

Sinteza cijanoalkohola katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom

Mateša, Lorena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:352899>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Lorena Mateša

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Lorena Mateša

SINTEZA CIJANOALKOHOLA KATALIZIRANA
HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZOM

DIPLOMSKI RAD

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

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

Doc. dr. sc. Martina Sudar

Prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, lipanj 2021.

SAŽETAK

Enzimi su biokatalizatori prisutni u mikroorganizmima, a djeluju poput anorganskih katalizatora. Njihova uporaba osigurava niz prednosti, poput odvijanja reakcija u blažim uvjetima te smanjenje nastanka štetnih nusprodukata. Halogenhidrin-dehalogenaze su enzimi koji kataliziraju reakciju dehalogenacije haloalkohola uz stvaranje epoksida, kao i reverzibilnu reakciju, reakciju otvaranja epoksidnog prstena s nukleofilima.

U ovom je radu ispitana reakcija otvaranja epoksidnog prstena 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana, kataliziranu C tipom halogenhidrin-dehalogenaze HheC-W249P uz natrijev cijanid kao nukleofil, u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru. Reakcija je praćena uporabom HPLC analize, a aktivnost enzima je praćena spektrofotometrijski. Osim reakcije otvaranja epoksidnog prstena, istraživane su i reakcija hidrolize epoksida i kemijska reakcija otvaranja epoksidnog prstena.

Reakciju je moguće provesti i u kotlastom reaktoru i u mikroreaktoru. U kotlastom reaktoru količina nastalog produkta se povećava s vremenom odvijanja reakcije. U mikroreaktoru, najviše produkta nastane pri najvećem vremenu zadržavanja, ali tada se epoksid troši i sporednim reakcijama. Brzina deaktivacije enzima se povećava porastom prostornog vremena zadržavanja.

Ključne riječi: biokataliza, enzimi, halogenhidrin-dehalogenaza, mikroreaktori, epoksidi, β -hidroksi nitrili

ABSTRACT

Enzymes are biocatalysts present in microorganisms and act like inorganic catalysts. Their usage provides a number of benefits, such as reactions in milder conditions and a reduction in occurrence of harmful by-products. Halohydrin dehalogenases are enzymes that catalyze dehalogenation of haloalcohols to form epoxides, as well as the reversible reaction, the ring-opening reaction with nucleophiles.

In this work, the ring-opening reaction of 2-(4-trifluoromethyl)phenyl oxirane with sodium cyanide as nucleophile, catalyzed by C-type halohydrin dehalogenase HheC-W249P, in batch reactor and microreactor, was investigated. The reaction was monitored using HPLC analysis and the enzyme activity was monitored spectrophotometrically. In addition to epoxy ring-opening reaction, the hydrolysis reaction of epoxide and the chemical ring opening reaction of epoxide were also tested.

The reaction can be carried out in both the batch reactor and the microreactor. In the batch reactor, the amount of the product formed increases with the reaction time. In the microreactor, the highest amount of product formed was observed at highest retention time, but then the epoxide is consumed in side reactions. Also, enzyme deactivation rate increases with increase of retention times in the microreactor.

Key words: Biocatalysis, enzymes, halohydrin dehalogenases, microreactor, epoxides, β -hydroxy nitriles



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

Sadržaj	
1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Enzimi.....	2
2.1.1 Djelovanje enzima.....	3
2.1.2. Nomenklatura enzima.....	5
2.1.3. Biokataliza i primjena.....	6
2.2. Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH).....	7
2.2.1. Reakcijski mehanizam.....	8
2.2.2. Podjela HHDH.....	10
2.2.3. Primjena.....	11
2.3. Epoksidi.....	12
2.4. β -hidroksi nitrili.....	12
2.5. Kotlasti reaktor.....	13
2.6. Mikroreaktori.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1. Aparatura i kemikalije.....	17
3.1.1. Reakcijski sustav.....	17
3.1.2. Kapljevinski kromatogram visoke djelotvornosti.....	18
3.1.3. Spektrofotometar.....	19
3.1.4. Ostala aparatura.....	20
3.1.5. Kemikalije.....	20
3.2. Analitičke metode.....	21
3.2.1. Analiza uzoraka kapljevinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.....	21
3.3. Provođenje reakcije u kotlastom reaktoru.....	22
3.4. Provođenje reakcije u mikroreaktoru.....	24
3.5. Određivanje aktivnosti enzima spektrofotometrijskim testom.....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	28
4.1. Biotransformacija 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom u kotlastom reaktoru.....	28
4.2. Biotransformacija 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom u mikroreaktoru.....	32
5. ZAKLJUČAK.....	38

6. POPIS SIMBOLA.....	40
7. LITERATURA.....	42
8. PRILOZI.....	49

1. UVOD

Biokataliza je općeniti izraz za pretvorbu prirodnih i neprirodnih spojeva s enzimima, te se odnosi na korištenje enzima i mikroorganizama u kemiji.¹ Biokataliza uz pomoć enzima omogućuje svim oblicima života, od najmanjih mikroorganizama do ljudi, da obavljaju aktivnosti karakteristične svome načinu života kao i interakcije s drugim živim bićima i okolišem. U području ljudskih inovacija za poboljšanjem kvalitete života, biokataliza već ima velik utjecaj te je uvelike doprinijela rastućem broju katalitičkih transformacija usmjerenih na otkrivanje i analizu spojeva, biokonverziju polaznih materijala te pripremu ciljanih spojeva u bilo kojem mjerilu, od malih laboratorijskih razmjera do velikih industrijskih.²

U zadnja dva desetljeća uporaba biokatalize je značajno potaknuta s gledišta potrebe za učinkovitim i isplativim tehnologijama pretvorbe obnovljive biomase u kemikalije i biogoriva kako bi se postigla zelena ekonomija.³ Primjena biokatalize je dala održive tehnologije i selektivne enzime koji su doveli do prijelaza kemijskih procesa prema onima koji su neutralni za okoliš. Enzimi prihvaćaju široki spektar kompleksnih molekula, uključujući i sintetske molekule sa strukturom drugačijom od one koja postoji u prirodi. Praktična upotreba enzima kao bioloških katalizatora je pokrenuta radi njihove svestranosti, regio-, kemo- i enantioselektivnosti, zajedno s potrebom da kemijska industrija prijeđe na ekološki kompatibilne katalizatore i procese.¹ Održivost procesa se odnosi na korištenje sirovina i energije, nastali otpad, sigurnost i stabilnost proces i kvalitetu proizvoda. Ovi se čimbenici često prevode u smanjenje troškova proizvodnje te doprinose poboljšanju konkurentnosti, pogotovo u visoko reguliranim državama. Poboljšanja procesa poput povećanja prinosa i smanjenje u potrošnji sirovina, emisija i otpadu rezultiraju smanjenjem troškova procesa što bioprocima daje prednost naspram tradicionalnih kemijskih puteva.⁴

Industrijska biokataliza je također doživjela revolucionarne promjene od početka korištenja. Napretci u sekvenciranju genoma zajedno s uporabom moćnih računalnih alata za identifikaciju homologije sekvenci enzima poznatih funkcija, su omogućili veću dostupnost enzima. Otkrića novih enzima i novih enzimskih reakcija bi se u budućnosti mogla povećati razvojem promiskuitetne katalitičke aktivnosti enzima. Dodatno, imobilizacija enzima omogućava isplativu primjenu u zahtjevnim procesnim uvjetima. Dostupnost enzima s prihvatljivom cijenom i mogućnost pripreme boljih enzima usmjerenom evolucijom zajedno s ekonomičnom regeneracijom kofaktora razlog je širenja biokatalize u područja u kojima dominiraju katalizatori od plemenitih metala.³

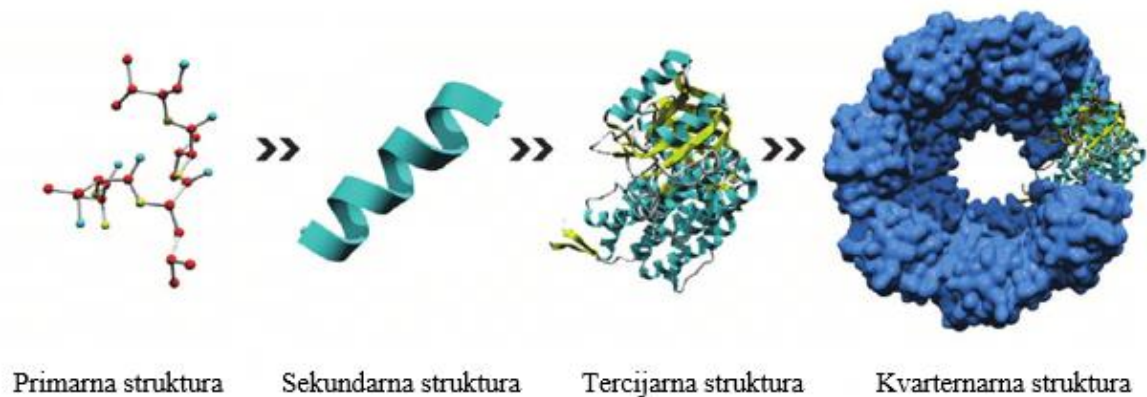
2.OPĆIDIO

2.1. Enzimi

Enzimi, odnosno biološki katalizatori, su tvari koje ubrzavaju biokemijske procese u živim organizmima. Oni su proizvodi žive stanice, a po kemijskom su sastavu bjelančevine, iako među njima ima i katalitičkih ribonukleinskih kiselina (ribozimi).⁵ Tvari su biološkog porijekla koje ubrzavaju kemijske reakcije potrebne za održavanje životnih funkcija. Enzimi ne djeluju samo u živim organizmima (*in vivo*) nego i izvan njih, primjerice u laboratorijskim posudama. Oni se stoga industrijski proizvode i upotrebljavaju kao izvanredno efektivni katalizatori.⁶ Enzimi su godinama zvani fermenti, izraz koji je izveden iz latinske riječi za kvasac. Taj je naziv 1878. godine zamijenjen imenom enzim, od grčke riječi značenja u kvascu.⁷ Iako su neki enzimi već bili otkriveni, važnost enzima u živućim sustavima je 1897. godine otkrio je njemački kemičar Eduard Büchner, pokazavši da filtrat razbijenih stanica kvasca može dovesti do pretvorbe šećera u ugljični dioksid.⁸ Njegovo je otkriće dovelo do spoznaje da se fermentacija šećera može odvijati i u odsutnosti živih stanica kvasca, a enzim koji je doveo do fermentacije je nazvan zimazom.⁹ Od tada je otkriveno više od 1000 enzima, svaki specifičan određenoj kemijskoj reakciji koja se odvija u živim organizmima.⁸

Enzimi su proteinske makromolekule molekulske mase 10 000-100 000 g/mol.¹⁰ U građu proteina ulazi dvadeset različitih gradivnih jedinica, aminokiselina, međusobno spojenih peptidnom vezom u lance od nekoliko desetaka do mnogo tisuća aminokiselina. Redoslijed aminokiselina se naziva primarnom strukturom.¹¹ Od 20 primarnih aminokiselina, stanica može proizvesti tisuće različitih proteina, svaki sa specifičnim kemijskim i biološkim funkcijama. Redoslijed aminokiselina je vrlo bitan, a određen je nukleotidnom sekvencom gena koji kodira taj enzim.¹⁰ Redoslijed te kemijska i fizikalna svojstva bočnih lanaca aminokiselina određuju višu strukturu polipeptidnog lanca.¹² Sljedeći nivo strukture proteina jest sekundarna struktura, a ona se odnosi na međusobni raspored polipeptidnih lanaca. Najčešći tipovi sekundarnih struktura su α -uzvojnice i β -strukture. Obje strukture zadržavaju svoj oblik zbog vodikovih veza kojima su povezane aminokiseline i koje ih stabiliziraju.^{11,13} Sveukupna trodimenzionalna struktura polipeptida se naziva tercijarna struktura. Tercijarnoj strukturi pridonose razne nekovalentne veze, poput vodikovih veza, dipol-dipol interakcija te Londonovih disperzijskih veza. Tercijarnoj strukturi doprinosi i poseban oblik kovalentne veze: disulfidna veza. Disulfidne veze drže dijelove polipeptida snažno vezane jedno za drugo.¹² Nekoliko identičnih ili različitih polipeptidnih lanaca se mogu povezati i na taj način stvoriti pravi protein.

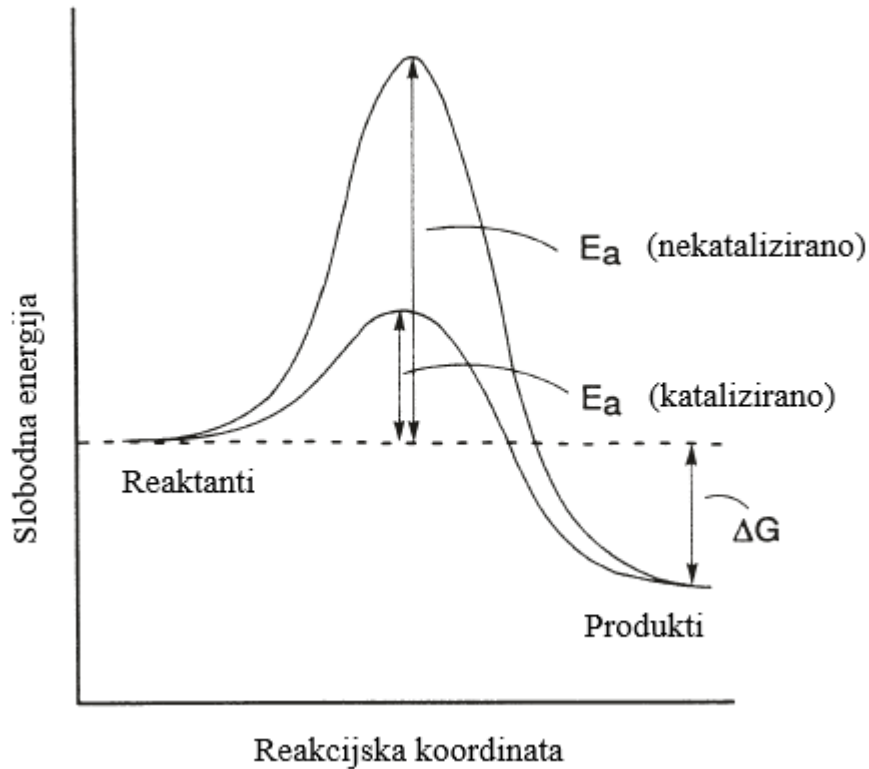
Kompletna trodimenzionalna struktura, uključujući međudjelovanja između polipeptidnih lanaca, se naziva kvarternarna struktura.¹³



Slika 1. Struktura enzima¹⁴

2.1.1 Djelovanje enzima

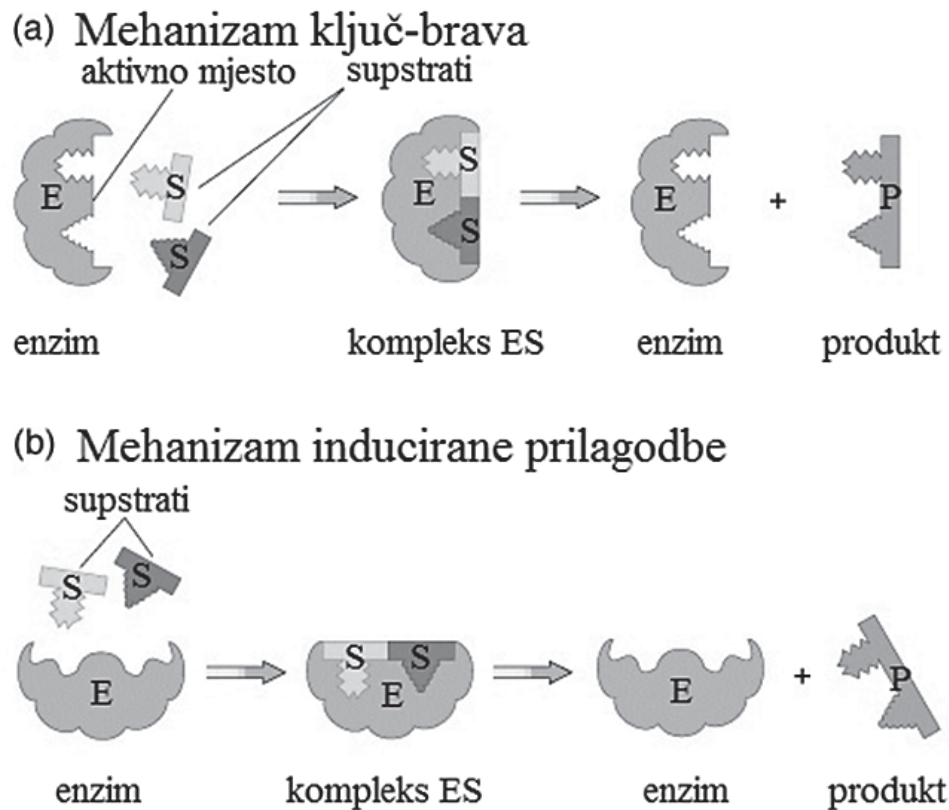
Enzimi, poput kemijskih katalizatora, ubrzavaju brzinu kemijske reakcije snižavanjem njene aktivacijske energije (E_a).¹⁵ Enzimi uvelike povećavaju vjerojatnost odvijanja kemijske reakcije svojom sposobnošću da veliki broj molekula supstrata učine reaktivnijima. Tako više molekula postigne prijelazno stanje te je kemijska transformacija ubrzana. Enzimi povećavaju brzinu reakcije te, kao i ostali katalizatori, ne mijenjaju ukupnu promjenu energije reakcije niti ravnotežnu konstantu te iz reakcije izlaze nepromijenjeni. Enzimi su djelotvorniji od većine anorganskih katalizatora te pokazuju visoku specifičnost prema svojim supstratima, katalizirajući samo određenu vrstu kemijske reakcije.¹⁶



Slika 2. Shematski prikaz reakcijskog mehanizma nekatalizirane i katalizirane reakcije ¹²

Da bi enzim djelovao, on mora doći u fizički dodir sa supstratom. Enzimi su vrlo velike molekule, dok su supstrati na koje enzim djeluje male. Zbog ove razlike u veličini, samo dio enzima je u kontaktu sa supstratom. Područje kontakta se zove aktivno mjesto. Kemijske veze koje privlače supstrat do površine enzima mogu biti fizikalne ili kemijske prirode.⁷ Emil Fischer je 1894. godine predložio model koji bi opisao djelovanje enzima, a nazvan je teorija brave i ključa. Ideja ove teorije je da se djelovanje enzima na supstrat može opisati prema ključ-brava analogiji. Prema analogiji, enzim je brava, a supstrat je ključ. Enzimsko djelovanje se odvija samo kada se odgovarajući oblik ključa, odnosno supstrata, uklapa u bravu, odnosno na aktivno mjesto enzima.¹⁷ Kasnije se pokazalo da aktivno mjesto enzima nije komplementarno supstratu, već prijelaznom stanju, onom obliku koji supstrat mora poprimiti prilikom prelaska u produkt. Kataliza rezultira selektivnim stabiliziranjem prijelaznog stanja u odnosu na osnovno te dolazi do ubrzanja reakcije.¹⁸ Osnovni koncept Fischerove teorije je zahtijevao preinake kako bi se objasnile nedosljednosti. Nova teorija, teorija pobuđene prilagodbe, uključuje Fischerov koncept komplementarnosti enzima i supstrata, ali pretpostavlja fleksibilnost enzima.¹⁹ Prema ovoj hipotezi, međudjelovanje enzima i supstrata je analogno prilagodbi rukavice ruci prilikom nošenja. Promjene u trodimenzionalnom obliku aktivnog mjesta su uzrokovane supstratom i

njegovim vezanjem. Molekule koje ne odgovaraju aktivnom mjestu i koje nisu supstrati za odabrani enzim, u drugu ruku, neće moći izazvati potrebnu promjenu aktivnog mjesta.²⁰



Slika 3. Mehanizam djelovanja enzima a) ključ-brava teorija; b) teorija inducirane prilagodbe²¹

Neki enzimi mogu djelovati samo u prisutnosti takozvanih kofaktora. Kofaktor je dodatna, neproteinska komponenta enzimske reakcije koja se određenim slučajevima može kemijski promijeniti tijekom reakcije. Kofaktori mogu biti male organske molekule, tzv. koenzimi, ili mogu biti metali i metalni ioni.²²

2.1.2. Nomenklatura enzima

Prvo ime enzima, predloženo 1833. godine, je bilo diastaza. Francuski mikrobiolog i kemičar Émile Duclaux je predložio da se svi enzimi imenuju dodatkom sufiksa *-aza* na korijen koji opisuje prirodu supstrata kojeg enzim katalizira. Enzimi su danas klasificirani prema supstratima i prirodi reakcije koju kataliziraju.⁷ Internacionalna unija za biokemiju i molekularnu biologiju (eng. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology – IUBMB*) je predložila sustav imenovanja prema kojem se svakom enzimu pripiše deskriptivno

ime i broj koji omogućava njegovu nedvosmisleni identifikaciju. Prema ovoj klasifikaciji, enzimi su podijeljeni u šest glavnih grupa obzirom na vrstu reakciju koju kataliziraju. Svaka je grupa podijeljena u podgrupe i pod-podgrupe.¹⁶ Glavne kategorije su sljedeće:

1. Oksidoreduktaze – uključene u izmjenu elektrona
2. Transferaze – prenose kemijsku grupu s jedne molekule na drugu
3. Hidrolaze – uključuju reakcije hidrolize
4. Liaze – stvaraju dvostruku vezu
5. Izomeraze – prenose grupu unutar molekule kako bi formirale izomer
6. Ligaze – povezuju stvaranje raznih kemijskih veza s razgradnjom pirofosfatne veze u adenzin trifosfatu.²³

2.1.3. Biokataliza i primjena

Enzimi kataliziraju kemijske reakcije s velikom specifičnošću i ubrzanjem reakcije. Takve su reakcije osnova metabolizma svih živih bića te predstavljaju ogromne mogućnosti za primjenu u industriji kako bi se provodile učinkovite i ekonomične biokatalitičke pretvorbe. U širem smislu, enzimska tehnologija se može smatrati kao primjena slobodnih enzima ili cijelih stanica kao biokatalizatora u proizvodnji dobara.²⁴ Enzimi pronađeni u prirodi su od davnina korišteni za proizvodnju prehrambenih proizvoda, poput sireva, kruha, piva vina i octa te u proizvodnji roba kao što je koža, indigo i lan. Ovi su se procesi oslanjali na enzime dobivene iz mikroorganizama ili su već bili prisutni u pripravcima.²⁵

Biokataliza se pokazala kao sposobna i održiva interdisciplinarna tehnologija. Prvi val njene primjene počeo je kada su znanstvenici otkrili da cijele žive stanice mogu provesti kemijske pretvorbe, poput proizvodnje prekursora L-efedrina. U drugom valu, krajem 20-tog stoljeća, ispitivanje enzima i supstrata te početne tehnologije proteinskog inženjersva su omogućile širenje raspona supstrata na neprirodne spojeve. Treći val je započeo s usmjerenom evolucijom, odnosno s novim načinima opsežnih modifikacija biokatalizatora. Trenutno idemo prema četvrtom valu gdje proteinsko inženjersvo dopušta pristup novim i neprirodnim reakcijama.²⁰

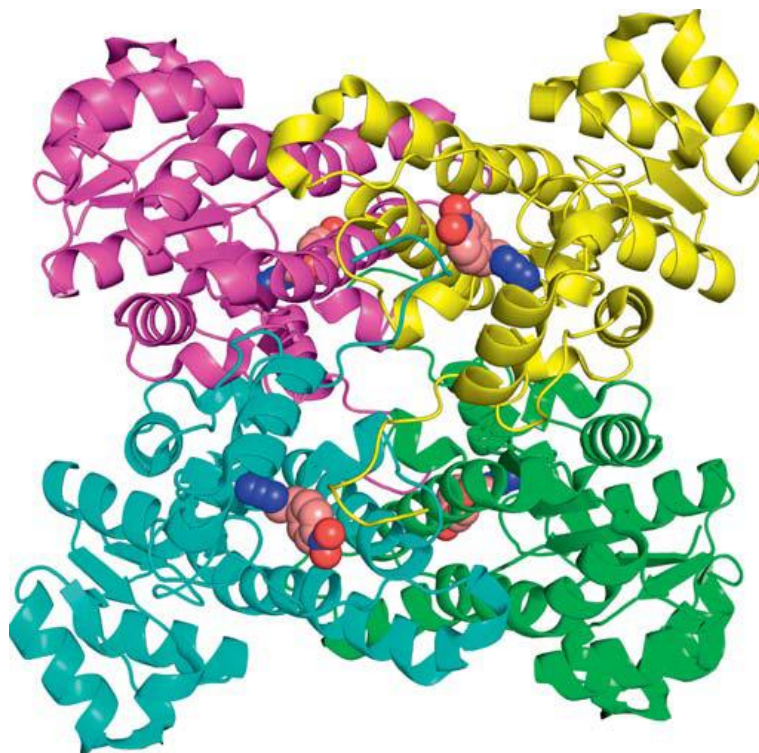
Zahvaljujući svim znanstvenim otkrićima u razvoju enzima i proteinskom inženjersvu te prednostima zelene kemije, sve je više molekula sintetizirano korištenjem enzima te se biokatalizatori sve više koriste kao korak u sintetičkim putevima proizvodnje kompleksnih molekula od industrijskog interesa.^{26,27} Od oko 3000 poznatih enzima, industrijski ih je

iskorišteno samo 150-170. U ovoj zelenoj eri je samo 5% kemijskih proizvoda proizvedeno biološkim putem.¹⁵ Iako postoji interes za korištenjem biokatalizatora u proizvodnji kemikalija manje vrijednosti, njihova najveća uloga ostaje u farmaceutskom sektoru.²⁷ Biokatalizatori pružaju novi način sinteze kompleksnih molekula gdje njihova regioselektivna, kemoselektivna i stereoselektivna svojstva omogućavaju zaobilazak teških sintetskih puteva.²⁸ Korištenje biokatalize u proizvodnji farmaceutika se povećalo kako bi proizvodni procesi postali održivi i zeleniji. Prednosti njene primjene uključuju kraći sintetski put, odvijanje u blagim uvjetima, izbjegavanje korištenja toksičnih reagenasa, manje stvorenih nusproizvoda i otpada te se mogu postići velika iskorištenja.²⁹ Reakcije se također mogu provoditi pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku čime se izbjegavaju ekstremni uvjeti i moguće neželjene reakcije. Zbog visoke enantioselektivnosti i regioselektivnosti enzima, biokatalitički procesi imaju veliku važnost u sintezi čistih enantiomera kiralnih intermedijera. Mogućnost modifikacije enzimske aktivnosti i proizvodnja enzima prekomjernom ekspresijom čini enzimski katalizirane procese ekonomski isplativima.³⁰ Enzimi korišteni u svrhu biokatalize predstavljaju ograničen udio u globalnom tržištu enzima, koje je 2015. godine iznosilo 8.18 milijardi dolara, a očekuje se da će dostići 17.50 milijardi dolara do 2024. godine. Enzimi korišteni za industrijske svrhe predstavljaju 56.9% ukupnog svjetskog tržišta enzima, što odgovara 4.9 milijardi dolara.³¹

2.2. Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH)

Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH) su biotehnološki važni enzimi koji kataliziraju reverzibilnu reakciju dehalogenacije haloalkohola uz stvaranje epoksida.³² Prirodna uloga ovih bakterijskih enzima je metabolizam spojeva koji posjeduju vicinalnu halohidrin skupinu ili supstrata koji se razgrađuju preko međuprodukata koji imaju tu funkcijsku grupu.³³ Halogenhidrin-dehalogenaze (EC 4.5.1)³⁴ se također mogu pronaći u literaturi kao haloalkohol-dehalogenaze, halohidrin-epoksidaze ili hidrogen-halid-liaze.³⁵ Filogenetski, halogenhidrin-dehalogenaze pripadaju superobitelji kratkolančanih dehidrogenaza/reduktaza (eng. *Short-chain dehydrogenase/reductase*, SDR) s kojima dijele nekoliko strukturnih i mehanističkih značajki.³⁶ Enzim funkcionira kao homotetramer s podjedinicama veličine 28 000 g/mol. Struktura halogenhidrin-dehalogenaze pokazuje da svaka podjedinica nalikuje na Rossmannov nabor koji je tipičan za SDR obitelj. Aktivno se mjesto nalazi šupljini okruženoj petljama koja sadrži katalitičku trijadu.³⁷ Za razliku od ostalih SDR enzima, halogenhidrin-dehalogenaze ne kataliziraju redoks reakcije i ne sadrže nikotinamidni kofaktor. Umjesto mjesta za vezanje kofaktora, posjeduju prostrani džep za vezanje nukleofila.³⁸ Slično

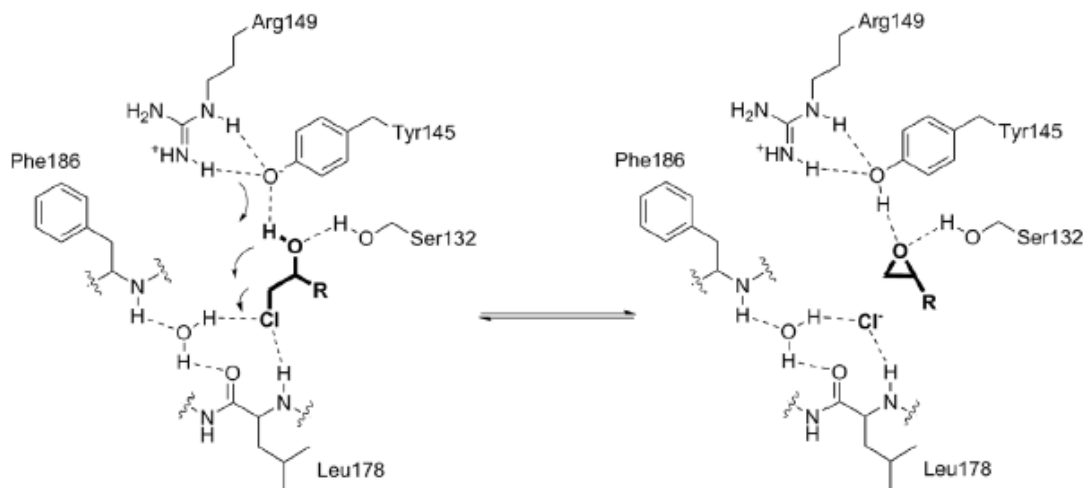
SDR proteinima, halogenhidrin-dehalogenaze za katalizu reakcija koriste sličnu katalitičku trijadu serin-tirozin-lizin/arginin.³⁹



Slika 4. Struktura halogenhidrin-dehalogenaze⁴⁰

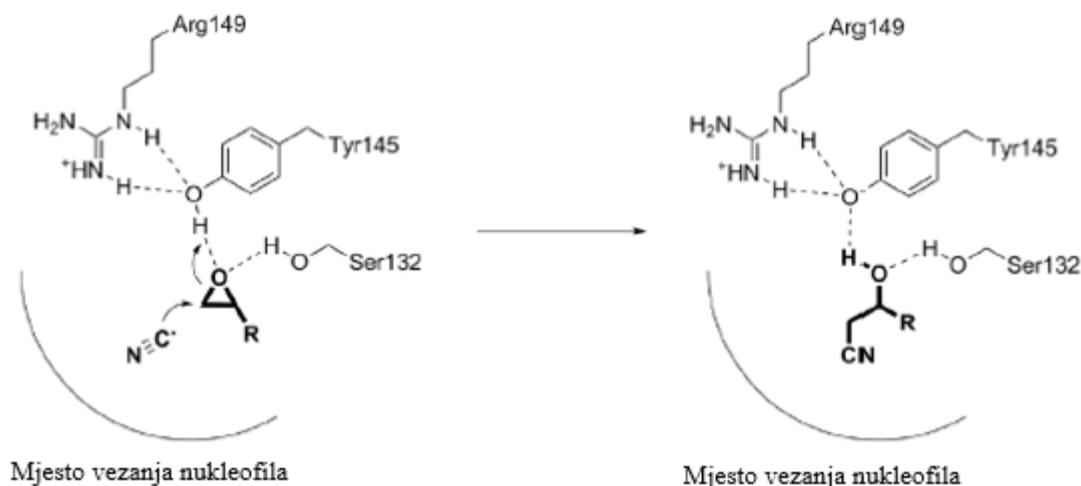
2.2.1. Reakcijski mehanizam

U reakciji zatvaranja epoksidnog prstena, vicinalni haloalkohol se veže u blizini Ser132-Tyr145-Arg149 katalitičke trijade, a njegova je hidroksilna grupa u interakciji sa Ser-132 i Tyr145. Halogen je vezan na mjestu vezanja halida.⁴¹ Tyr-145 deprotonira hidroksilnu skupinu na haloalkoholu kako bi proizveo intramolekularni nukleofil koji reagira s vicinalnim ugljikom i zamjenjuje halogen čime nastaju epoksid i halidni ion. Deprotonacija hidroksilne funkcionalne skupine haloalkohola je potpomognuta Arg-149, koji smanjuje pK_a Tyr-145 i Ser-132 i tako stabilizira parcijalni negativni naboj koji nastane na kisiku hidroksilne skupine haloalkohola.⁴⁰



Slika 5. Shema mehanizma reakcije dehalogenacije³⁶

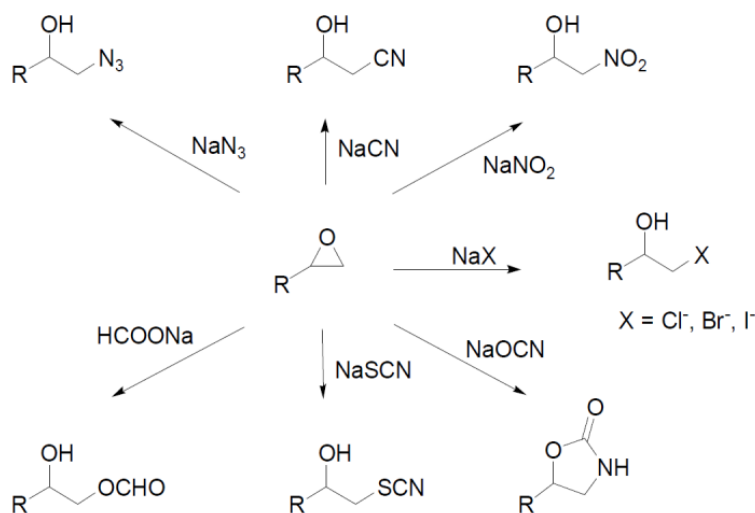
Mjesto vezanja halida halogenhidrin-dehalogenaze može smjestiti male negativno nabijene ione poput azida, cijanida i nitrita. Ovi ioni mogu zamijeniti halidne ione u reverznoj reakciji enantioselektivnog i regioselektivnog otvaranja epoksidnog prstena. Nukleofilni napad halidnog ili nekog malog, negativno nabijenog iona, zajedno s protoniranjem kisika dovodi do stvaranja ugljik-halogen veze, ili veze s nukleofilom s kojim se odvija reakcija, te hidroksilne skupine.⁴² Serin veže atom kisika epoksidnog prstena smanjujući tako barijeru za otvaranje prstena. Tirozin donira proton epoksidu, a arginin ga kao kiselina aktivira. Potom, nukleofil napada C β -atom što rezultira nastankom odgovarajućeg β -supstituiranog alkohola.⁴³



Slika 6. Shema mehanizma reakcije otvaranja epoksidnog prstena³⁶

U reakcijama otvaranja epoksidnog prstena, halogenhidrin-dehalogenaze mogu prihvatiti razne neprirodne anionske nukleofile, poput azida, cijanida, nitrita, cijanata, tiocijanata i formijatnog aniona. Pretvorbe s navedenim nukleofilima dovode do stvaranja novih ugljik-halogen, ugljik-kisik, ugljik-sumpor te ugljik-ugljik veza. Produkti stvoreni tijekom reakcije otvaranja

epoksidnog prstena su u velikom enantiomernom višku te je moguće postići visoke prinose. Zbog ovih svojstava, enzim može pronaći široku primjenu u proizvodnji enantiočistih β -alkohola iz epoksida.⁴⁴



Slika 7. Promiskuitet halogenhidrin-dehalogenaze⁴⁵

2.2.2. Podjela HHDH

Halogenhidrin-dehalogenaze su vrlo rijetke u prirodi i dosad su pronađene samo u bakterijama. Do 2013. godine, mali broj različitih HHDH enzima je karakteriziran i izoliran: *hheA* iz *Corynebacterium* sp. soj N-1074, *hheA2* iz *Arthrobacter* sp. soj AD27, *hheB* iz *Corynebacterium* sp. soj N-1074, *hheB2* iz *Mycobacterium* sp. soj GP17 te *hheC* identificiran u *Agrobacterium radiobacter*, soj AD1 i *Rhizobium* sp. soj NHG3. Podijeljeni su u tri filogenetska podtipa, A, B i C, prema homologiji sekvenci i specifičnostima supstrata. Nedavno je ta klasifikacija proširena s podtipovima od D do G.⁴⁶ Od otkrivenih enzima, HheC iz *A. radiobacter* AD1 je najviše proučavan zbog izvanredne enantioselektivnosti te se najviše koristi, u procesima poput kinetičke rezolucije epoksida čime se dobivaju optički čisti epoksidi i odgovarajući supstituirani haloalkoholi.⁴⁷ Halogenhidrin-dehalogenaza iz *Arthrobacter* sp. AD2 (HheA) ima sličnu tercijarnu i kvarternarnu strukturu kao HheC, ali ima otvorenije aktivno mjesto.⁴⁸ Ovo odgovara činjenici da HheA preferira C4-C5 halohidrine kao supstrate, do HheC preferira kratkolančane C2-C3 supstrate. HheA enzim pokazuje slabu do umjerenu *S*-enantioselektivnost u reakcijama dehalogenacije i otvaranju epoksidnog prstena. Zbog ovog svojstva bi bio od velikog interesa za primjenu u asimetričnoj sintezi.⁴⁹ HheG iz *Ilumobacter coccinues* je prva halogenhidrin-dehalogenaza koja pokazuje sintetički korisnu aktivnost s

cikličkim epoksidima. Strukturna analiza pokazuje da HheG ima aktivno mjesto u širokom, otvorenom rascjepu, za razliku od ostalih HDDH kojima je aktivno mjesto teško dostupno. Korištenjem ovog enzima u reakcijama stereoselektivnog otvaranja epoksidno prstena cikličkih epoksida, mogu se dobiti razni β -supstituirani alkoholi koji su korisni intermedijeri za dobivanje farmaceutika.⁵⁰

2.2.3. Primjena

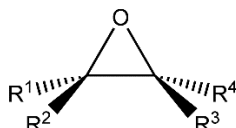
Zbog katalitičke svestranosti koju posjeduju, halogenhidrin-dehalogenaze postaju vrijedni multifunkcionalni biokatalizatori koji se mogu koristiti u različite svrhe. Osim što su visoko učinkoviti katalizatori koji pokazuju izvrsna kemo-, regio- i stereoselektivna svojstva, korištenje enzima ima mnoge prednosti sa stajališta razvoja zelenih, održivih procesa. Halogenhidrin-dehalogenaze djeluju u blagim uvjetima s vodom kao preferiranim reakcijskim medijem. Proizvode se iz obnovljivih materijala te su netoksični i biorazgradivi.⁵¹

Prirodna uloga halogenhidrin-dehalogenaze je bakterijska razgradnja halogeniranih spojeva poput epiklorhidrina ili 1,3-dikloro-2-propanola.⁵² Zajedno s epoksid-hidrolazom, halogenhidrin-dehalogenaza čini učinkovit put razgradnje 1,3-dikloro-2-propanola i epiklorhidrina u netoksične metabolite, koje bakterija može koristiti kao izvor ugljika i energije.⁵³ Industrijski, HDDH se koriste za sintezu kiralnih epiklorhidrina. Epiklorhidrin se koristi kao intermedijer u proizvodnji sintetičkih guma, epoksi smola, kao sirovina u proizvodnji površinski aktivnih tvari, adheziva, insekticida, poljoprivrednih kemikalija i farmaceutika.⁵⁴ Iako su halogenhidrin-dehalogenaze korisne u pripravi enantiočistih epoksida i β -alkohola, njihov najveći biotehnološki potencijal proizlazi iz promiskuitetnih reakcija otvaranja epoksidnog prstena s raznim nukleofilima.⁵² HheC može provesti enantioselektivnu azidolizu aromatskih epoksida u 1,2-azidoalkohole.⁵⁵ Kiralni neracemični 1,2-azidoalkoholi su prekursori širokom spektru 1,2-aminoalkohola kao i mnogim korisnim intermedijerima.⁵⁶ Halogenhidrin-dehalogenazu je moguće koristiti i kao biokatalizator za sintezu tercijarnih alkohola iz 2,2-disupstituiranih epoksida.⁵⁷

Najvažnija komercijalna upotreba halogenhidrin-dehalogenaze je u proizvodnji prekursora (*R*)-4-cijano-3-hidroksibutirata iz etilnog (*S*)-4-kloro-3-hidroksibutirata, a on se koristi za proizvodnju statina, lijeka za snižavanje kolesterola.^{58,59} Atrovastatin je aktivna komponenta lijeka Lipitor čija prodaja prelazi 10 milijardi dolara godišnje.⁶⁰

2.3. Epoksidi

Epoksidi (oksidirani) su ciklički eteri s triatomnim prstenom. Osnovna struktura epoksida sadrži atom kisika vezan za dva susjedna ugljikova atoma. Napetost troatomnog prstena čini epoksid mnogo reaktivnijim od tipičnog acikličkog etera.⁶¹ Osim što je epokside lako pripremiti iz raznolikih početnih spojeva, njihova ih struktura čini podložnima reakciji s velikim brojem reagensa - elektrofila, nukleofila, kiselina, bazama, redukcijskim i nekim oksidacijskim. Reakcija otvaranja prstena se može provesti u neutralnim, lužnatim ili kiselim medijima, iako je poznato da je reakcija ubrzana u prisutnosti kiseline.⁶² Epoksidi, i njihovi odgovarajući vicinalni dioli, su važni kiralni gradivni blokovi, često uključeni u sintezu širokog spektra finih kemikalija i farmaceutskih molekula.⁶³ Glavni izazov u modernoj organskoj kemiji je proizvesti takve spojeve s velikim prinosom te s visokim stereo- i regioselektivnostima⁶⁴, obzirom da je njihova biološka aktivnost vezana samo uz jedan enantiomer, dok drugi enantiomer može biti toksičan.⁶³ Od velike je važnosti razraditi učinkovite i isplative postupke koji omogućuju pripremu ovih kiralnih spojeva u enantiočistom obliku. Jedna metoda je hidrolitička kinetička rezolucija racemičnih epoksida. Ova za okoliš sigurna metodologija je posebno atraktivna jer njena industrijska primjena smanjuje troškove resursa i proizvodnju potencijalno toksičnog otpada. Metoda se bazira na korištenju enzima, posebno epoksid-hidrolaze, koji katalizira reakciju hidrolize epoksida u odgovarajući vicinalni diol.⁶⁵



Slika 8. Opća struktura epoksida

2.4. β -hidroksi nitrili

Reakcija otvaranja epoksidnog prstena s cijanidima, katalizirana halogenhidrin dehalogenazom, daje β -hidroksi nitrile koji su vrlo zanimjivi spojevi u sinteznoj kemiji. β -hidroksi nitrili su važni gradivni blokovi u preparativnim procesima svestranosti nitrilne grupe.⁶⁶ Kiralni β -hidroksi nitrili imaju veliki sintetički potencijal u pripremi optički aktivnih β -hidroksi amida, β -hidroksi kiselina, β -hidroksi estera, diola i aminoalkohola obzirom da je cijano-grupu jednostavnim procedurama lako prevesti u druge funkcionalne grupe.⁶⁷ Stereogenost hidroksilne skupine u ovim spojevima može se koristiti za kontroliranu sintezu novih stereocentara pružajući tako potencijalni diastereoselektivni put do 1,3-diola i

1,3-aminoalkohola, intermedijera za veliki broj prirodnih proizvoda i antibiotika. Enantiomerno čisti β -hidroksi nitrili su pogodni prekursori u sintezi enantiomerno čistih antidepresiva, poput fluoksetina, atomoksetina i nizoksetina.⁶⁸ Priprema β -hidroksi nitrila se provodi reakcijom epoksida s toksičnim anorganskim solima poput HCN, NaCN, KCN, LiCN ili s cijanidom stvorenim prilikom tretiranja aceton cijanohidrina s raznim bazama.⁶⁹ Postoji i nekoliko biokatalitičkih načina njihove pripreme kao što je stereoselektivna mikrobn redukcija β -keto nitrila, rezolucija β -hidroksi nitril acetata ili alkohola katalizirana lipazom i rezolucija β -hidroksi nitrila s nitrilazama.⁷⁰ Alternativna biokatalitička reakcija koja daje β -hidroksi nitrile je otvaranje epoksidnog prstena s cijanidom kao nukleofilom katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom. Ova je reakcija istraživana za sintezu atrovastatina, lijeka za snižavanje kolesterola.⁶⁶

2.5. Kotlasti reaktor

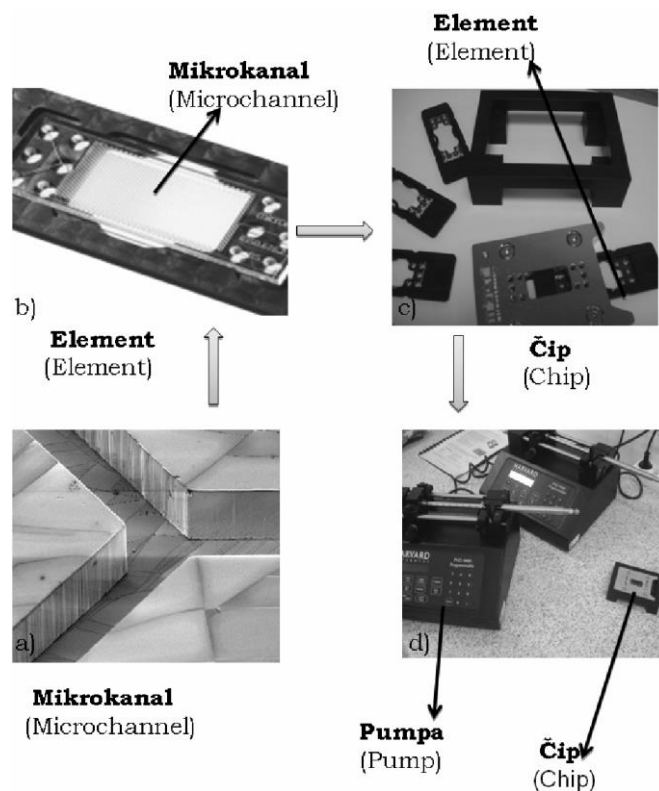
Kotlasti reaktori (eng. *batch reactors*) spadaju u grupu kemijskih reaktora koji su zatvoreni sustavi. Njihova osnovna značajka je u tome što se za vrijeme kemijske reakcije ne izmjenjuje sadržaj, odnosno reakcijska smjesa, s okolinom. Drugim riječima to znači da se sva količina reakcijske mase u kotlastom reaktoru unese na početku reakcije. Reakcija započinje, traje izvjesno vrijeme, završava i tek po završetku, reaktor se prazni. To su reaktori u kojima se kemijske i toplinske promjene zbivaju samo s obzirom na vrijeme, dok su unutar reaktorskog prostora te veličine svuda iste. Konstruktivno su kotlasti reaktori uglavnom valjkaste posude sa zaobljenim dnom i odgovarajućim uređajima za prijenos topline i miješanje. Uz to snabdjeveni su s odgovarajućim cjevovodima i ventilima za unos i izvođenje reakcijske smjese, kontrolnim i mjernim osjetilima, sigurnosnim brtvama, oknima za gledanje itd. Valjkasti oblik reaktora uvjetovan je uglavnom konstruktivnim razlozima, lakšoj proizvodnji, mogućnosti postizanja višeg tlaka, boljim miješanjem kao i čišćenjem.⁷¹ Ovi reaktori mogu varirati u veličini, od manje od 1 L, do reaktora većih od 15 000 L. Obično se proizvode od čelika, nehrđajućeg čelika, stakla, pleksiglasa, keramike, cementa i plastike. Kapljevine i krutine, kao i pare i plinovi, se unose cjevovodima na vrhu poklopca reaktora. Kapljevine i krutine se iz reaktora odvođe cjevovodima na dnu reaktora. Prednosti kotlastog reaktora leže u njegovoj svestranosti. Samo u jednom reaktoru se može odviti niz različitih operacija bez potrebe za prekidanjem. Ovo je posebno korisno kod obrade više sirovina, toksičnih spojeva ili kod proizvodnje različitih nepovezanih proizvoda. Kotlasti se reaktori koriste za razne procese poput otapanja krutine, miješanje produkata, kemijske reakcije, kristalizaciju, ekstrakciju kapljevina-kapljevina te

polimerizaciju. U nekim slučajevima se ne zovu reaktorima, već imaju posebno ime koje odgovara ulozi koju rade, kao što su kristalizeri ili bioreaktori.⁷²

Kotlasti se reaktori, osim za reakcije u kapljevitom sustavu, koriste i za provedbu reakcija u heterogenom sustavu kapljevine-krti katalizator koji je suspendiran u reakcijskoj smjesi malog promjera čestica. Kotlasti su reaktori po nekim svojim značajkama prilagodljiviji promjeni reakcijskih uvjeta od kontinuiranog načina vođenja reakcije. To omogućuje laku promjenu kvalitete proizvoda te raspodjelu produkata kod složenih reakcija. Jedna od značajnih primjena kotlastih reaktora je njihovo često korištenje na početku proizvodnje određenog produkta, odnosno smatraju se nekom vrstom pokusnog reaktora. Zbog ekonomičnosti, kotlasti se reaktori često koriste za proizvodnju manjih količina produkata, npr. lijekova, organskih bojila i drugih kemikalija, odnosno u slučajevima kada je cijena rada i proizvodnje manja od investicijskih troškova u nova postrojenja. Upravo jednostavnost izvedbe i prilagodljivost promijenjenim uvjetima i zahtjevima čini kotlaste reaktore nezamjenjivim procesnim jedinicama u mnogim kemijskim industrijama.⁷¹

2.6. Mikroreaktori

Mikroreaktori se definiraju kao umanjeni reaktorski sustavi proizvedeni uporabom metoda mikrotehnologije i preciznog inženjerstva. Oni omogućuju razvoj reaktorskih sustava s malim unutrašnjim dimenzijama i promjerima. Mikroreaktori imaju male unutrašnje promjere, na skali između 10 i 500 μm , kako bi utjecali i kontrolirali tekućine u kontroliranoj okolini. Mogu se podijeliti u dvije klase: mikroreaktore u obliku čipa i mikrokapilarne mikroreaktore. Proizvode se od raznih materijala, poput stakla, kvarca, silicija, metala i polimera, a odabir optimalnog materijala ovisi o kemijskoj kompatibilnosti s reakcijskom smjesom, cijenom te analitičkim metodama korištenim u kontroli procesa. Najčešće korišteni materijal je staklo, obzirom da je kemijski inertno i transparentno, što omogućava korisniku vizualni pregled mikrokanala. Mikrokanali su proizvedeni različitim metodama, kao što su mokro jetkanje, ubrizgavanje u kalup, lasersko mikrooblikovanje, fotolitografija i slično.⁷³



Slika 9. Osnovne strukturne jedinice mikroreaktorskog sustava⁷⁴

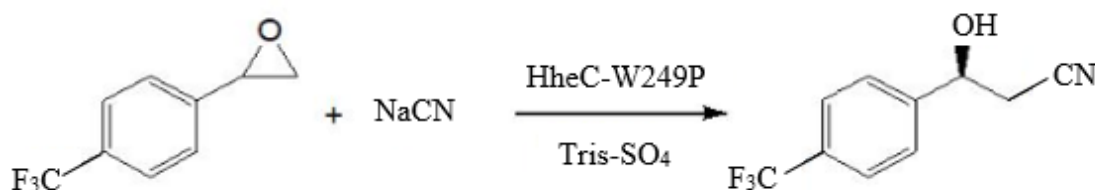
Mikroreaktori pokazuju mnoge praktične prednosti u usporedbi s ekvivalentnim makroreaktorima. Male dimenzije dopuštaju korištenje minimalne količine reaktanata pod precizno kontroliranim uvjetima, omogućavaju brzo praćenje reakcijskih uvjeta te poboljšavaju sveukupnu sigurnost procesa. Osim toga, prednosti mikrosustava uključuju izvrni prijenos mase i topline, kraće vrijeme zadržavanja, manja količina reaktanta, lagani i kompaktni dizajn sustav, manja količina otpada i trošak katalizatora, laminarni tok, učinkovito miješanje, bolju kontrolu procesa i manji utrošak energije.⁷⁵ Put prijenosa tvari i topline veoma je kratak zbog čega su mikroreaktori pogodni za reakcije u kojima su prijenos topline i tvari ograničavajući čimbenici. Mikroreaktori imaju izrazito velik omjer površine i volumena. Omjer površine i volumena raste sa smanjenjem promjera reaktora.⁷⁴ Također, male dimenzije mikroreaktora omogućuju upotrebu pristupa uvećanja broja mikroreaktora (eng. *numbering-up*) umjesto konvencionalnog uvećanja procesa. To znači da se procesne jedinice s mikrokanalima ponavljaju kako bi se postigao veći kapacitet proizvodnje.⁷⁶ Kako su mikroreaktori zatvoreni sustavi s dobrim svojstvima prijenosa topline, moguće je generirati opasne intermedijere *in situ* za njihovu direktnu uporabu u sljedećem sinteznom koraku. S materijalim poput diazometana,

izocijanida, organskih azida i ozona je teško rukovati u šaržnim reakcijama zbog toksičnosti i eksplozivnosti, dok je u protočnim sustavima njihova sinteza mnogo sigurnija.⁷⁷

Mikroreaktori se primjenu našli u raznim područjima, od kemijske sinteze do biotehnoloških procesa i zaštite okoliša. Tehnologija mikroreaktora se uvelike istražuje za primjenu u farmaceutskoj industriji i proizvodnji finih kemikalija. Bitno područje istraživanja je primjena enzimskih mikroreaktora. Temeljeno na njihovoj primjeni, mogu se podijeliti na dva tipa: one koji se koriste u biotransformacijama te one koji se koriste za praćenje supstrata, enzima i ispitivanje kinetike. U enzimskim mikroreaktorima enzimi mogu biti ili otopljeni ili imobilizirani.⁷⁸ Prednost imobilizacije enzima je njihova niska potrošnja. Raspon dostupnih imobiliziranih enzima sa zadovoljavajućim svojstvima je ograničen što smanjuje broj potencijalnih primjena.⁷⁹

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Cilj rada je bio provesti reakciju otvaranja prstena 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana s cijanidom kao nukleofilom. Reakcija je katalizirana enzimom halogenhidrin-dehalogenazom, HheC-W249P. Reakcija je provedena u kotlastom reaktoru te u mikroreaktoru. Slika 10 prikazuje shemu provedene reakcije. Koncentracije utrošenog epoksida u reakciji te nastalog produkta su praćene na kapljevinskom kromatogramu visoke djelotvornosti, dok je aktivnost enzima tijekom reakcije praćena spektrofotometrijski.



Slika 10. Shema reakcije otvaranja epoksidnog prstena cijanidom katalizirane halogenhidrin-dehalogenazom

3.1. Aparatura i kemikalije

3.1.1. Reakcijski sustav

Reakcije su provedene u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru. Reakcijski sustav kotlastog reaktora se sastojao od kotlastog reaktora (KR) kojeg je predstavljala Eppendorf epruveta na tresilici ThermoMixerC (Eppendorf), prikazanoj na slici 11. Drugi reakcijski sustav se sastojao od pumpe Pump33 (Harvard Apparatus), mikroreaktora u obliku čipa i Eppendorf epruvete za sakupljanje produkata reakcije (Slika 12.).



Slika 11. Tresilica ThermoMixerC (Eppendorf).



Slika 12. Pumpa Pump33 (Harvard Apparatus) i mikroreaktor u metalnom kućištu

3.1.2. Kapljevinski kromatogram visoke djelotvornosti

Za analizu uzoraka, odnosno određivanje koncentracije supstrata i produkata u uzorcima korištena je kapljevinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) (Slika 13.).



Slika 13. HPLC s UV detektorom, Shimadzu (Japan).

3.1.3. Spektrofotometar

Aktivnost enzima u reakciji provedenoj u mikroreaktoru praćena je spektrofotometrijski. Aktivnost enzima određena je na UV-1800 spektrofotometru (Shimadzu, Japan), prikazanom na slici 14, a podaci su obrađivani uz programsku podršku UV Probe (Shimadzu, Japan).



Slika 14. Spektrofotometar UV-1800

3.1.4. Ostala aparatura

Za vaganje pojedinih uzoraka korištena je AUW120 vaga (Shimadzu, Japan).

Ekstrakcija uzoraka provedena je na Vortex V-1 plus (bioSan).

Koncentriranje enzima je provedeno na centrifugi Universal 320 R (Hettich Zentrifugen).

Iz sigurnosnih razloga, zbog reakcije s cijanidima, reakcije su se provodile u digestoru.

3.1.5. Kemikalije

Popis kemikalija korištenih u provođenju eksperimenata se nalazi u tablici 1. Sve su kemikalije komercijalno dostupne osim epoksida, 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana. Ta je kemikalija sintetizirana na Zavodu za organsku kemiju Instituta „Ruđer Bošković“ (IRB) i preuzeta za korištenje. C tip halogenhidrin-dehalogenaze, HheC-W249P, je izoliran u Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih u eksperimentima

NAZIV KEMIKALIJE	KEMIJSKI SIMBOL ILI POKRATA	PROIZVOĐAČ
2-(4-trifluormetil)fenil oksirana	<i>rac</i> -epoksid	Sigma Aldrich Corporations, SAD
Natrijev cijanid	NaCN	Sigma Aldrich Corporations, SAD
2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer	Tris-SO ₄	Sigma Aldrich Corporations, SAD
Natrijev sulfat	NaSO ₄	Kemika d.d., Hrvatska
Dimetil sulfoksid	DMSO	Sigma Aldrich Corporations, SAD
metil <i>terc</i> -butil eter	MTBE	Sigma Aldrich Corporations, SAD
C tip halogenhidrin-dehalogenaze	HheC-W249P	-

Temeljna otopina (TO) natrijevog cijanida, koncentracije 200 mM, pripravljena je otapanjem čvrstih uzoraka u ultračistoj vodi. Pripravljena TO je skladištena u hladnjaku na temperaturi +4 °C sve do korištenja.

Sirovi enzimski ekstrakt HheC-W249P, koncentracije 5 mg/mL, skladišten je u zamrzivaču pri temperaturi – 20 °C, a prije korištenja je odmrzavan.

Temeljna otopina epoksida 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana, koncentracije 5000 mM, pripravljena je miješanjem odvaga kapljevito uzorka s otapalom dimetil sulfoksidom (DMSO). Pripravljena TO je skladištena u hladnjaku na temperaturi +4 °C sve do korištenja.

3.2. Analitičke metode

3.2.1. Analiza uzoraka kapljevinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Uzorci su analizirani kapljevinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, na HPLC uređaju s UV detektorom. Analize su provedene metodom gradijentnog eluiranja pri 30 °C. Stacionarna faza je bila Kinetex Reversed Phase C-18 kolona čije se karakteristike mogu pronaći u tablici 2, a mobilnu je fazu činila smjesa 80% metanola i ultračiste vode. Metoda kreće s 65% udjela ultračiste vode u mobilnoj fazi, a ostatak čini metanol. Do trinaeste minute analize se sadržaj ultračiste vode u mobilnoj fazi smanji na 25%, a do petnaeste minute njen udio biva 10%. U tom periodu iz kolone izlaze komponente koje želimo analizirati. Udio ultračiste vode se potom vraća na početnu vrijednost od 65% do dvadeset i druge minute ispitivanja i takvom se zadržava jednu minutu. Protok mobilne faze je bio 1 mL/min. Volumen injektiranog volumena po analizi je 5 µL. Uzorci su po izlasku iz kolone detektirani spektroskopom pri valnoj duljini od 254 nm. Za održavanje temperature od 30 °C korišten termostat za kolonu. Ukupno trajanje metode je 23 min. Retencijsko vrijeme 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana je 17,5 min, 2-(4-trifluormetil)fenil hidroksinitrila 12,3 min, a diola 11,5 min. Kromatogram dobiven analizom je prikazan prilogom 1.

Uzorci su za analizu na tekućinskom kromatogramu visoke djelotvornosti pripremani tako da se 10 µL alikvota automatskom pipetom prebacilo u prethodno pripremljenu Eppendorf epruvetu koja je sadržavala 200 µL metil-*tert*-butil etera (MTBE). Sadržaj epruvete se miješao 20 s na Vortex miješalici kako bi došlo do ekstrakcije uzorka u organsko otapalo. Došlo je do razdvajanja na dva sloja, donji vodeni sloj koji sadrži pufer i neizreagirane cijanidne ione i gornji organski sloj koji sadrži otopljeni epoksid i produkt reakcije. Vodeni sloj može oštetiti dijelove HPLC uređaja te ga je zato bilo potrebno odvojiti prije analize. Gornji je organski sloj prebačen u kapalicu punjenu higroskopskim natrijevim sulfatom kako bi se uzorak dodatno osušio od vodenog medija. Uzorak je protisnut kroz kapalicu u vijalicu prikladnu za HPLC analizu. Tako pripremljeni uzorci su čuvani na ledu sve do analize, kako ne bi došlo do hlapljenja uzorka.

Tablica 2. Karakteristike Kinetex Reversed Phase C18 kolone

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

3.3. Provođenje reakcije u kotlastom reaktoru

Reakcijski sustav za ispitivanje reakcije u kotlastom reaktoru, kao što je već opisano, se sastojao od Eppendorf epruvete koja je predstavljala sami reaktor na tresilici. Reakcija je provedena pri 2000 okr/min i temperatura $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Iz sigurnosnih razloga, zbog rada s opasnim cijanidima, eksperimenti su provedeni u digestoru. Reakcijski medij je Tris- SO_4 pufer, pH vrijednosti 7. Otopina racemičnog epoksida željene koncentracije se pripravila razrjeđenjem temeljne otopine epoksida, $C_{\text{rac-epoksid, TO}} = 5000 \text{ mM}$ u DMSO. Volumen reakcijske smjese je $1000 \mu\text{L}$. Priprema reakcijske smjese je uključila dodatak određenog volumena DMSO u Eppendorf epruvetu, a u njega je dodan potrební volumen racemičnog epoksida kako bi se u reaktoru postigla njegova koncentracija koju ispítujemo. Nakon epoksida je dodan Tris- SO_4 pufer i otopina natrijeva cijanida. Volumen dodanog pufera se mijenjao ovisno o dodanom volumenu ostalih spojeva kako bi dobili ukupan volumen reakcijske smjese. Na kraju je dodan enzim, prethodno ukoncentriran 10 puta na centrifugi, a njegovim dodatkom je započela reakcija. Sastav reakcijske smjese je dan u tablici 3. Uzorci za analizu su uzimani u vremenima 0 min (odmah nakon dodatka enzima), 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, te pripremljeni prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.



Slika 15. Aparatura za provođenje reakcije u kotlastom reaktoru

Osim enzimske reakcije, pratile su se i reakcije bez dodatka enzima i natrijevog cijanida. Kod reakcije hidrolize se u smjesu nije dodan natrijev cijanid niti enzim, a svrha joj je pratiti raspad epoksida u vodenom mediju, čime nastaju dioli. Bez dodatka enzima se pratila kemijska reakcija, odnosno nekatalizirana reakcija cijanida i epoksida. Obje je reakcije potrebno pratiti kako bi se mogla dobiti ispravna slika o reakciji kataliziranoj enzimom. Sastav reakcijske smjese prilikom provođenja reakcija je dan u tablici 4.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese ($V_{rs} = 1000 \mu\text{L}$)

Exp No	c_{rac} -epoksid/ mM	c_{NaCN} / mM	$\gamma_{\text{HheC-W249P}}$ / mg/mL
Batch-1	5	5	2,5
Batch-2	5	5	5
Batch-3	20	20	5

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese ($V_{rs} = 1000 \mu\text{L}$)

Exp No	c_{rac} -epoksid/ mM	c_{NaCN} / mM	$\gamma_{\text{HheC-W249P}}$ / mg/mL
Kemijska	20	5	0
Hidroliza	20	0	0

3.4. Provođenje reakcije u mikroreaktoru

Reakcijski sustav za ispitivanje reakcije u mikroreaktoru se sastojao od pumpe, klipova u kojima se nalazi reakcijska smjesa, cjevčica kojima se dovodi reakcijska smjesa u sami mikroreaktor i stakleni mikroreaktor oblika pločice (chip), s dva ulaza i dva izlaza Y oblika. Upotrijebljen je mikroreaktor s glatkim stijenkama, a dimenzije mikrokanala su: promjer kanala 1 mm, duljina 280 mm. Ukupni volumen mikroreaktora je $V = 4,15 \mu\text{L}$. Volumen svakog klipa je 0,5 mL. Uvjeti u mikroreaktoru su dani tablicom 5.

Tablica 5. Sastav reakcijske smjese unutar mikroreaktora

C_{NaCN} , mM	20
$C_{\text{rac-epoksid}}$, mM	20
$\gamma_{\text{HheC-W249P}}$, mg/mL	5
C_{DMSO} , mM	704

Sustav se sastojao od dva klipa u kojemu su se nalazili reaktanti. Prvi klip je sadržavao natrijev cijanid i dimetil sulfoksid, a drugi klip epoksid i enzim. Bitno je odvojiti natrijev cijanid i epoksid kako ne bi došlo do njihove reakcije u samom klipju. Ostatak reakcijske smjese u oba klipa je činio pufer. Koncentracije otopina u klipovima su dane u tablici 6. Koncentracija se u klipovima razlikovala od one u mikroreaktoru obzirom da se dvije struje miješaju u samom mikroreaktoru, pa je potrebno da njihova koncentracija u klipovima bude veća.

Tablica 6. Koncentracije otopina u klipovima mikroreaktora

Temeljne otopine u klipovima	koncentracija	
C_{NaCN} , mM	40	Klip 1
C_{DMSO} , mM	1408	
$C_{\text{rac-epoksid}}$, mM	40	Klip 2
$\gamma_{\text{HheC-W249P}}$, mg/mL	10	

Mikroreaktor je postavljen u metalno kućište, a ulazi su pomoću cjevčica od silikata povezani s klipnim pumpama. Izlaz iz reaktora je izveden na sličan način, silikatnim se cjevčicama reakcijska smjesa po izlazu iz mikroreaktora odvodila u posudu za sakupljanje. Postavljanjem određenog protoka na pumpi je pokrenuta reakcija. Protoci pri kojima su se provodile reakcije su $q_V = 12, 15, 8, 6, 4$ i $2 \mu\text{L}/\text{min}$. Nakon pokretanja reakcije je bilo potrebno pustiti da prođu četiri prostorna vremena zadržavanja, $4 \cdot \tau$, kako bi se uspostavilo stacionarno stanje. Vremena

zadržavanja za korištenje protoke su prikazana u tablici 7. Za vrijeme odvijanja reakcije u mikroreaktoru je potrebno uzimati uzorke, za svaki protok se reakcijska smjesa uzorkovala tri puta kako bi dobili što točnije vrijednosti koncentracija. Uzorci za analizu su pripremljeni prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.

Tablica 7. Protoci reakcijske smjese i vremena zadržavanja

$q_V, \mu\text{L min}^{-1}$	τ, min	$4 \cdot \tau, \text{min}$
12	0,35	1,38
15	0,28	1,11
8	0,52	2,08
6	0,69	2,77
4	1,04	4,15
2	2,08	8,30



Slika 16. Reakcijski sustav s mikroreaktorom

Kao i kod kotlastog reaktora, potrebno je ispitati odvijaju li se u mikroreaktoru kemijska reakcija i reakcija hidrolize. Sporedne su reakcije u mikroreaktoru posebno izražene. Drugi klip kod ispitivanja kemijske reakcije nije sadržavao enzim već samo supstrat i pufer. Sastav smjese u klipovima je dan tablicom 8. Kod ispitivanja reakcije hidrolize, prvi klip je sadržavao samo dimetil sulfoksid, a drugi samo epoksid. Sastav reakcijske smjese u klipovima je dan u tablici 9.

Tablica 8. Sastav reakcijske smjese u klipovima prilikom provođenja kemijske reakcije u mikroreaktoru

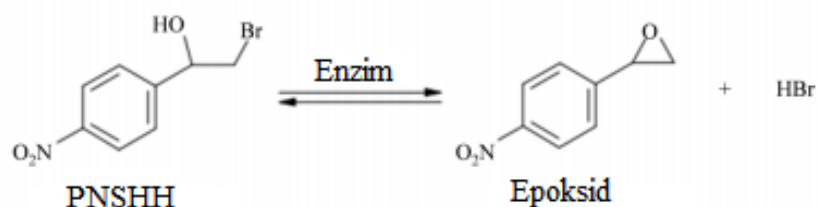
Temeljne otopine u klipovima	koncentracija	
C_{NaCN} , mM	40	Klip 1
C_{DMSO} , mM	1408	
$C_{\text{rac-epoksid}}$, mM	40	Klip 2
$\gamma_{\text{HheC-W249P}}$, mg/mL	0	

Tablica 9. Sastav reakcijske smjese u klipovima prilikom provođenja reakcije hidrolize u mikroreaktoru

Temeljne otopine u klipovima	koncentracija	
C_{NaCN} , mM	0	Klip 1
C_{DMSO} , mM	1408	
$C_{\text{rac-epoksid}}$, mM	40	Klip 2
$\gamma_{\text{HheC-W249P}}$, mg/mL	0	

3.5. Određivanje aktivnosti enzima spektrofotometrijskim testom

Aktivnost HheC-W249P enzima u reakciji provedenoj u mikroreaktoru je određena spektrofotometrijskim testom s 1-(*p*-nitrofenil)-2-bromoetanolom (PNSHH). Ona je određena korištenjem UV-1800 spektrofotometra (Shimadzu, Japan) pri $\lambda = 310$ nm. Podaci su obrađeni uz programsku podršku UV Probe (Shimadzu, Japan). Test se temelji na razlici u apsorbanciji između halohidrina 1-(*p*-nitrofenil)-2-bromoetanol (PNSHH) i epoksida *p*-nitrostiren oksida (PNSO) nastalog u reakciji kataliziranoj enzimom HheC. Nastajanjem epoksida se povećava apsorbancija pri $\lambda = 310$ nm, a ona je proporcionalna koncentraciji enzima.



Slika 17. Jednadžba reakcije za spektrofotometrijski PNSHH test

Temeljna otopina (TO) racemične smjese PNSHH je pripravljena otapanjem u dimetil sulfoksidu (DMSO). Temeljna je otopina čuvana u hladnjaku na temperaturi +4 °C i vađena prije korištenja. Otopina supstrata je pripremljena u kvarcnoj kiveti dodavanjem 10 μL temeljne

otopine PNSHH u TriS-SO₄ pufer te je intenzivno miješana na miješalici kako bi DMSO ostao dispergirani u otopini. Vodena otopina PNSHH nije stabilna te je ovaj korak proveden neposredno prije korištenja.

Reakcija u mikroreaktoru je pokrenuta isto kao i prilikom ispitivanja enzimske reakcije, uz iste uvjete opisane u prethodnom poglavlju. Skupljani su alikvoti od 10 µL reakcijske smjese u određenim vremenima. Enzim je razrijeđen u 140 µL Tris-SO₄ pufera te centrifugiran na filtru. Volumen uzorka u kiveti je $V_r = 1000 \mu\text{L}$, a debljina kivete je 1 cm. Spektrofotometrijska reakcija s PNSHH je pokrenuta dodatkom 1 µL enzima u pripravljenu otopinu. Reakcija je krenula odmah te se od nultog trenutka pratila na spektrofotometru. Izmjerena promjena apsorbancije u vremenu ($\Delta A/\Delta t$) služi za proračun volumne aktivnosti enzima (V.A.) prema jednadžbi:

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon d V_E} \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

gdje su:

V.A. – volumna aktivnost [U mL⁻¹],

U – jedinica enzimske aktivnosti,

V_r – volumen uzorka u kiveti [mL],

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

d – širina kivete [cm],

V_E – volumen enzima [mL],

$\Delta A/\Delta t$ – promjena apsorbancije u vremenu [min⁻¹].

Ekstinkcijski koeficijent epoksida iznosi 4,289 mM⁻¹ cm⁻¹. Ponekad je praktičnije koristiti specifičnu aktivnost (S.A.) koja se računa prema jednadžbi:

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma}$$

gdje su:

S.A. – specifična aktivnost [U mg⁻¹],

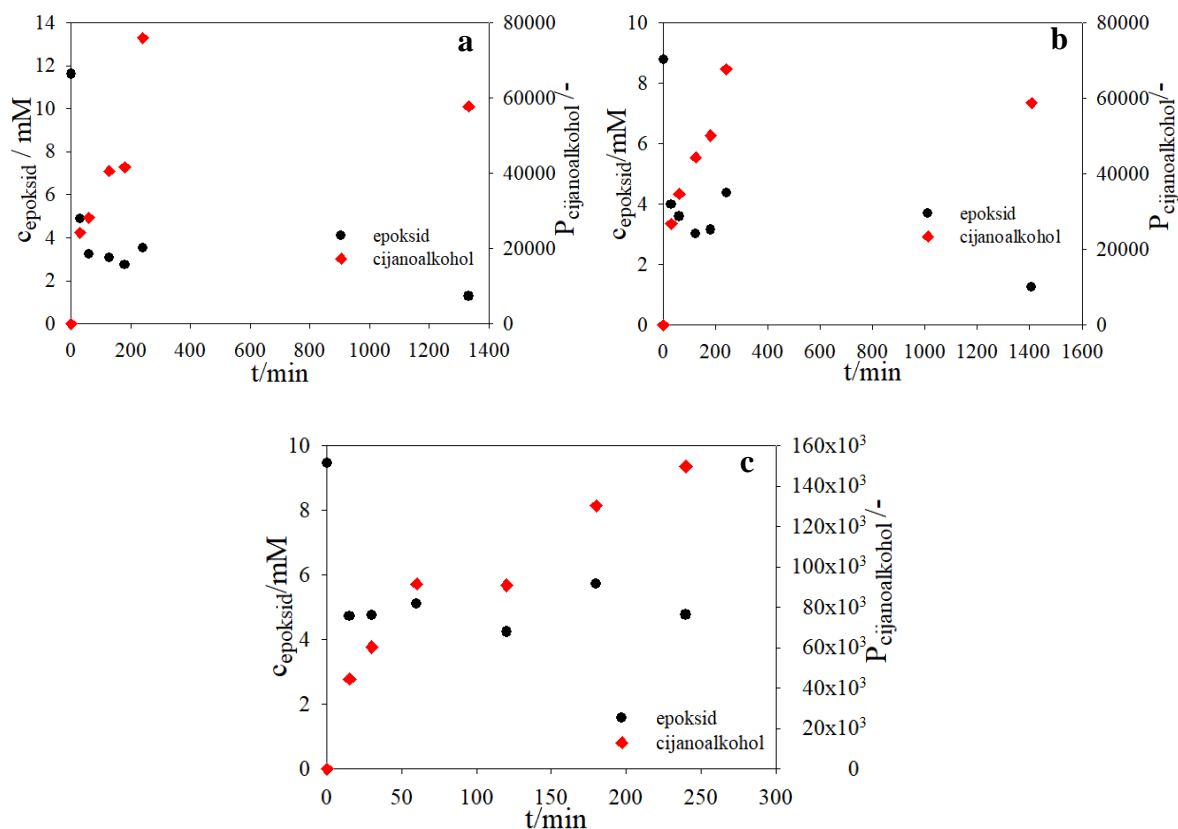
γ – masena koncentracija [mg dm⁻³].

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj rada je bio ispitati mogućnost odvijanja reakcije otvaranja epoksidnog prstena 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana, katalizirane C-tipom halogenhidrin-dehalogenaze HheC-W249P uz natrijev cijanid kako nukleofil, u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru. Reakcija je praćena na kapljevinskom kromatografijom visoke djelotvornosti analizom određivanjem koncentracije utrošenog supstrata i nastalog produkta. Također je praćen i nastanak nusprodukata iz sporednih reakcija. Aktivnost enzima tijekom reakcije provedene u mikroreaktoru je praćena spektrofotometrijski. Koncentracija 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana je određena pomoću baždarnog pravca danog u prilogu 2. Zbog nemogućnosti kvantificiranja nastalog 2-(4-trifluormetil)fenil hidrosinitrila, njegova je količina prikazana preko površina dobivenih u kromatogramima.

4.1. Biotransformacija 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom u kotlastom reaktoru

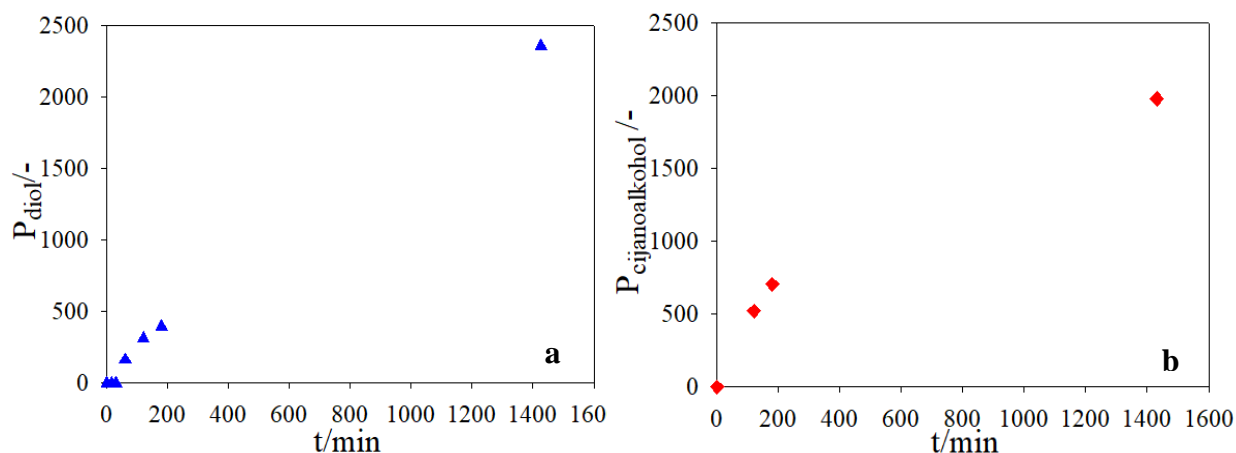
Reakcija otvaranja epoksidnog prstena 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana uz natrijev cijanid kao nukleofil, katalizirana HheC-W249P provedena je u kotlastom reaktoru. Koncentracija supstrata i nukleofila u reakcijskoj smjesi je prikazana u tablici 3. Koncentracija enzima se mijenjala u svakom od provedenih eksperimenata. Reakcije su se provodile 24h.



Slika 18. Enzimaska reakcija otvaranja prstena 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana katalizirana HheC-W249P provedena u kotlastom reaktoru pri ekvimolarnim koncentracijama supstrata i nukleofila **a-** $C_{\text{rac-epoksid}} = C_{\text{NaCN}} = 12 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 2,5 \text{ mg/mL}$, **b-** $C_{\text{rac-epoksid}} = C_{\text{NaCN}} = 9 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 5 \text{ mg/mL}$, **c-** $C_{\text{rac-epoksid}} = C_{\text{NaCN}} = 9,5 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 5 \text{ mg/mL}$ (Tris- SO_4 pufer, $T = 25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, 2000 okr/min, $V_{\text{rs}} = 1000 \mu\text{L}$)

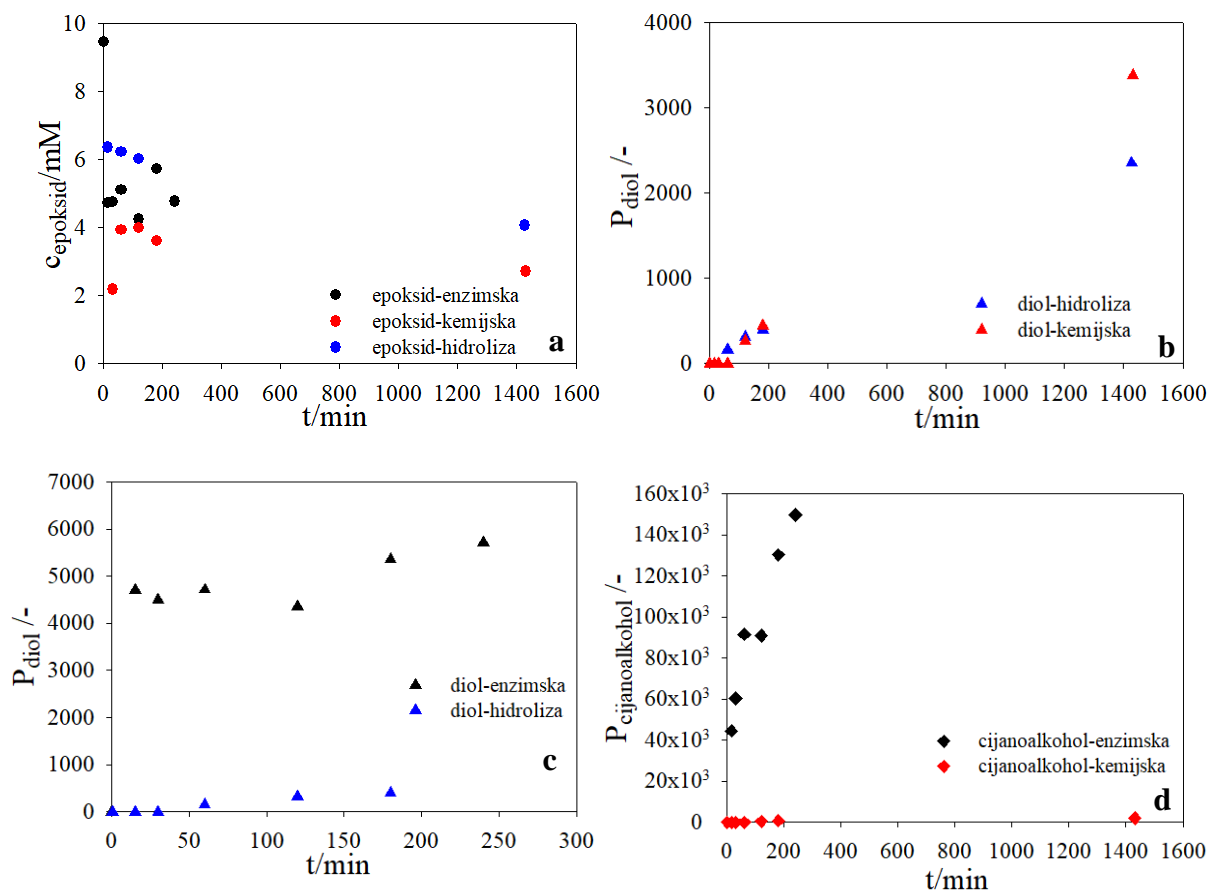
Rezultati ispitivanja su dani na slici 18. U sva tri eksperimenta vidimo da je došlo do reakcije otvaranja epoksidnog prstena i da je nastao produkt 2-(4-trifluormetil)fenil hidroksinitril. Koncentracija 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana se smanjuje s vremenom provođenja reakcije. Najveći pad koncentracije epoksida je odmah na početku reakcije, odnosno do biotransformacije dolazi odmah po pokretanju reakcije. Produkt također nastaje odmah nakon pokretanja reakcije. Njegova koncentracija raste s vremenom i najveća vrijednost se postiže oko šestog sata provođenja reakcije. Koncentracija nastalog produkta na kraju reakcije, u 24.-tom satu se ne razlikuje od one u 6.-om, što znači da većinu produkta možemo dobiti u periodu do 6 sati te reakciju nije potrebno provoditi dugo vremena. Konverzije epoksida u svakoj od provedenih reakcija iznose: $X_a = 88 \%$, $X_b = 85 \%$ te $X_c = 49 \%$. Najmanja je konverzija dobivena u trećem pokusu no to je zbog toga što je on ranije prekinut. Najbolji uvjeti provedbe reakcije su se pokazali oni za treći eksperiment, prikazan na slici 18c, koji se odvijao uz veću

koncentraciju supstrata i nukleofila te uz veću koncentraciju enzima jer je tamo postignuta najviša koncentracija 2-(4-trifluorometil)fenil hidroksinitrila.



Slika 19. Reakcija hidrolize ($c_{rac-epoksid} = 20 \text{ mM}$, $c_{NaCN} = 0 \text{ mM}$) (a) i kemijska reakcija ($c_{rac-epoksid} = 20 \text{ mM}$, $c_{NaCN} = 5 \text{ mM}$) (b) 2-(4-trifluorometil)fenil oksirana provedena u kotlastom reaktoru pri ekvimolarnim koncentracijama supstrata i nukleofila (Tris-SO₄ pufer, $T = 25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, 2000 okr/min, $V_{rs} = 1000 \mu\text{L}$)

Epoksidi su, zbog svoje strukture, vrlo reaktivni i nestabilni u vodenim medijima. Reagiraju s molekulom vode čime dolazi do nastanka diola. Iz tog je razloga bilo potrebno istražiti reakciju hidrolize 2-(4-trifluorometil)fenil oksirana u kotlastom reaktoru. Na slici 19a je prikazan nastanak diola reakcijom hidrolize epoksida. Do raspada epoksida dolazi na samom početku reakcije te s vremenom nastaje sve više nusprodukta. To nam govori da reakcija hidrolize ima veliki utjecaj na potrošnju 2-(4-trifluorometil)fenil oksirana. Osim reakcije hidrolize, bitno je ispitati i kemijsku reakciju pretvorbe 2-(4-trifluorometil)fenil oksirana u 2-(4-trifluorometil)fenil hidroksinitril s cijanidom kao nukleofilom. Naime, enzimi kataliziraju otvaranje epoksidnog prstena s nukleofilima čime nastaje samo jedan enantiomer koji je bitan za daljnju proizvodnju aktivnih tvari. Spontanom reakcijom otvaranja epoksidnog prstena s nukleofilom nastaju oba enantiomera što utječe na obradu krajnje smjese produkata. Na slici 19b je prikazan nastanak 2-(4-trifluorometil)fenil hidroksinitril kemijskom reakcijom u kotlastom reaktoru. Ona postaje sve izraženija što se reakcija duže odvija. Ipak, može se zaključiti prema dobivenim površinama da su one značajno manje od onih u enzimski kataliziranoj reakciji.



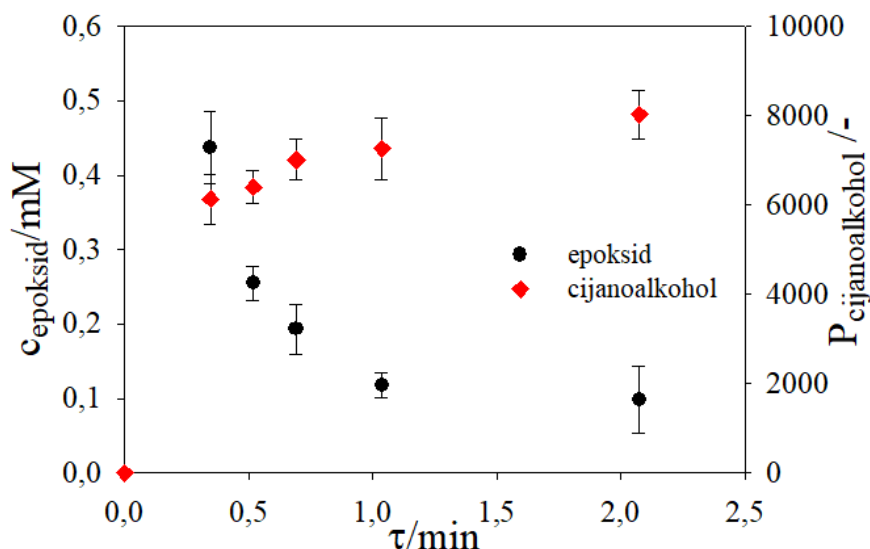
Slika 20. Usporedba utrošenog 2-(4-trifluorometil)fenil oksirana u reakciji kataliziranoj s HheC, reakciji hidrolize i kemijskoj reakciji (a); količine diola nastalog hidrolizom epoksida prilikom provođenja reakcije hidrolize i provođenja kemijske reakcije epoksida s nukleofilom (b); nastalog diola u enzimskoj reakciji i reakciji hidrolize (c); nastalog cijanoalkohola u enzimskoj reakciji i kemijskoj reakciji (d); tijekom provođenja reakcije u kotlastom reaktoru ($C_{rac-epoksid} = C_{NaCN} = 9,5 \text{ mM}$, $\gamma_{HheC-W249P} = 5 \text{ mg/mL}$, Tris-SO₄ pufer, $T = 25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, 2000 okr/min, $V_{rs} = 1000 \mu\text{L}$)

Na slici 20a je prikazano smanjenje koncentracije 2-(4-trifluorometil)fenil oksirana tijekom provođenja reakcije u kotlastom reaktoru. Uspoređene se reakcije, reakcija otvaranja epoksidnog prstena katalizirana HheC, reakcija hidrolize epoksida te kemijska reakcija epoksida s nukleofilom, pokrenute s istom početnom koncentracijom 2-(4-trifluorometil)fenil oksirana $C_{rac-epoksid} = 9,5 \text{ mM}$. Može se vidjeti da je trend smanjenja koncentracije isti za sve tri promatrane reakcije. Odmah na početku reakcije dolazi do potrošnje epoksida i ono se nastavlja kroz cijelo vrijeme trajanja reakcije. Na slici 20b je prikazana usporedba količine diola nastalog hidrolizom epoksidnog prstena kod mjerenja reakcije hidrolize i onog nastalog hidrolizom epoksida prilikom provođenja kemijske reakcije otvaranja epoksidnog prstena uz natrijev

cijanid. Na početku obje reakcije nastaje ista količina diola. Na kraju provođenja kemijske reakcije je nastalo više diola nego na kraju reakcije hidrolize, što je najvjerojatnije rezultat eksperimentalne pogreške. Ovi nam rezultati govore da je epoksid vrlo nestabilan u vodenom mediju te se raspada na diole bez obzira na uvjete provođenja reakcije. Na slici 20c je prikazana usporedba nastale količine diola tijekom reakcije katalizirane enzimom i reakcije hidrolize. Tijekom reakcije provedene u sustavu koji sadrži enzim je nastalo znatno više diola nego kada se reakcija provodila bez enzima, što je potrebno dodatno potvrditi. Na slici 20d je prikazana količina 2-(4-trifluormetil)fenil hidroksinitrila nastala u reakciji kataliziranoj s enzimom HheC-W249P i količina nastala nekataliziranom kemijskom reakcijom. Koncentracija cijanoalkohola nastalog kemijskom reakcijom je zanemariva usporedbi s onom nastalom kataliziranom reakcijom. Može se pretpostaviti da se provođenjem reakcije otvaranja prstena 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana uz halogenhidrin-dehalogenazu kao biokatalizator može dobiti 2-(4-trifluormetil)fenil hidroksinitril kao produkt s određenom enantiomernom čistoćom.

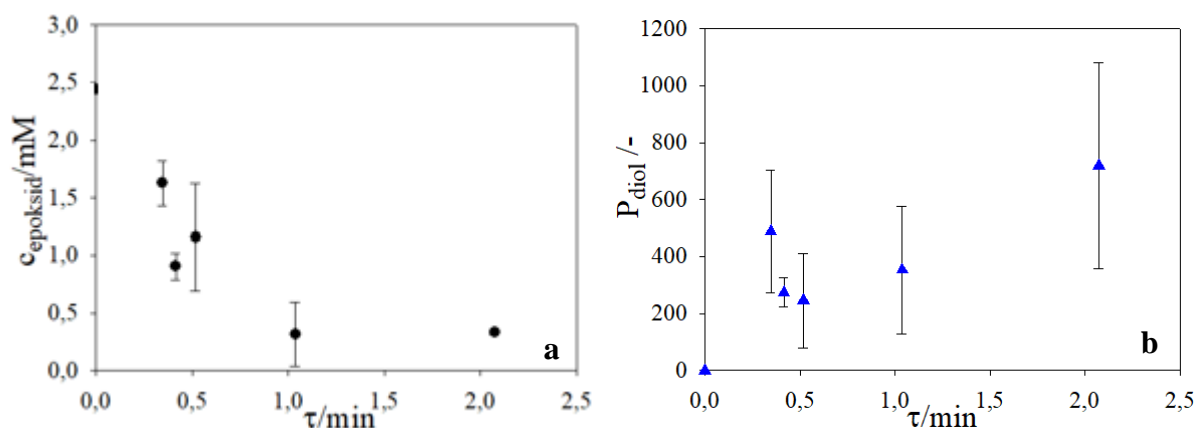
4.2. Biotransformacija 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom u mikroreaktoru

Reakcija otvaranja prstena 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana uz cijanid kao nukleofil, katalizirana HheC-W249P provedena je u mikroreaktoru. Biotransformacija u mikroreaktoru je provedena pri ekvimolarnoj koncentraciji supstrata i nukleofila $c_{rac-epoksid} = c_{NaCN} = 20 \text{ mM}$ i koncentraciji enzima 5 mg/mL . Ovi su uvjeti odabrani prema najpovoljnijim rezultatima reakcija provedenih u kotlastom reaktoru. Faze su u mikroreaktor uvedene pri omjeru protoka faza 1:1. Pokusi su provedeni pri različitim vremenima zadržavanja, a HPLC analizom je određena koncentracija 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana i 2-(4-trifluormetil)fenil hidroksinitrila.



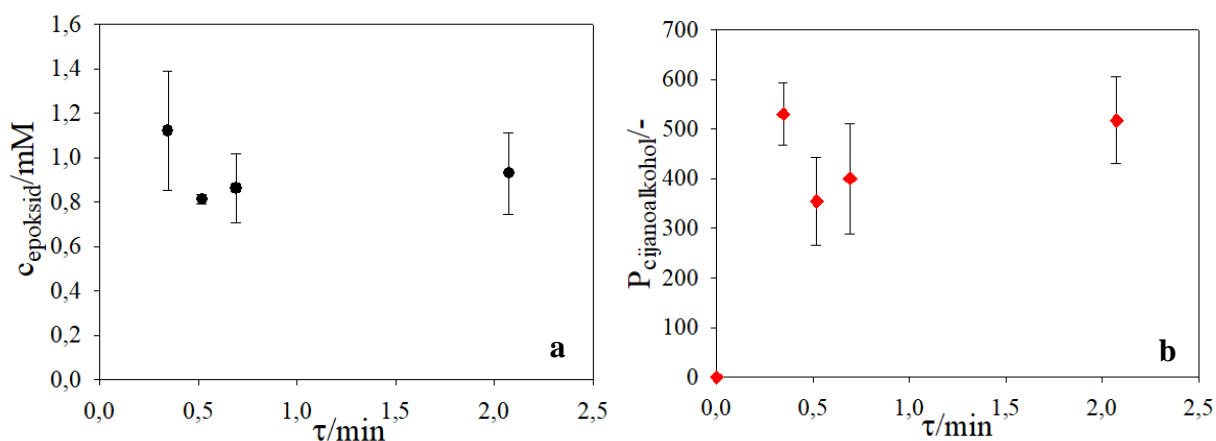
Slika 21. Enzimska reakcija otvaranja prstena 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana katalizirana HheC-W249P provedena u mikroreaktoru pri ekvimoralnim koncentracijama supstrata i nukleofila, $c_{rac-epoksid} = c_{NaCN} = 20$ mM, $\gamma_{HheC} = 5$ mg/mL, uvjeti u klipovima: $c_{rac-epoksid} = 40$ mM, $c_{NaCN} = 40$ mM, $\gamma_{HheC-W249P} = 10$ mg/mL (Tris-SO₄ pufer, $T = 25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, $V = 4,15$ μL , $q_V = 12, 8, 6, 4$ i 2 $\mu\text{L}/\text{min}$)

Na slici 21 su prikazani rezultati ispitivanja reakcije otvaranja prstena 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana katalizirana HheC-W249P provedene u mikroreaktoru pri vremenima zadržavanja $\tau = 0,35, 0,52, 0,69, 1,04$ i $2,08$ min. Kako mikroreaktor radi u stacionarnom stanju, odnosno koncentracija supstrata i produkta se ne mijenja s vremenom, prikazana je samo jedna vrijednost koncentracije uz devijaciju zbog nesigurnosti u mjerenju. Prema rezultatima je vidljivo da se reakcija u mikroreaktoru odvija pri svim vremenima zadržavanja. Učinkovitost pretvorbe 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana u 2-(4-trifluormetil)fenil hidroksinitril se povećava s povećanjem vremena zadržavanja odnosno smanjenjem protoka reakcijske smjese. Najmanja konverzija epoksida od 95 % je postignuta pri najkraćem vremenu zadržavanja od 0,35 min, a najveća, 98 %, pri najvećem vremenu zadržavanja od 2,08 min. Najveća koncentracija produkta se dobije pri najvećem vremenu zadržavanja iako se dobivene koncentracije ne razlikuju mnogo za sva vremena zadržavanja. Ta razlika upućuje na postojanje sporednih reakcija, reakcije hidrolize kao i kemijske reakcije, u kojima dolazi do utroška epoksida.



Slika 22. Reakcija hidrolize 2-(4-trifluorometil)fenil oksirana u mikoreaktoru; **a**-potrošnja 2-(4-trifluorometil)fenil oksirana, **b**-nastanak diola ($c_{\text{rac-epoksid}}=20 \text{ mM}$, uvjeti u klipovima: $c_{\text{rac-epoksid}} = 40 \text{ mM}$; Tris- SO_4 pufer, $T = 25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, $V = 4,15 \mu\text{L}$, $q_V=12, 8, 6, \text{ i } 2 \mu\text{L}/\text{min}$)

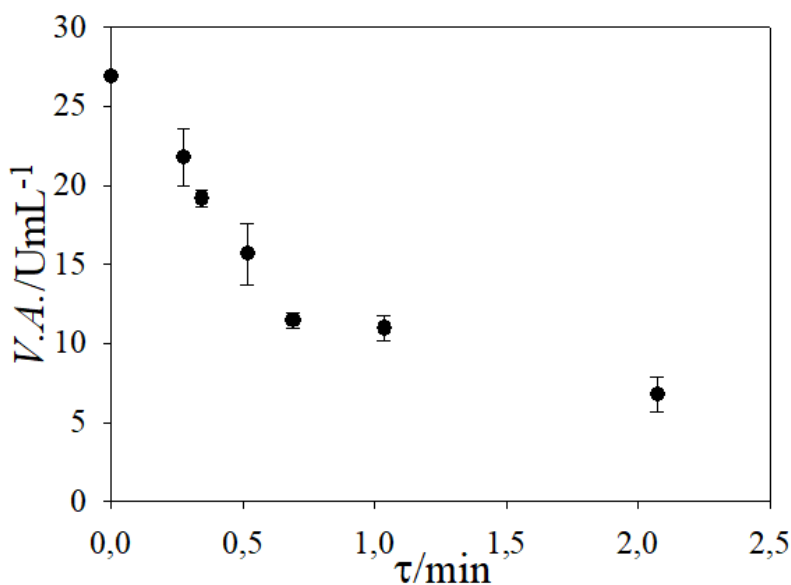
Sporedne su reakcije u mikoreaktoru posebno izražene, što je bilo i za očekivati, radi velikog omjera međufazne površine i volumena u mikoreaktoru čime se ubrzavaju kemijske reakcije. Kao i u kotlastom reaktoru, provedena je reakcija hidrolize 2-(4-trifluorometil)fenil oksirana. Na slici 22a je prikazana potrošnja epoksida u reakciji hidrolize pri različitim vremenima zadržavanja. Najmanje epoksida hidrolizira pri najmanjem vremenu zadržavanja, dok je pri velikom vremenu zadržavanja hidroliza značajna. Slika 22b prikazuje koncentraciju nastalog diola u reakciji hidrolize pri različitim vremenima zadržavanja u mikoreaktoru. Koncentracija diola koji tako nastaje je to veća što je veće prostorno vrijeme zadržavanja.



Slika 23. Kemijska reakcija otvaranja prstena 2-(4-trifluorometil)fenil oksirana s natrijevim cijanidom kao nukleofilom u mikoreaktoru; **a**-potrošnja 2-(4-trifluorometil)fenil oksirana, **b**-nastanak cijanoalkohola ($c_{\text{rac-epoksid}} = c_{\text{NaCN}}=20 \text{ mM}$, uvjeti u klipovima: $c_{\text{rac-epoksid}}=40 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCN}}=40 \text{ mM}$; Tris- SO_4 pufer, $T = 25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, $V = 4,15 \mu\text{L}$, $q_V=12, 8, 6, \text{ i } 2 \mu\text{L}/\text{min}$)

Na slici 23 je prikazana kemijska reakcija otvaranja prstena 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana s natrijevim cijanidom u mikroreaktoru. Kemijskom reakcijom nastaje podjednaka koncentracija cijanoalkohola pri svim prostornim vremenima zadržavanja kod kojih je reakcija provedena.

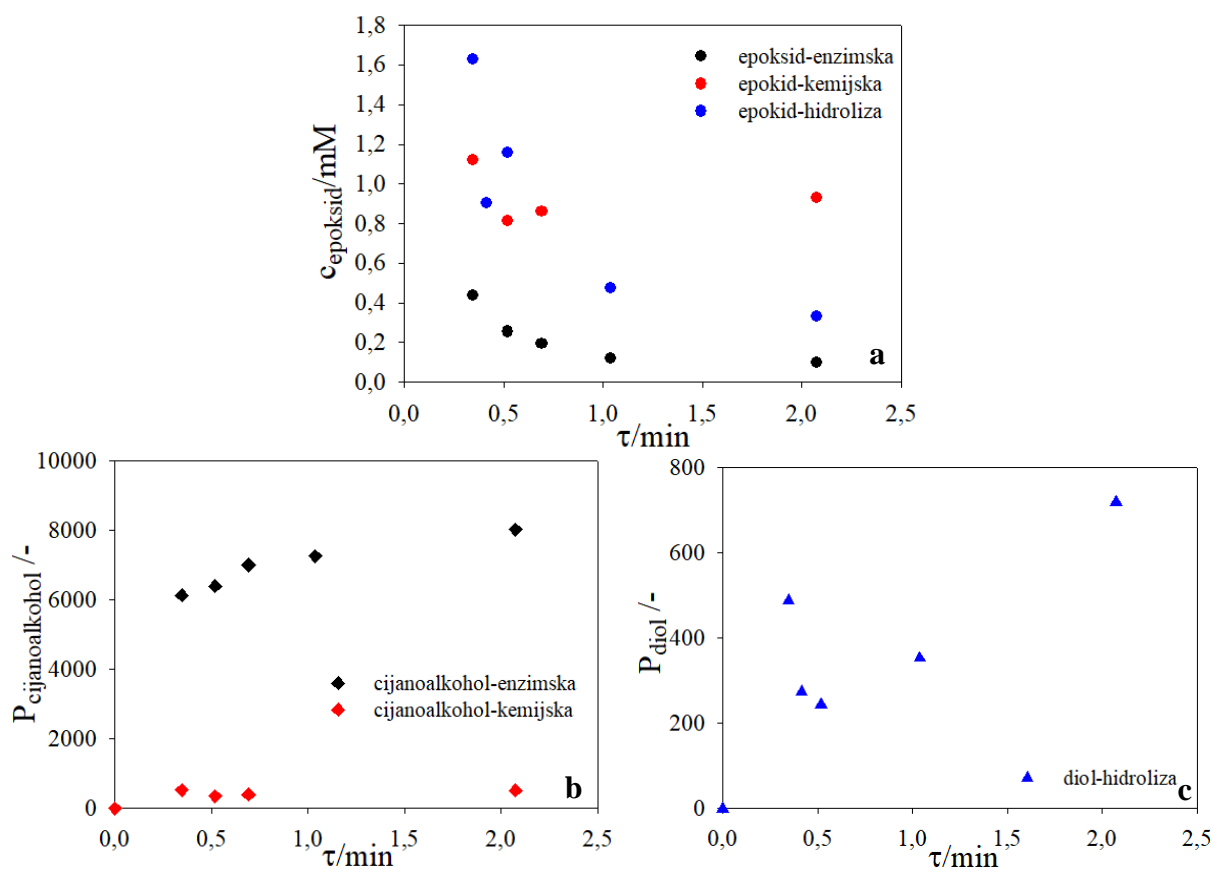
Proveden je pokus u kojemu se pratila ovisnost aktivnosti enzima HheC-W249P, tijekom reakcije otvaranja epoksidnog prstena u mikroreaktoru, o vremenu zadržavanja. Aktivnost enzima je mjerena spektrofotometrijskim testom s PNSHH, a izražena je kao volumna aktivnost V.A. Početna aktivnost enzima halogenhidrin-dehalogenaze je iznosila V.A. = 26,88 U/mL. Slika 24 prikazuje ovisnost volumne aktivnosti enzima o različitim vremenima zadržavanja. Najmanji je pad aktivnosti enzima kod vremena zadržavanja $\tau = 0,35$ min, dok je najveći pad aktivnosti vidljiv kod najvećeg vremena zadržavanja $\tau = 2,08$ min. Ovakav trend pada aktivnosti enzima s povećanjem vremena zadržavanja ukazuje na vremenski ograničenu mogućnost upotrebe enzima u sustavima s organskim otapalima, zbog vjerojatnog negativnog utjecaja organskog otapala na halogenhidrin-dehalogenazu.



Slika 24. Aktivnost enzima HheC-W249P prilikom provođenja reakcije otvaranja prstena 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana u mikroreaktoru $c_{rac-epoksid} = c_{NaCN} = 20$ mM, $\gamma_{HheC} = 5$ mg/mL, uvjeti u klipovima: $c_{rac-epoksid} = 40$ mM, $c_{NaCN} = 40$ mM, $\gamma_{HheC-W249P} = 10$ mg/mL (Tris-SO₄ pufer, $T = 25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, $V = 4,15$ μL , $q_V = 12, 15, 8, 6, 4$ i 2 $\mu\text{L}/\text{min}$)

Na slici 25a je prikazana usporedba smanjenja koncentracije epoksida prilikom provođenja enzimske i kemijske reakcije te reakcije hidrolize u mikroreaktoru. Može se uočiti isti trend smanjenja koncentracije epoksida u sva tri eksperimenta. Do najveće konverzije epoksida dolazi pri najvećem vremenu zadržavanja. Konverzija epoksida kod enzimske reakcije pri

najvećem vremenu zadržavanja iznosi $X=98\%$, a kod reakcije hidrolize pri istom vremenu zadržavanja iznosi $X=86\%$. Najveća je konverzija epoksida prisutna kod provođenja enzimske reakcije obzirom da se tada paralelno odvija i hidroliza epoksida kao i nekatalizirana kemijska reakcija s nukleofilom. Na slici 25b je prikazana količina cijanoalkohola nastalog otvaranjem epoksidnog prstena s enzimom i onog nastalog kemijskom reakcijom. Najviše cijanoalkohola nastaje pri velikim vremenima zadržavanja kod obje reakcije. Kemijska je reakcija u usporedbi s enzimskom manje izražena, odnosno koncentracija tako nastalog cijanoalkohola je neznatna. Na slici 25c prikazuje nastali diol reakcijom hidrolize u mikroreaktoru. Najviše ga nastaje pri visokom vremenu zadržavanja.



Slika 25. Usporedba utrošenog 2-(4-trifluorometil)fenil oksirana u reakciji kataliziranoj s HheC, reakciji hidrolize i kemijskoj reakciji (a); količina cijanoalkohola nastalog enzimatskom i kemijskom reakcijom (b); količina diola nastalog hidrolizom (c) u mikroreaktoru ($C_{\text{rac-epoksid}} = C_{\text{NaCN}} = 20 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC-W249P}} = 5 \text{ mg/mL}$, Tris- SO_4 pufer, $T = 25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, $V = 4,15 \mu\text{L}$, $q_v = 12, 8, 6, 4$ i $2 \mu\text{L/min}$)

Reakciju otvaranja prstena 2-(4-trifluorometil)fenil oksirana s natrijevim cijanidom, kataliziranu HheC-W249P, je moguće provesti i u kotlastom reaktoru i u mikroreaktoru. U oba slučaja su

prisutne i sporedne reakcije, reakcija hidrolize i kemijska reakcija. Kotlasti reaktor se čini boljim izborom za provedbu ove reakcije jer nastaje veća koncentracija 2-(4-trifluormetil)fenil hidroksinitrila. Kod mikroreaktora, najviše cijanoalkohola nastaje pri najvećem vremenu zadržavanja, a tada su reakcija hidrolize i kemijska reakcija najizraženije. Također, aktivnost enzima pada s povećanjem vremena zadržavanja. U kotlastom reaktoru, do nastanka znatnije količine diola i cijanoalkohola dolazi samo pri dugom vremenu provođenja reakcije.

5. ZAKLJUČAK

Ovim je radom pokazano da je reakciju otvaranja prstena 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana uz natrijev cijanid kao nukleofil, katalizirana HheC-W249P, moguće provesti u kotlastom reaktoru i u mikroreaktoru. Produkt reakcije je 2-(4-trifluormetil)fenil hidroksinitril koji može poslužiti kao važan aktivni spoj u proizvodnji lijekova. Osim ove reakcije, ispitivane su i sporedne reakcije, reakcija hidrolize i kemijska reakcija, koje se mogu paralelno odvijati u reaktorima. Koncentracija 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana je određena uz pomoć baždarnog pravca, dok 2-(4-trifluormetil)fenil hidroksinitril nije bilo moguće kvantificirati radi nepostojanja standarda.

Provedbom reakcije u kotlastom reaktoru nastaje znatna količina produkta, 2-(4-trifluormetil)fenil hidroksinitrila. Kao najbolji uvjeti provedbe ove reakcije u kotlastom reaktoru su se pokazali oni s najvećom ekvimolarnom koncentracijom supstrata i nukleofila, $c_{\text{epox}} = c_{\text{NaCN}} = 20 \text{ mM}$ i koncentraciji enzima 5 mg/mL . Cijanoalkohol kemijskom reakcijom nastaje u znatno manjoj količini naspram onom nastalom enzimskom reakcijom. Reakcija hidrolize je prisutna cijelo vrijeme provođenja reakcije, a količina diola nastalog raspadom epoksida se povećava s vremenom.

Kao početni uvjeti koncentracije supstrata i nukleofila za provedbu reakcije u mikroreaktoru su odabrani najpovoljniji uvjeti provođenja reakcije u kotlastom reaktoru. Reakcija je ispitivana kod različitih volumnih protoka reakcijske smjese, odnosno vremena zadržavanja. Količina nastalog produkta se povećava s povećanjem vremena zadržavanja. Što je veće vrijeme zadržavanja, izraženije su i sporedne reakcije. Osim sporednih reakcija, povećanjem vremena zadržavanja dolazi i do deaktivacije enzima.

Kotlasti se reaktor se čini mnogo boljim izborom za provedbu reakcije otvaranja prstena 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana uz enzim HheC-W249P kao biokatalizator. Stabilnost epoksida se može povećati povećanjem udjela organskog otapala čime se povećava njegova topljivost. No, to negativno utječe na aktivnost enzima koji imaju nisku aktivnost u organskim otapalima. Moguće rješenje je uporaba proteinskog inženjerstva kako bi se uzgojile stanice koje proizvode enzime s većom tolerancijom prema organskim medijima. Problem aktivnosti enzima je posebno vidljiv kod sustava s mikroreaktorom. Sa smanjenjem prostornog vremena zadržavanja reakcijske smjese dolazi do snažne deaktivacije enzima. Reakcija bi se mogla provoditi pri vrlo visokim prostornim vremenima zadržavanja, no tada su izražene sporedne reakcije. Druga je

mogućnost stabilizirati enzim imobilizacijom na stijenke mikroreaktora što može poslužiti za daljnja ispitivanja

6. POPIS SIMBOLA

A – apsorbancija, /

$c_{rac-epoksid}$ – množinska koncentracija racemične smjese 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana, mM

c_{NaCN} – koncentracija otopine natrijeva cijanida, mM

c_{DMSO} – koncentracija dimetil sulfoksida, mM

d – širina kvarcne kivete, cm

DMSO – dimetil sulfoksid

E_a – energija aktivacije

HHDH- halogenhidrin-dehalogenaza

HheA – A tip halogenhidrin-dehalogenaze

HheC, HheC-W249P – C tip halogenhidrin-dehalogenaze

HheG – G tip halogenhidrin-dehalogenaze

HPLC – kapljevinska kromatografija visoke djelotvornosti

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

KR – kotlasti reaktor

MTBE – metil *terc*-butil eter

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

PNSO - *p*-nitrostiren oksid

q_v – protok reakcijske smjese, $\mu\text{L min}^{-1}$

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

T – temperatura, $^{\circ}\text{C}$

t – vrijeme, s

TO – temeljna otopina

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

U – jedinica enzimске aktivnosti

UV zračenje – ultraljubičasto zračenje

V – volumen mikroreaktora, μL

V_E – volumen enzima, cm^3

V.A. – volumna aktivnost, U cm^{-3}

V_{rs} – volumen reakcijske smjese, μL

V_r – volumen uzorka u kivetu, cm^3

γ – masena koncentracija, mg dm^{-3}

$\gamma^{\text{HheC-W249P}}$ – masena koncentracija C tipa halogenhidrin-dehalogenaze, mg mL^{-1}

Δ – promjena

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

λ – valna duljina, nm

τ – prostorno vrijeme zadržavanja

7. LITERATURA

1. *Pellis, A., Cantone, S., Ebert, C., Gardossi, L.*, Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities, *N Biotechnol* **40** (2018) 154–169.
2. *Wohlgemuth, R.*, Biocatalysis – Key enabling tools from biocatalytic one-step and multi-step reactions to biocatalytic total synthesis, *N Biotechnol* **60** (2021) 113–123.
3. *Sheldon, R. A., Brady, D.*, The limits to biocatalysis: pushing the envelope, *Chem. Commun.* **54** (2018) 6088.
4. *Schmid, A., Hollmann, F., Park, J. B., Bühler, B.*, The use of enzymes in the chemical industry in Europe, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13** (2002) 359–366.
5. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=18053> (30.5.2021.)
6. *Bošković, M., Podhorsky, R.*, Enzimi, *Tehnička enciklopedija*, sv. 5, Zagreb 334-345 (1976).
7. <https://www.britannica.com/science/protein/The-specificity-of-enzymes> (30.5.2021.)
8. <https://www.britannica.com/science/catalysis/Biological-catalysts-the-enzymes> (30.5.2021.)
9. <https://tehnika.lzmk.hr/enzimi/> (30.5.2021.)
10. *Bugg, T. D. H.*, Enzymes: General Properties, *Encyclopedia of life sciences*, John Wiley & Sons, Ltd. (2001).
11. <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=7975> (30.5.2021.)
12. *Wong, D. W. S.*, Structures of Proteins, *The ABCs of Gene Cloning*, Springer International Publishing, United States, (2018) 21–28.
13. *Palmer, T., Bonner, P. L.*, The Structure of Proteins, *Enzymes*, Woodhead Publishing, United States, (2011) 14–43.
14. *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.* **39** (2010) 156–164.
15. *Patel, A. K., Singhania, R. R., Pandey, A.*, Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes, *Biotechnology of Microbial Enzymes*, Academic Press (2017) 14-41.
16. *Blanco, A., Blanco, G.*, Medical Biochemistry, *Enzymes*, Academic press, 1st edition, (2017) 153-175.

17. *Ben-Naim, A.*, Cooperativity and Regulation in Biochemical Processes, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2001.
18. *Hedstrom, L.*, Enzyme Specificity and Selectivity, *Encycl. Life Sci.* (2001)1–7.
19. *Koshland, D. E.*, The Key - Lock Theory and the Induced Fit Theory, *Angew. Chemie*, **106** (1994) 2468–2472.
20. *Koshland, D. E.*, Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **44** (1958) 98–104.
21. *Peran, J., Pušić, T.*, Enzimi - bioinovatori u pranju rublja, *Tekstil* **62** (2013) 329-337.
22. *Cornils, B., Herrmann, W. A., Zanthoff, H. W., Wong, C. H.*, Catalysis from A to Z: A Concise Encyclopedia, Volume 1, Fourth Edition, C. (2013). Catalysis from A to Z, 357–636.
23. <https://www.britannica.com/science/enzyme> (30.5.2021.)
24. *Beilen, J. B., Li, Z.*, Enzyme technology: an overview, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13** (2002) 338–344.
25. *Kirk, O., Borchert, T. V., Fuglsang, C. C.*, Industrial enzyme applications, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13** (2002) 345–351.
26. *Basso, A., Serban, S.*, Industrial applications of immobilized enzymes—A review, *Mol. Catal.* **479** (2019) 110607.
27. *Pollard, D. J., Woodley, J. M.*, Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now, *Trends Biotechnol.* **25** (2006) 67-73.
28. *Fryszkowska, A., Devine, P. N.*, Biocatalysis in drug discovery and development, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **55** (2020) 151–160.
29. *Sun, H., Zhang, H., Ang, E. L., Zhao, H.*, Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical Intermediates, *Bioorg. Med. Chem.* **26** (2018) 1275-1284.
30. *Patel, R. N.*, Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis, *Coord. Chem. Rev.* **252** (2008) 659–701.
31. *Pellis, A., Cantone, S., Ebert, C., Gardossi, L.*, Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities, *N Biotechnol* **40** (2018) 154–169.
32. *Schallmeyer, M., Koopmeiners, J., Wells, E., Wardenga, R., Schallmeyer, A.*, Expanding the Halohydrin Dehalogenase Enzyme Family: Identification of Novel Enzymes by Database Mining, *Appl. Environ. Microbiol.* **80** (2014) 7303–7315.

33. *Majerić Elenkov, M., Tang, L., Meetsma, A., Hauer, B., Janssen, D. B.*, Formation of Enantiopure 5-Substituted Oxazolidinones through Enzyme-Catalysed Kinetic Resolution of Epoxides, *Org. Lett.* **10** (2008) 2417-242.
34. *Chen, S. Y., He, X. Y., Wu, J. P., Xu, G., Yang, L. R.*, Identification of Halohydrin Dehalogenase Mutants that Resist COBE Inhibition, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **19** (2014) 26-32.
35. *Faber, K., Kroutil, W.*, New enzymes for biotransformations, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9** (2005) 181–187.
36. *Schallmey, A., Schallmey, M.*, Recent advances on halohydrin dehalogenases—from enzyme identification to novel biocatalytic applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100** (2016) 7827–7839.
37. *Tang, L., Pazmin, D. E. T., Fraaije, M. W., de Jong, R. M., Dijkstra, B. W., Janssen, D. B.*, Improved Catalytic Properties of Halohydrin Dehalogenase by Modification of the Halide-Binding Site, *Biochemistry* **44** (2005) 6609-6618.
38. *Majerić Elenkov, M., Szymanski, W., Janssen D. B.*, Reactions Catalyzed by Halohydrin Dehalogenases, *Science of Synthesis; Biocatalysis in Organic Synthesis 2*, Faber, K.; Fessner, W.-D. ; Turner, N. (Eds.), Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2014, 507-527.
39. *de Jong, R. M., Kalk, K. H., Tang, L., Janssen, D.B., Dijkstra, B. W.*, The X-Ray Structure of the Haloalcohol Dehalogenase HheA from *Arthrobacter* sp. Strain AD2: Insight into Enantioselectivity and Halide Binding in the Haloalcohol Dehalogenase Family, *J. Bacteriol. Res.* **188** (2006) 4051–4056.
40. *Poelarends, G. J., Whitman, C. P.*, Mechanistic and Structural Studies of Microbial Dehalogenases: How Nature Cleaves a Carbon–Halogen Bond. *Comprehensive Natural Products II*, (2010) 89–123.
41. *de Jong, R. M., Tiesinga, J. J. W., Villa, A., Tang, L., Janssen, D. B., Dijkstra, B. W.*, Structural Basis for the Enantioselectivity of an Epoxide Ring Opening Reaction Catalyzed by Halo Alcohol Dehalogenase HheC, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 13338-13343.
42. *Schallmey, M., Floor, R. J., Szymanski, W., & Janssen, D. B.*, Hydrolysis and Reverse Hydrolysis: Halohydrin Dehalogenases, *Comprehensive Chirality* **7** (2012) 143–155.
43. *Hu, D., Ye, H. H., Wu, M. C., Feng, F., Zhu, L. J., Yin, X., Li, J. F.*, Chemoenzymatic preparation of (*S*)-*p*-nitrostyrene oxide from *p*-nitrophenacyl bromide by recombinant

- Escherichia coli* cells expressing a novel halohydrin dehalogenase, *Catal. Commun.* **69** (2015) 72–75.
44. Hasnaoui-Dijoux, G., Majerić Elenkov, M., Lutje Spelberg, J. H., Hauer, B., Janssen, D. B., Catalytic Promiscuity of Halohydrin Dehalogenase and its Application in Enantioselective Epoxide Ring Opening. *ChemBioChem*, **9** (2008) 1048–1051.
45. Schallmeyer, A., Schallmeyer, M., Recent advances on halohydrin dehalogenases—from enzyme identification to novel biocatalytic applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100** (2016) 7827–7839.
46. Solarczek, J., Klünemann, T., Brandt, F., Schrepfer, P., Wolter, M., Jacob, C. R., Blankenfeldt, W., Schallmeyer, A., Position 123 of halohydrin dehalogenase HheG plays an important role in stability, activity, and enantioselectivity, *Sci. Rep.* **9** (2019) 5106.
47. Jin, H.-X., Hu, Z.-C., Liu, Z.-Q., Zheng, Y.-G., Nitrite-mediated synthesis of chiral epichlorohydrin using halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **59** (2012) 170–177.
48. Mikleušević, A., Primožić, I., Hrenar, T., Salopek-Sondi, B., Tang, L., Majerić Elenkov, M., Azidolysis of epoxides catalysed by the halohydrin dehalogenase from *Arthrobacter* sp. AD2 and a mutant with enhanced enantioselectivity: an (S)-selective HHDH, *Tetrahedron Asymmetry* **27** (2016) 930–935.
49. Tang, L., Zhu, X., Zheng, H., Jiang, R., Majerić Elenkov, M., Key Residues for Controlling Enantioselectivity of Halohydrin Dehalogenase from *Arthrobacter* sp. Strain AD2, Revealed by Structure-Guided Directed Evolution, *Appl. Environ. Microbiol.* (2012) 2631–2637.
50. Koopmeiners, J., Diederich, C., Solarczek, J., Voß, H., Mayer, J., Blankenfeldt, W., Schallmeyer, A., HheG, a Halohydrin Dehalogenase with Activity on Cyclic Epoxides, *ACS Catal.* **7** (2017) 6877–6886.
51. Ma, S. K., Gruber, J., Davis, C., Newman, L., Gray, D., Wang, A., Grate, J., Huisman, G. W., Sheldon, R. A., A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate, *Green Chem.* **12** (2010) 81–86.
52. Koopmeiners, J., Halmschlag, B., Schallmeyer, M., Schallmeyer, A., Biochemical and biocatalytic characterization of 17 novel halohydrin dehalogenases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100** (2016) 7517–7527.
53. De Jong, R. M., Tiesinga, J. J. W., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Tang, L., Janssen, D. B., Dijkstra, B. W., Structure and mechanism of a bacterial haloalcohol dehalogenase: a

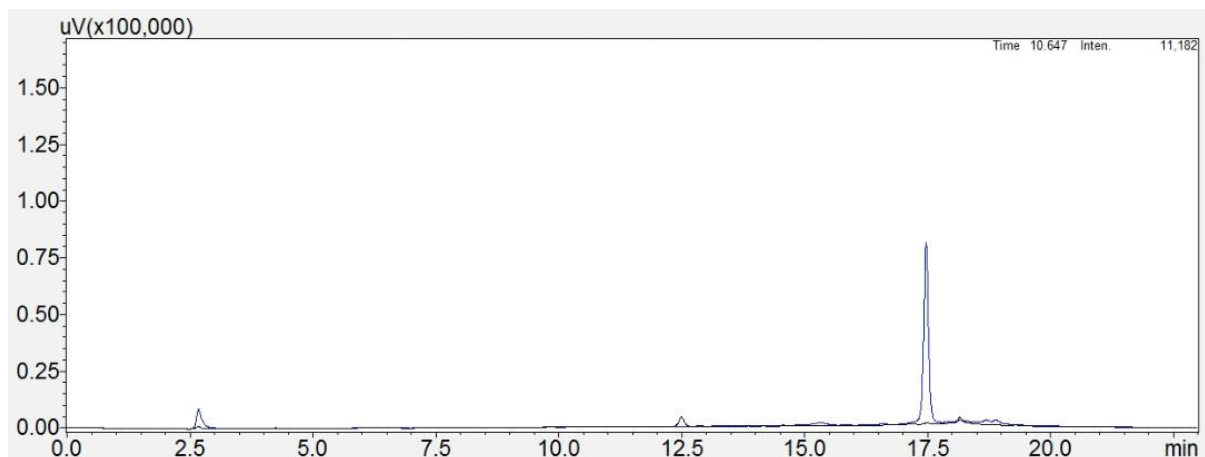
- new variation of the short-chain dehydrogenase/reductase fold without an NAD(P)H binding site, *EMBO J.* **22** (2003) 4933-4944.
54. *Findrik Blažević, Z., Milčić, N., Sudar, M., Majerić Elenkov, M.,* Halogenhydrin Dehalogenases and Their Potential in Industrial Application – a Viewpoint of Enzyme Reaction Engineering, *Adv. Synt. Catal.* **363** (2020) 388-410.
55. *Campbell-Verduyn, L. S., Szymański, W., Postema, C. P., Dierckx, R. A., Elsinga, P. H., Janssen, D. B., Feringa, B. L.,* One pot “click” reactions: tandem enantioselective biocatalytic epoxide ring opening and [3+2] azide alkyne cycloaddition, *Chem. Commun.* **46** (2010) 898.
56. *Lutje Spelberg, J. H., van Hylckama Vlieg, J. E. T., Tang, L., Janssen, D. B., Kellogg, R. M.,* Highly Enantioselective and Regioselective Biocatalytic Azidolysis of Aromatic Epoxides, *Org. Lett.* **3** (2001) 41-43.
57. *Majerić Elenkov, M., Hoeffken, H. W., Tang, L., Hauer, B., Janssen, D. B.,* Enzyme-Catalyzed Nucleophilic Ring Opening of Epoxides for the Preparation of Enantiopure Tertiary Alcohols, *Adv. Synth. Catal.* **349** (2007) 2279 – 2285.
58. *Schallmeyer, M., Floor, R. J., Hauer, B., Breuer, M., Jekel, P. A., Wijma, H. J., Dijkstra, B. W., Janssen, D. B.,* Biocatalytic and Structural Properties of a Highly Engineered Halohydrin Dehalogenase, *ChemBioChem* **14** (2013) 870 – 881.
59. *Janssen, D. B., Majerić-Elenkov, M., Hasnaoui, G., Hauer, B., Lutje Spelberg, J. H.,* Enantioselective formation and ring-opening of epoxides catalysed by halohydrin dehalogenases, *Biochem. Soc. Trans.* **34** (2006) 291-295.
60. *Tao, J., Xu, J. H.,* Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13** (2009) 43–50.
61. <https://www.britannica.com/science/epoxide> (1.6.2012)
62. *Smith, J. G.,* Synthetically Useful Reactions of Epoxides, *Synth.* (1984) 629-656.
63. *Deregnacourt, J., Archelas, A., Barbirato, F., Paris, J. M., Furstoss, R.,* Enzymatic Transformations 63. High-Concentration Two Liquid- Liquid Phase *Aspergillus niger* Epoxide Hydrolase-Catalysed Resolution: Application to Trifluoromethyl-Substituted Aromatic Epoxides, *Adv. Synth. Catal.* **349** (2007) 1405 – 1417.
64. *Yildirim, D., Tükel, S. S., Alagöz, D., Alptekin, Ö.,* Preparative-scale kinetic resolution of racemic styrene oxide by immobilized epoxide hydrolase. *Enzyme Microb. Technol.*, **49** (2011) 555–559.

65. *Monterde, M. I., Lombard, M., Archelas, A., Cronin, A., Arand, M., Furstoss, R.,* Enzymatic transformations. Part 58: Enantioconvergent bihydrolysis of styrene oxide derivatives catalysed by the *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase. *Tetrahedron: Asymmetry*, **15** (2004) 2801–2805.
66. *Schallmeyer, M., Jekel, P., Tang, L., Majerić Elenkov, M., Höffken, H. W., Hauer, B., Janssen, D. B.,* A single point mutation enhances hydroxynitrile synthesis by halohydrin dehalogenase, *Enzyme Microb. Technol.* **70** (2015) 50–57.
67. *Kamal, A., Khanna, G. B. R., Krishnaji, T., Ramu, R.,* Lipase-mediated resolution of 3-hydroxy-4-trityloxybutanenitrile: synthesis of 2-amino alcohols, oxazolidinones and GABOB. *Tetrahedron: Asymmetry*, **17** (2006) 1281–1289.
68. *Kamal, A., Khanna, G. B. R., Ramu, R.,* Chemoenzymatic synthesis² of both enantiomers of fluoxetine, tomoxetine and nisoxetine: lipase-catalyzed resolution of 3-aryl-3-hydroxypropanenitriles, *Tetrahedron: Asymmetry* **13** (2002) 2039–2051.
69. *Malik, M. S., Asghar, B. H., Azeeza, S., Obaid, R. J., Thagafi, I. I., Jassas, R. S., Altass, H. M., Morad, M., Moussa, Z., Ahmed, S. A.,* Facile Amberlyst A-21 catalyzed access of β -hydroxynitriles via epoxide opening in water, *Arab. J. Chem.* **13** (2020) 8200-8208.
70. *Majerić Elenkov, M., Hauer, B., Janssen, D. B.,* Enantioselective Ring Opening of Epoxides with Cyanide Catalysed by Halohydrin Dehalogenases: A New Approach to Non-Racemic β -Hydroxy Nitriles, *Adv. Synth. Catal.* **348** (2006) 579 – 585.
71. *Z. Gomzi,* Kemijski reaktori, Zagreb:HINUS, 2009 (udžbenik).
72. *Liu, S.,* Batch reactor. *Bioprocess Eng.* (2020) 109–140.
73. *Šalić, A., Zelić, B.,* Synergy of Microtechnology and Biotechnology: Microreactors as an Effective Tool for Biotransformation Processes, *Food Technol. Biotechnol.* **56** (2018) 464-479.
74. *Šalić, A., Tušek, A., Kurtanjek, Ž., Zelić, B.,* Mikroreaktori, *Kem. Ind.* **59** (2010) 227-248.
75. *Šalić, A., Tušek, A., Zelić, B.,* Application of microreactors in medicine and biomedicine, *J. Appl. Biomed.* **10** (2012) 137–153.
76. *Sudar, M., Findrik, Z., Vasić-Rački, Đ., Clapés, P., Lozano, C.,* Aldol addition of dihydroxyacetone to N-Cbz-3-aminopropanal catalyzed by two aldolases variants in microreactors, *Enzyme Microb. Technol.* **53** (2013) 38–45.

77. Gruber, P., Marques, M. P. C., O'Sullivan, B., Baganz, F., Wohlgemuth, R., Szita, N., Conscious coupling: The challenges and opportunities of cascading enzymatic microreactors, *Biotechnol. J.* **12** (2017) 1700030.
78. Šalić, A., Tušek, A., Kurtanjek, Ž., Zelić, B., Biotransformation in a microreactor: New method for production of hexanal. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **16** (2011) 495–504.
79. Urban, P. L., Goodall, D. M., Bruce, N. C., Enzymatic microreactors in chemical analysis and kinetic studies, *Biotechnol. Adv.* **24** (2006) 42–57.

8. PRILOZI

Prilog 1. Kromatogram dobiven analizom uzoraka, retencijsko vrijeme 2-(4-trifluormetil)fenil hidrosinitrila 12,3 min; 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana:17,5 min



Prilog 2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije 2-(4-trifluormetil)fenil oksirana

