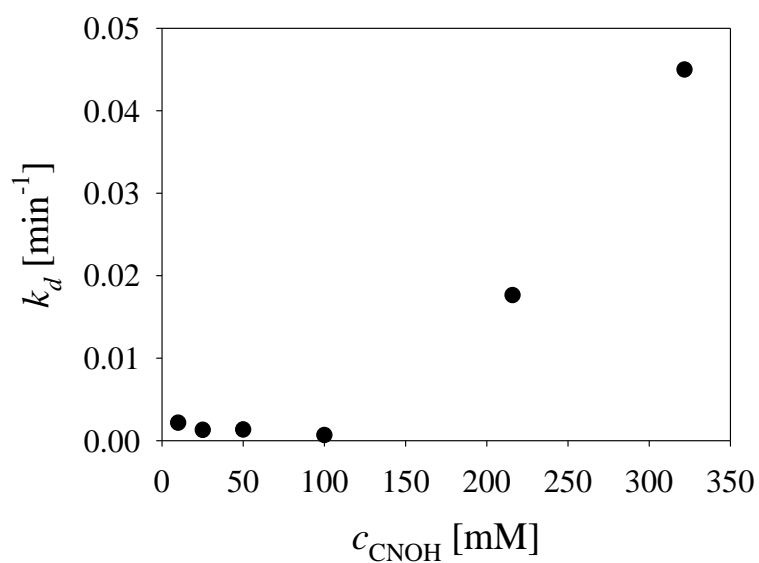
$$Y = \frac{c_{HBL_{konačno}}}{c_{KHB_{početno}}} \quad 4.6.$$

Tablica 8. Prikaz konverzija supstrata i iskorištenja na produktu u reakcijama provedenim u kotlastom reaktoru

	Konverzija KHB, %	Iskorištenje na produktu, %
Batch-1	99,76	90,26
Batch-2	99,55	85,34
Batch-3	99,80	49,12
Batch-4	85,91	61,26
Batch-5	33,62	17,74
Batch-6	14,53	6,53

Iz eksperimenata provedenih u kotlastom reaktoru procijenjena je i konstanta deaktivacije, k_d , koja je definirana jednadžbom 2.11. Na slici 29. prikazan je utjecaj početne koncentracije supstrata na operacijsku stabilnost nitrilaze izraženu kao konstanta brzine deaktivacije prvoga reda. Može se zaključiti da konstanta deaktivacije ovisi o početnim koncentracijama supstrata odnosno što je viša koncentracija supstrata to je deaktivacija samog enzima izraženija. Utvrđeno je da je do 100 mM supstrata deaktivacija enzima neovisna o koncentraciji i relativno spora, no iznad ove koncentracije brzina deaktivacije eksponencijalno raste što upućuje na to da u reaktoru ne smije biti previsoka koncentracija supstrata (iznad 100 mM). Deaktivacija enzima pri višim koncentracijama supstrata te inhibicijski učinak istog razlog su niskih konverzija i iskorištenja u reaktorskim sustavima 5 i 6 (slika 27. i 28.). U

reaktorima 1-4 (slike 23.-26.) su, zbog niske koncentracije KHB-a, konverzije i iskorištenja više nego li je to u druga dva slučaja.



Slika 29. Utjecaj početne koncentracije supstrata na operacijsku stabilnost nitrilaze izraženu kao konstanta brzine deaktivacije prvoga reda. Kinetički parametar je procijenjen iz eksperimenata u kotlastom reaktoru od kojih su neki prikazani na slikama 23.-28.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedena je evaluacija 24 nitrilaze kao biokatalizatora u reakciji sinteze (*R*)-4-kloro-3-hidroksibutironitrila nakon čega slijedi spontana ciklizacija kiseline u (*R*)-3-hidroksi- γ -butirolakton. Provedenim ispitivanjima dokazano je kako nitrilaza uspješno katalizira ispitivanu reakciju. Nitrilaza PRO-NITR(020) postignula je najveće iskorištenje na produktu pri ispitivanim uvjetima u vrijednosti od 78 %, zbog čega je odabrana za daljnja ispitivanja.

Kinetičkim ispitivanjima utvrđeno je da reakcija prati Michaelis-Menteničinu kinetiku ($V_m = 0.242 \pm 0.036$ U mg^{-1} , $K_m = 66.469 \pm 15.801$ mM) uz inhibicijski učinak supstrata ($K_i^{\text{KHB}} = 226.12 \pm 21.235$ mM) i produkta ($K_i^{\text{HBL}} = 12.114 \pm 1.691$ mM). Također je ispitan utjecaj 1,3-diklor-2-propanola i cijanida na aktivnost enzima te se pokazalo kako i oni pokazuju inhibicijsko svojstvo ($K_i^{1,3\text{-diklor-2-propanol}} = 9.417 \pm 1.432$ mM i $K_i^{\text{CN}} = 5.576 \pm 0.876$ mM). Inhibicije DCP-om i CN-om okarakterizirane su kao nekompetitivne s obzirom na činjenicu da se ne radi o potencijalnim supstratima za nitrilazu. Za razliku od predhodno 2 navedena inhibitora, utjecaj produkta reakcije na aktivnost enzima okarakteriziran je kompetitivnom inhibicijom zbog strukturne sličnosti supstratu. Niska vrijednost maksimalne brzine reakcije, V_m , označava nižu aktivnost enzima prema supstratu, a visoka vrijednost Michaelisove konstante, K_m , upućuje na niži afinitet enzima prema ovom supstratu.

Od ispitanih reakcijskih uvjeta najpovoljniji su se pokazali sljedeći: $c_{\text{KHB}} = 25$ mM, $\gamma_{\text{ENZIMA}} = 2$ mg mL^{-1} . U tom slučaju dolazi do 99.76 %-ne konverzije KHB-a, a iskorištenje na produktu iznosilo je 90,26 %. Pri ostalim reakcijskim uvjetima konverzije kao i iskorištenja smanjuju se povećanjem početne koncentracije supstrata. Utvrđeno je da su idealni uvjeti za provedbu sinteze u onim reakcijskim sustavima u kojima je maksimalna koncentracija KHB-a iznosila do 100 mM, odnosno koncentracije koje su dovoljno niske da pri njima KHB ne pokazuje svojstvo inhibicije supstratom. Iz eksperimenata provedenih u reaktoru procijenjena je konstanta deaktivacije iz koje se zaključuje da dolazi do pada operacijske stabilnosti enzima pri svim uvjetima, no iznad 100 mM supstrata u reaktora dolazi do značajne deaktivacije enzima, što nije povoljno za provedbu reakcije.

6. LITERATURA

1. Sheldon, R.A.; Brady, D.; Bode, M.L. The Hitchhiker's guide to biocatalysis: Recent advances in the use of enzymes in organic synthesis. *Chem. Sci.* 2020, 11, 2587–2605.
2. Santi, M.; Sancineto, L.; Nascimento, V.; Braun, A.J.; Orozco, E.V.M.; Andrade, L.H.; Gröger, H.; Santi, C. Flow Biocatalysis: A Challenging Alternative for the Synthesis of APIs and Natural Compounds. *Int J Mol Sci.* 2021, 22.
3. Sheldon, R.A. Why green chemistry and sustainability of resources are essential to our future. *J. Environ. Monit.* 2008, 10, 406–407.
4. Sheldon, R.A.; Woodley, J.M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.* 2018, 118, 801–838.
5. Krüger, A.; Schäfers, C.; Schröder, C.; Antranikian, G. Towards a sustainable biobased industry—Highlighting the impact of extremophiles. *New Biotechnol.* 2018, 40, 144–153.
6. Kim, J.Y.; Yoo, H.-W.; Lee, P.-G.; Lee, S.-G.; Seo, J.-H.; Kim, B.-G. In vivo Protein Evolution, Next Generation Protein Engineering Strategy: From Random Approach to Target-specific Approach. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2019, 24, 85–94.
7. Woodley, J.M. New opportunities for biocatalysis: Making pharmaceutical processes greener. *Trends Biotechnol.* 2008, 26, 321–327.
8. Omori, A.T.; Lobo, F.G.; Carolina, A.; Amaral, G.; Oliveira, C.d.S. Purple carrots: Better biocatalysts for the enantioselective reduction of acetophenones than common orange carrots (*D. carota*). *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2016, 127, 93–97.
9. Carvalho, C.C.C.R. Whole cell biocatalysts: Essential workers from Nature to the industry. *Microb. Biotechnol.* 2017, 10, 250–263.
10. Patel, R.N. Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. *Bioorg. Med. Chem.* 2018, 26, 1252–1274.
11. Liu, L.; Yang, H.; Shin, H.D.; Chen, R.R.; Li, J.; Du, G.; Chen, J. How to achieve high-level expression of microbial enzymes: Strategies and perspectives. *Bioengineered* 2013, 4, 212–223.
12. Wenda, S.; Illner, S.; Kragl, U. Industrial biotechnology—the future of green chemistry? *Green Chem.* 2011, 13, 3007–3047.

13. Franzén, R.; Tois, J. Purine and sugar chemistry on solid phase -100 years after the Emil Fischer's chemistry Nobel Prize 1902 *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2003, 6, 433–444.
14. Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. *Biochemistry* 5th ed. New York: W H Freeman, 2002.
15. Buchholz, K.; Kasche, V.; Bornscheuer, U. T. *Biocatalysts and Enzyme Technology.* 2nd edn. Wiley. 2012.
16. Saurabh, B. *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Enzymes, Proteins and Bioinformatics*, Institute Of Physics, 2018, 2, 1-29
17. Illanes, A. *Enzyme Biocatalysis, Principles and Applications*, 2008, 1-30
18. SenGupta, S.; Scheibel T. *Protein Folding-Misfolding: Some Current Concepts of Protein Chemistry*, ed. J. P. Zbilut and T. Scheibel, Nova Publishers, New York, 2007, 1
19. Lehninger, A. *Biochemistry.* Worth Publ Inc, New York, 833 pp, 1970.
20. Dixon, M.; Webb, E.C. In *Enzymes.* Academic Press, London, 1979, 207-215.
21. <https://www.news-medical.net/life-sciences/Protein-Folding.aspx>, (30.05.2022.)
22. Heim, M.; Römer, L.; Scheibel, T. Hierarchical structures made of proteins. The complex architecture of spider webs and their constituent silk proteins. *Chem Soc Rev.* 2010.
23. McDonald, A.G.; Boyce, S.; Tipton, K.F. Enzyme classification and nomenclature. In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons Ltd. 2001, 1–11.
24. Nord, F. F. *Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology*, Suggestions for a More Rational Classification and Nomenclature of Enzymes. 1953, 219–260.
25. McDONald, A.G.; Tipton, K.F. Fifty-five years of enzyme classification : advances and difficulties. *FEBS J.* 2014, 281, 583-592
26. Boyce, S.; Tipton, K.F. Enzyme classification and nomenclature. In *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons Ltd. 2001, 1–11.
27. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=18053>, (06.06.2022.)
28. Illanes, A. *Enzyme Biocatalysis - Principles and Applications*, Springer Verlag, 2008, 1-29.

29. Patel A. K., Singhania R. R., Pandey A., Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes, u: G. Brahmachari, Biotechnology of Microbial Enzymes, New York, Elsevier. 2016, 13 – 41.
30. Blanco, A., Blanco, G., Medical Biochemistry, Enzymes, Academic press, 1st edition, (2017) 153-175.
31. Liu S., Enzymes, u: Liu S., Bioprocess Engineering: Kinetics, Sustainability and Reactor Design, New York, Elsevier. 2016, 297 – 373.
32. <https://tehnika.lzmk.hr/tehnickaenciklopedija/enzimi.pdf> (15.06.2022.)
33. Wong, D. W. S. Structures of Proteins, The ABCs of Gene Cloning, Springer International Publishing, United States. 2018, 21 –28.
34. Lemieux, R.U.; Spohr, U. How Emil Fischer was led to the lock and key concept for enzyme specificity Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1994, 50, 1–20.
35. Milčić, N. Matematički model dinamičke kinetičke rezolucije kaalizirane halogenhidrin dehalogenazom. Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2018.
36. Kirby, A. J. Enzyme Mechanisms, Models, and Mimics. Angew. Chemie, International Ed. English. 1996, 35, 706–724
37. Csermely, P.; Palotai, R.; Nussinov, R. Induced fit, conformational selection and independent dynamic segments: an extended view of binding events Trends Biochem. Sci. 2010, 35, 539–546.
38. Koshland, D. E. The Key - Lock Theory and the Induced Fit Theory Angew. Chemie. 1994, 106, 2468–2472.
39. Boehr, D.D.; Nussinov, R.; Wright, P.E. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition Nat. Chem. Biol. 2009, 5, 789–796.
40. Koshland, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis, Proc. Nat. Acad. Sci. 1958, 44, 98–104.
41. Pandeeti, P.; Vijay, E. Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry, Emerging Trends in the Industrial Production of Chemical Products by Microorganisms. 2019, 107–125.
42. A. Škvarc et al. Biocatalysis for the Production of Pharmaceutical Intermediates, Kem.Ind. 2019, 68, 469-476
43. Wandrey, C.; Liese, A.; Kihumbu, D. Industrial Biocatalysis: past, present and future, Organic Process Res. Dev. 2000, 4, 286-290
44. Benkovic, S.J.; Ballesteros, A. Biocatalysts — the next generation. 1997, 15, 385–386.

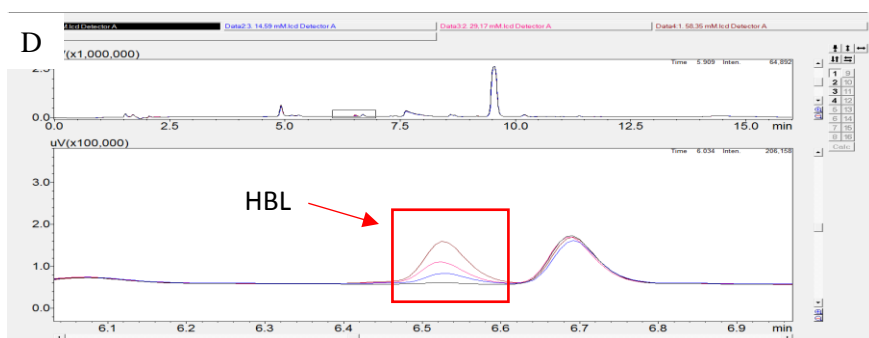
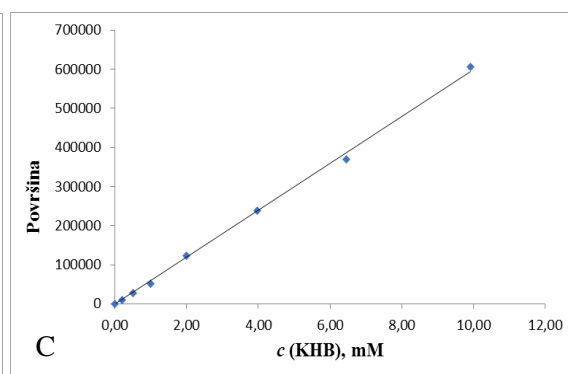
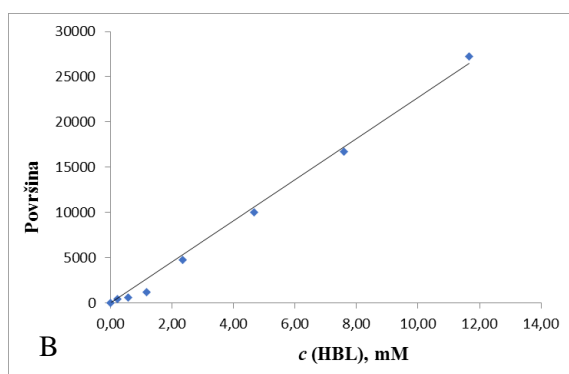
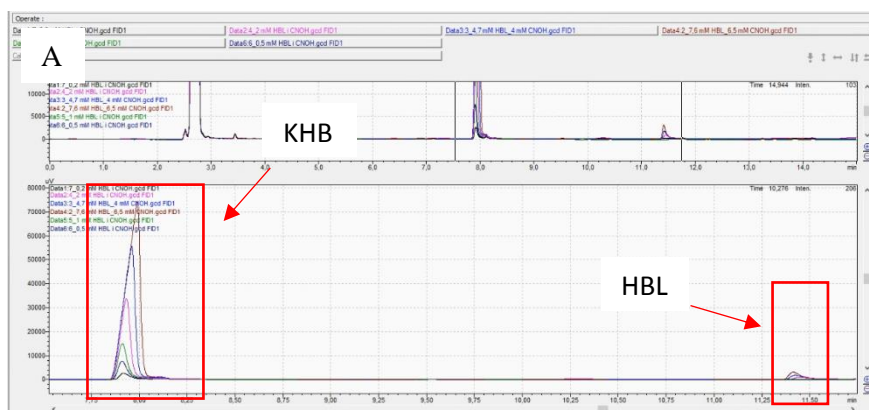
45. Polizzi, K.M.; Bommarius, A.S.; Broering, J.M.; Chaparro-Riggers J.F. Stability of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol.* 2007, 11.
46. Faber, K.; Patel, R. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2000, 11, 517-519
47. Findrik Blažević Z., *Bioreakcijska tehnika I*, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2013.
48. Faber, K. *Biotransformations*. In *Organic Chemistry: A Textbook*, 3. izd., Springer-Verlag, Berlin Njemačka. 1997.
49. Woodley, J.M. Accelerating the implementation of biocatalysis in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2019, 103
50. Wu, S.; Snajdrova, R.; Moore, J.C.; Baldenius, K.; Bornscheuer, U.T. *Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications*. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, 60, 88-119.
51. Beilen, J.B.; Li, Z. *Enzyme technology: an overview.* 2002, 13, 338–344.
52. Howden, A.J.; Preston, G.M. Nitrilase enzymes and their role in plant-microbe interactions. *Microb Biotechnol.* 2009, 2, 441-451.
53. Pace, H.C.; Brenner, C. The nitrilase superfamily: classification, structure and function. *Genome Biol.* 2001, 2
54. O'Reilly, C.; Turner, P.D. The nitrilase family of CN hydrolysing enzymes – a comparative study. *J Appl Microbiol.* 2003, 95, 1161–1174.
55. Nakai, T.; Hasegawa, T.; Yamashita, E.; Yamamoto, M.; Kumasaka, T.; Ueki T. Crystal structure of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to amidohydrolases. *Structure.* 2000, 8, 729–737.
56. Novo, C.; Farnaud, S.; Tata, R.; Clemente, A.; Brown, P.R. Support for a three-dimensional structure predicting a Cys-Glu-Lys catalytic triad for *Pseudomonas aeruginosa* amidase comes from site-directed mutagenesis and mutations altering substrate specificity. *Biochemical J.* 2002, 365, 731–738.
57. Singh, R.; Banerjee, A; Kaul, P.; Barse, B.; Banerjee, U.C. Release of an enantioselective nitrilase from *Alcaligenes faecalis* MTCC 126: a comparative study. 2005, 6, 415–424.
58. Kobayashi, M.; Shimizu, S. Nitrile hydrolases., *Current Opinion in Chemical Biology.* 2000, 4, 95–102.
59. Banerjee, A.; Sharma, R.; Banerjee, U. The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biiotechnol* 20002, 60, 33–44.
60. <http://goldbook.iupac.org> (04.07.2022.)

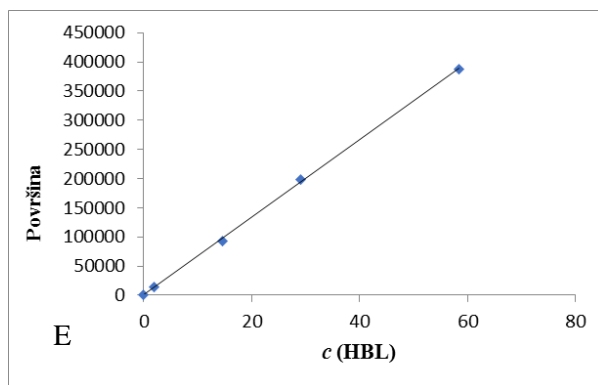
61. Brooks, W.H.; Guida, W.C.; Daniel, K.G. The Significance of Chirality in Drug Design and Development Current Topics in Medicinal Chemistry. 2011, 11, 760-770.
62. Teo, S.K.; Colburn, W.A.; Tracewell, W.G.; Kook, K.A.; Stirling, D.I.; Jaworsky, M.S.; Scheffler, M.A.; Thomas, S.D.; Laskin, O.L. "Clinical pharmacokinetics of thalidomide", Clin Pharmacokinet. 2004, 43.
63. Caprio, V.; Williams, J.M.J. Catalysis in Asymmetric Synthesis, Wiley, Padstow, Cornwall, UK, 2008, 2.
64. Solomons, T.W.; Graham. Organic Chemistry. Hoboken, Wiley, 2011, 191-220.
65. Werpy, T.; Peterson, G. Top Value Added Chemicals from Biomass, Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. 2004, 1.
66. Leung, D.; Kang, S.O.; Anslyn, E.V. Rapid determination of enantiomeric excess: A focus on optical approaches. Chem. Soc. Rev. 2012, 41, 448–479.
67. Lee, S.H.; Park, O.J.; Uh, H.S. A chemoenzymatic approach to the synthesis of enantiomerically pure (S)-3-hydroxy- γ -butyrolactone. Appl Microbiol Biotechnol. 2008, 79, 355-362.
68. Dhamankar, H.; Tarasova, Y.; Martin, C.H.; Prather, K.L. Engineering E. coli for the biosynthesis of 3-hydroxy- γ -butyrolactone (3HBL) and 3,4-dihydroxybutyric acid (3,4-DHBA) as value-added chemicals from glucose as a sole carbon source. Metab Eng. 2014, 25, 72-81.
69. Martin, C.H.; Dhamankar, H.; Tseng, H.C.; Sheppard, M.J.; Reisch, C.R.; Prather, K.L. A platform pathway for production of 3-hydroxyacids provides a biosynthetic route to 3-hydroxy- γ -butyrolactone. Nat Commun. 2013, 4
70. Vasić-Rački, Đ.; Findrik Z.; Vrsalović Presečki A. Modelling as a Tool of Enzyme Reaction Engineering for Enzyme Reactor Development, Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011, 91, 845 – 856
71. Roskoski, R. Michaelis-Menten kinetics, u: Enna, S.J.; Bylund, D.B., xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, New York, Elsevier, 2007, 1 – 10.
72. Hegyi, G.; Kardos, J.; Kovács, M.; Málnási-Csizmadia, A.; Nyitray, L.; Pál, G.; Radnai, L.; Reményi, A.; Venekei, I. Introduction to Practical Biochemistry, ELTE TTK, Budimpešta. 2013, 121 – 139
73. Sharma, R. Enzyme Inhibition and Bioapplications, InTech, Rijeka. 2012, 3 – 5.
74. Z. Gomzi, Kemijski reaktori, Zagreb:HINUS, 2009 (udžbenik)
75. Keskin, T. Biohydrogen, Biohydrogen Production From Solid Wastes. 2019, 321–346.
76. MLA (7th ed.) Harvey, D. Modern Analytical Chemistry. Boston: McGraw-Hill, 2000.

77. Eiceman GA. Gas Chromatography: Introduction. U: Meyers RA. Encyclopedia of analytical chemistry: Applications, theory and instrumentation. 15th ed. New York: Wiley; 2001. 11298-7 p.
78. Sutlović, D.; Marušić, J.; Stipišić, A.; Poljak, V.; Laštre Primorac, D.; Majić, Z.; Luetić, S.; Knezović, Z.; Papić, J.; Žafran Novak, J. Toksikologija hrane, Split, Redak, 2011, 1-314
79. Radić, NJ.; Kukoč Modun, L. Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Zagreb, 2016.
80. Bansal, V.; Malviya, R.; Pal, O.P.; Sharma, P.K. High performance liquid chromatography: a short review, Journal of Global Pharma Technology. 2010, 2, 22-26.
81. Česnik, M. Mathematical modelling and optimization of enzymatic cascades for the synthesis of industrially valuable products. Doctoral thesis. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2019.
82. Mehta, A.; Oeser, A.M.; Carlson, M.G.; Rapid quantitation of free fatty acids in human plasma by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B.*, 1998, 719(1-2), 9-23.

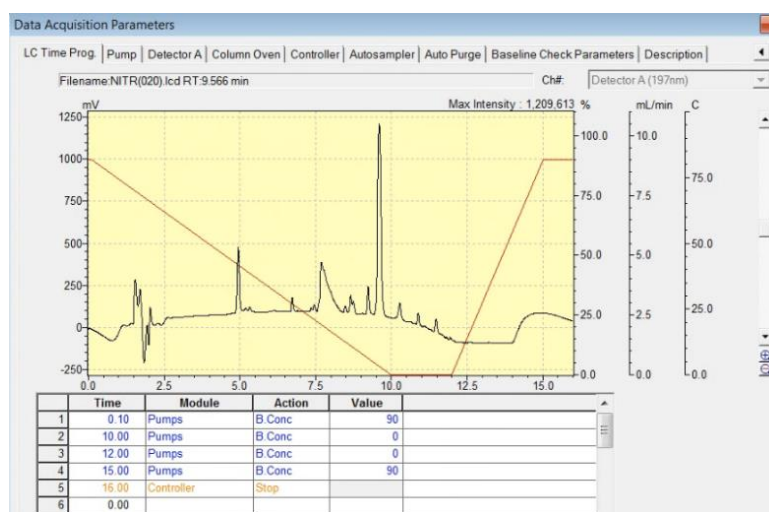
7. PRILOZI

Prilog 1. Prikaz **A.** kromatograma i baždarnih pravca za GC analizu **B.** (*R*)-3-hidroksi- γ -butirolaktona (HBL) i **C.** (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila (KHB), te **D.** kromatograma i baždarnog pravca za HPLC analizu **E.** (*R*)-3-hidroksi- γ -butirolaktona (HBL)

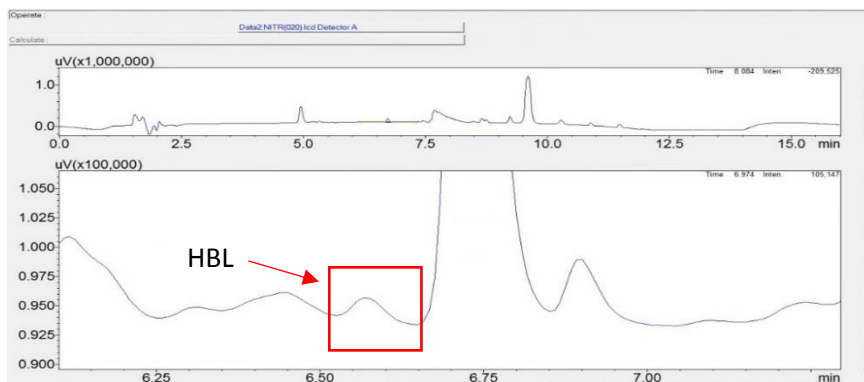




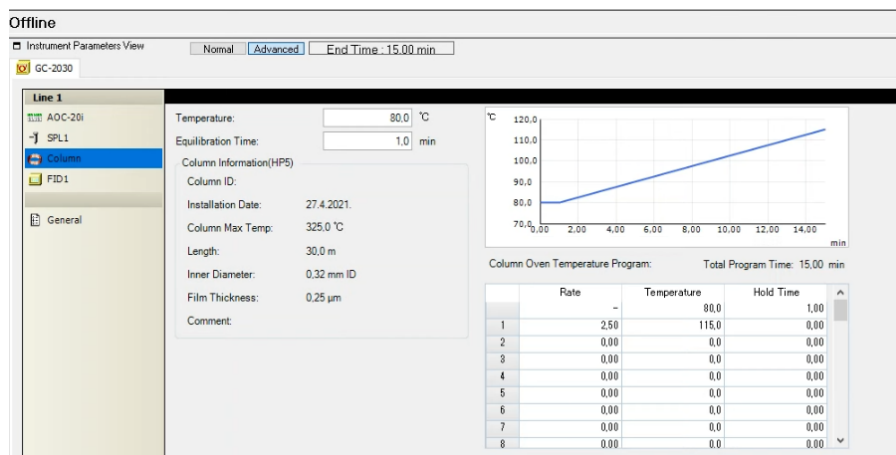
Prilog 2. Prikaz odabranih uvjeta metode za HPLC analizu nakon optimiranja



Prilog 3. Kromatogram dobiven HPLC analizom prilikom evaluacije enzima



Prilog 4. Prikaz odabranih uvjeta metode za GC analizu nakon optimiranja



Prilog 5. Kromatogram dobiven GC analizom prilikom evaluacije enzima

