

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Dominik Knapić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Dominik Knapić

AKTIVNOST HALOHIDRIN-DEHALOGENAZE U REAKCIJI  
NASTAJANJA EPOKSIDA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Đurđa Vasić – Rački

Članovi ispitne komisije:  
Prof. dr. sc. Đurđa Vasić – Rački  
Izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki  
Dr. Sc. Zvonimir Katančić

Zagreb, rujan 2016.

*Zahvaljujem se obitelji i prijateljima na svojoj potpori, asistentici Aneri Švarc, dipl.inž. i profesorici Ani Vrsalović-Presečki na pomoći za vrijeme eksperimentalnog dijela u labosu, te posebno se zahvaljujem mentorici profesorici Đurđi Vasić-Rački na pomoći, usmjeravanju i pristupačnosti za vrijeme pisanja završnog rada i studiranja.*

## Sažetak

Istraživana je reakcija dehalogenacije 1,3 diklor-2-propanola koju katalizira enzim halohidrin-dehalogenaza (HHDH). Određena je aktivnost te optimizirana metoda određivanja aktivnosti enzima. Određivane su koncentracije  $\alpha$ -kloroalkohola i epoksida plinskom kromatografijom s plameno ionizacijskim detektorom. Određena je i kinetika enzima pri pH 8. Reakcija dehalogenacije je provedena u kotlastom reaktoru. Rezultati su pokazali da enzim halohidrindehalogenaza nije specifičan na  $\alpha$ -kloroalkohol. Kao optimalni pufer za mjerenje aktivnosti odabran je 0.1 M fosfatni pufer pH 8, a kao optimalna 10 mM koncentracija supstrata. Eksperimenti u reaktoru su pokazali da koncentracija epoksida koji je reakcijski produkt opada tijekom provedbe reakcije. Aktivnost enzima također opada, a nakon 4 sata ostaje stalna.

**Ključne riječi:** halohidrin-dehalogenaza,  $\alpha$ -kloroalkohol, epoksid, dehalogenacije

## **Abstract**

This reaserch deals with the reaction of dehalogenation of 1,3 dichloro-2-propanol that is catalyzed by the enzyme halohydrin-dehalogenase (HHDH). The activity of enzyme was determined. The method of determining the enzyme activity was optimized. The concentrations of  $\alpha$ -chloroalcohol and epoxyde were determend with the gas chromatography which was supplied with the flame ionization detector The kinetics of the enzyme reaction at pH 8 was also determined. The reacton of dehalogenation was tested in a batch reactor. The results showed that the enzyme halohydrin-dehalogenase is not specific to  $\alpha$ -chloroalcohol. As the optimum buffer for activity measurements 0.1 M phosphate buffer pH 8 was selected. 10 mM substrate concentration was chosen as optimal. Experiments in the reactor showed that the concentration of the epoxyde which is the reaction product decreases during the reaction. Enzyme activity also decreases, and after 4 hours remains constant.

**Key words:** halohydrin-dehalogenase,  $\alpha$ -chloroalcohol, epoxyde, dehalogenation

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Enzimi .....	2
2.2 Halohidrin dehalogenaza.....	4
2.3 Kinetika enzima.....	5
2.4. Epoksidi.....	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	9
3.1. Aparatura.....	9
3.1.1. Spektrofotometar .....	9
3.1.2. Plinski kromatograf .....	9
3.1.3. Centrifuga.....	10
3.1.4. Kotlasti bioreaktor.....	10
3.1.5. Analitička vaga.....	11
3.1.6. Homogenizator .....	11
3.2. Analitičke metode .....	12
3.2.1. Određivanje koncentracije klora .....	12
3.2.2. Određivanje aktivnosti enzima halohidrin dehidrogenaze .....	12
3.2.3. Određivanje koncentracije $\alpha$ -kloralkohola i epoksida.....	13
3.2.4. Određivanje kinetike enzima halohidrindehalogenaze .....	14
3.2.5. Provedba reakcije dehalogenacije $\alpha$ -kloralkohola u reaktoru .....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	15
4.1. Optimiranje metode određivanja aktivnosti enzima halogenhidrin dehalogenaze.....	15
4.2. Određivanje kinetike enzima halohidrin dehalogenaze u kotlastom reaktoru .....	18
4.3. Provedba reakcije dehalogenacije u kotlastom reaktoru .....	19
5. ZAKLJUČAK .....	21
6. SIMBOLI .....	21
7. LITERATURA.....	22
8. ŽIVOTOPIS .....	23

## UVOD

Aktivnost enzima poznata je već tisućama godina. Fermentacija šećera u alkohol sa kvascem je jedan od najranijih primjera biotehnoloških procesa. Međutim, tek nedavno su u potpunosti shvaćena svojstva enzima [1]. S boljim znanjem o enzimima razvijene su i bolje tehnike primjene enzima u industrijskim procesima. Istraživanja enzima su u proteklim godinama ušla u novu fazu razvoja.

Biokataliza se ubrzano transformira iz akademske znanosti u industrijsku tehnologiju i ima potencijal da promijeni temelje kemijske industrije iz petrokemijske u biokemijsku [2]. Prednost biokatalizatora pred klasičnim katalizatorima su njihov manji utjecaj na okoliš i u većini slučajeva selektivnost, dok su im mane nestabilnost pri drugačijim uvjetima od onih u kojima se nalaze u stanici organizma [5].

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Enzimi

Mnoge kemijske reakcije mogu se odvijati spontano, dok se neke nemogu odvijati značajnijom brzinom bez katalizatora. Katalizatori su molekule koje mjenjanjem reakcijskog puta snižavaju energetska barijeru potrebnu da se određena supstanca kemijski transformira u drugu. Termodinamički, ta energetska barijera se izražava u obliku promijene slobodne energije. Katalizator nakon reakcije ostaje nepromijenjen, ali se nemože beskonačno koristiti zbog limitirane stabilnosti odnosno nemogućnosti da zadrži svoju aktivnu strukturu .

Biokemijske reakcije, odnosno kemijske reakcije koje se odvijaju u metabolizmu svih živih stanica, moraju biti katalizirane kako bi bile dovoljno brze za normalno održavanje metabolizma, te tako omogućile daljnji život stanice. Takvi biološki katalizatori zovu se enzimi. Svaka biokemijska reakcija u stanici živog metabolizma zahtijeva katalizu sa specifičnim enzimom. Enzimi su proteinske molekule koje su evoluirale tako da efikasno kataliziraju biokemijske reakcije u blagim uvjetima unutar bioloških sustava. Pretpostavlja se da gotovo svaka reakcija ima svoj specifični enzim koji je može katalizirati. Zbog toga znanstvenici diljem planete rade na istraživanjima enzima, i kaže se da je 21. stoljeće stoljeće biotehnologije. Enzimi su poželjni katalizatori zbog svoje specifičnosti, učinkovitosti, reakcijskih uvjeta u kojima djeluju, biorazgradivosti te svoje klasifikacije kao prirodnog produkta. Nedostatak im je visoka cijena i kompleksna struktura [3].

Enzimi su klasificirani prema reakcijama koje kataliziraju. Mnogi enzimi su nazvani dodavanjem sufiksa "-aze" na ime svog supstrata, riječ ili izraz koji opisuje njihovu djelatnost. Ponekad isti enzimi imaju dva ili više imena, odnosno dva različita enzima imaju isti naziv. Zbog takvih nejasnoća, i stalno rastućeg broj novootkrivenih enzima, biokemičari su međunarodnim ugovorom usvojili sustav za imenovanje i klasificiranje enzima [4].

Prema Međunarodnom savezu za biokemiju enzimi se dijele u šest osnovnih skupina prema tipu reakcije koje kataliziraju:

- Oksidoreduktaze kataliziraju redoks reakcije, odnosno sudjeluju u prijenosu elektrona, vodikovih ili kisikovih atoma. Ti enzimi sudjeluju u centralnim metaboličkim putevima unutar stanice.
- Transferaze su enzimi koji kataliziraju reakcije u kojima dolazi do premještanja različitih grupa s jedne molekule na drugu (npr. aldehidne, ketonske grupe).
- Hidrolaze kataliziraju reakcije u kojima dolazi do hidrolize.

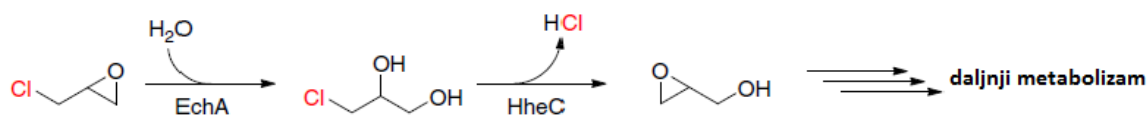


- Liaze kataliziraju reakcije nehidrolitičkih i neoksidativnih cijepanja kemijskih veza. Podijeljene su u 7 grupa, ovisno koju vezu cijepaju (C-C; C-O; C-N; C-S; C-X ; P-O)
- Izomeraze su enzimi koji kataliziraju pregradnju unutar molekula pri čemu se uspostavlja ravnoteža između izomera. Izomeraze kataliziraju reakcije izomerizacije kao što je migracija C=C veze.
- Ligaze kataliziraju reakcije u kojima dolazi do nastajanja novih spojeva uz pomoć energije neke treće komponente koja se oslobađa raspadom te komponente (najčešće adenzintrifosfata koji se raspada na adenzindifosfat i fosfat ili adenzinmonofosfat i difosfat). Ovi enzimi kataliziraju stvaranje C-O, C-N i C-C veze.

Činjenica da su enzimi vrlo specifični prema supstratu i da im je molekula generalno puno veća od molekule supstrata na kojeg se vežu postala je vrlo rano poznata. Najranije kinetičke analize reakcija kataliziranih enzimima upućivale su na formaciju kompleksa enzim-supstrat. Takav kompleks je objašnjen konverzijom supstrata u produkt na određenom mjestu na molekuli enzima. To mjesto se naziva aktivni centar ili katalitičko mjesto[3].

## 2.2 Halohidrin dehalogenaza

Halohidrin dehalogenaza ( još zvana haloalkohol dehalogenaza ili vodikov-halid liaza) pripada posebnoj grupi enzima koji kataliziraju cijepanje halidnog iona i protona s vicinalnog halohidrina pritom formirajući epoksid. Halohidrin dehalogenaze su rijetki enzimi koji su otkriveni tek u nekoliko bakterijskih sojeva u kojima sudjeluju u biološkoj razgradnji ksenobiotika kao na primjer epiklorhidrina, 1,3-diklor-2-propanola ili 1,2-dibrometana. Dehalogenacija ovih spojeva odvija se eliminacijom halida sa haloalkohola tvoreći epoksid intramolekularnim zatvaranjem prstena.



Slika 2.1. Reakcijski put epiklorhidrina kataliziran enzimom iz *Agrobacterium radiobacter* AD1. Inicijalno, epiklorhidrin je hidroliziran uz epoksid hidrolazu (EchA) tvoreći 3-kloro-1,2-propandiol, koji je supstrat za halohidrin dehalogenazu (HheC), pri čemu nastaje glicidol koji dalje metabolizira. [6.]

## 2.3 Kinetika enzima

Teorija reakcija kataliziranih enzima predložena od strane Michaelisa i Mentena 1913. godine je bazirana na pretpostavci da enzim (katalizator, E) i supstrat (reaktant, S) tvore kompleks (ES) u povratnoj reakciji. Kompleks je potom konvertiran u produkt (P) uz konstantu brzine  $k_2$ .



U često korištenim uvjetima za mjerenje enzimске aktivnosti  $c_{ES}$  se može smatrati konstantnim, jer je njegova brzina promjene jednaka nuli.

$$\frac{d(c_{ES})}{dt} = 0 = (k_1 \cdot c_E \cdot c_S) - (k_{-1} \cdot c_{ES}) - (k_2 \cdot c_{ES}) \quad (2.2)$$

Korištenjem izraza 2.3, za bilancu enzima:

$$c_{Et} = c_E + c_{ES} \quad (2.3)$$

dobiva se:

$$0 = k_1 \cdot (c_{Et} - c_{ES}) \cdot c_S - (k_{-1} \cdot c_{ES}) - (k_2 \cdot c_{ES}) \quad (2.4)$$

ili

$$c_{ES} = \frac{k_1 \cdot c_{Et} \cdot c_S}{k_{-1} + k_2 + k_1 \cdot c_S} \quad (2.5)$$

Uvođenjem Michaelis-Mentenove konstante  $K_M$ ,

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.6)$$

i početne brzine reakcije kao funkcije međuprodukta  $c_{ES}$

$$v = k_2 \cdot c_{ES} \quad (2.7)$$

te maksimalne brzine reakcije  $V$ , koja je dosegnuta kada je sav enzim zasićen supstratom

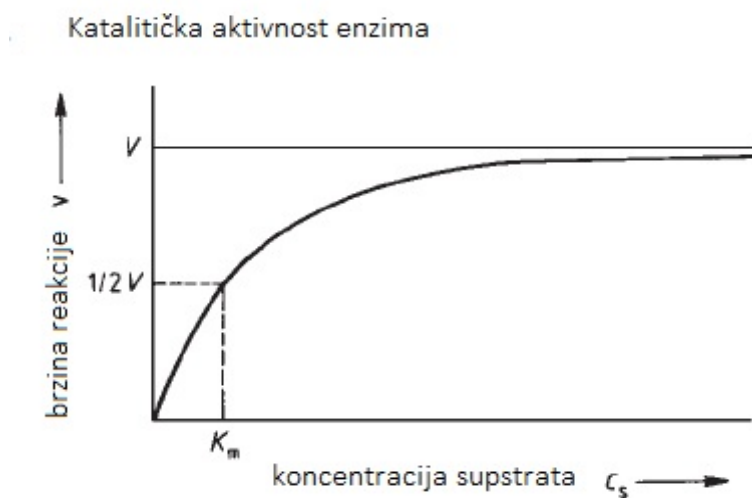
$$c_{ES} = c_{Et}$$

$$V = k_2 \cdot c_{Et} \quad (2.8)$$

dobiva se takozvana Michaelis-Mentenova jednačba za početnu brzinu reakcije

$$v = \frac{V \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad (2.9)$$

koja prikazuje ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata. Grafički prikaz ove ovisnosti dan je na slici 2.2.



**Slika 2.2.** Brzina reakcije kao funkcija koncentracije supstrata

Kao što se može vidjeti iz grafa (slika 2.2), Michaelisova konstanta je jednaka koncentraciji supstrata pri polovici maksimalne brzine reakcije. Veličina  $K_M$  može se promatrati crtanjem grafa eksperimentalno izmjerenih brzina reakcija o ovisnosti o koncentracijama različitih supstrata ( slika 2.2. ). Prikladniji način prikaza jednadžbe 2.9 (2.11)

$$\frac{1}{v} = \frac{k_M}{V} \cdot \frac{1}{c_S} + \frac{1}{V} \quad (2.11)$$

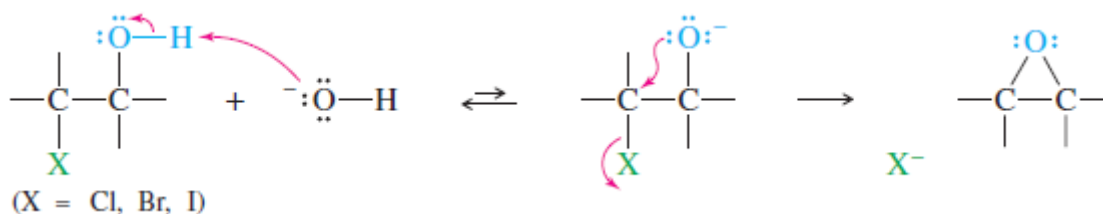
Michaelisova konstanta približava se konstanti disocijacije  $K_S$  kompleksa enzim-supstrat i zato je vrlo važna za određivanje individualne kinetike reakcija. Michaelisova konstanta za enzime obično ose kreće od  $10^{-2}$  do  $10^{-5}$  mol/L. Mala vrijednost  $K_M$  indicira visok afinitet između enzima i supstrata. [1]

## 2.4. Epoksidi

Epoksidi su tročlani ciklički eteri, obično se dobivaju peroksi-kiselom oksidacijom odgovarajućeg alkena. Podlježu mnogobrojnim i korisnim sintetičkim reakcijama. Zbog toga su vrijedni intermedijari.

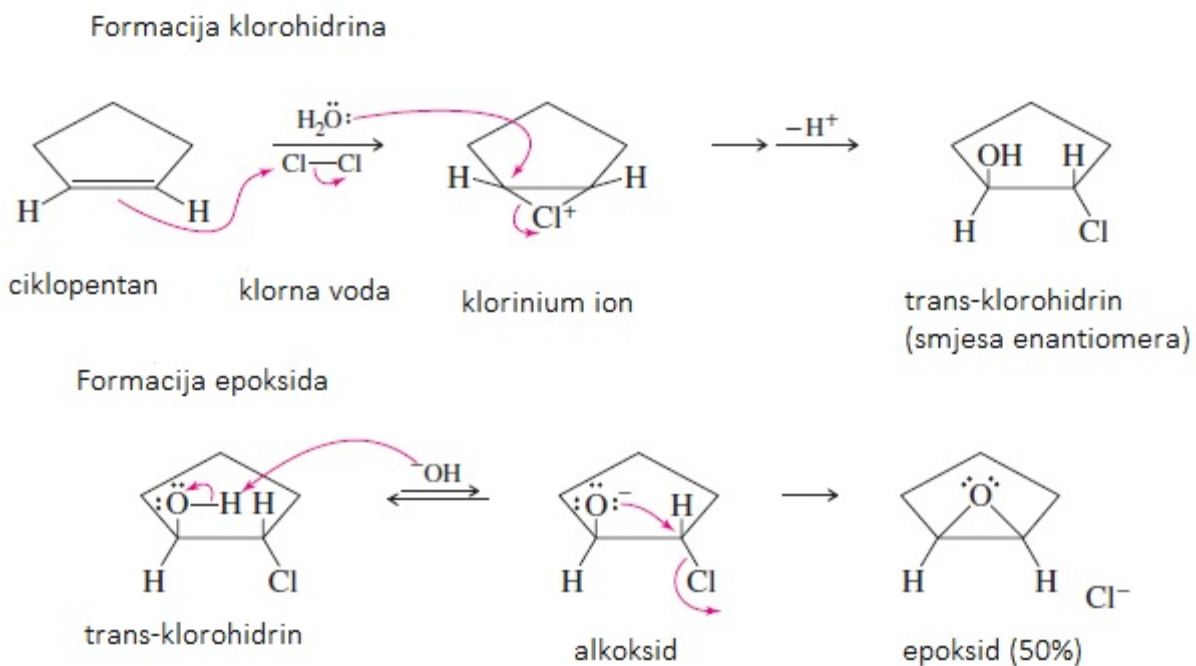
Bazom promovirana ciklizacija halohidrina

Sinteza epoksida i ostalih cikličkih etera može se provoditi varijacijom Williamsonove sinteze etera. Ako su alkoksidni ion i halidni atom locirani na istoj molekuli, alkoksid može zamijeniti halidni ion i tako formirati prsten. Tretiranje halohidrina bazom vodi do epoksida preko  $S_N2$  napada. (slika 2.3.)



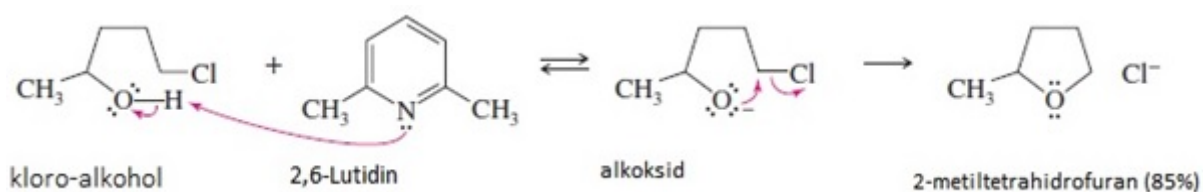
**Slika 2.3.**

Halohidriini se lagano dobivaju reakcijom alkena u vodenim otopinama halogena. Bromna voda i klorna voda pospješuju adiciju na dvostruku vezu sa Markovnikovljevom orijentacijom. Slijedeća reakcija prikazuje dobivanje klorohidrina reakcijom ciklopentana i klorne vode. Reakcija klorohidrina i otopine natrijevog hidroksida daje epoksid.



**Slika 2.4.**

Ova reakcija može se koristiti i za sintezu etera s većim prstenovima. Problem leži u spriječavanju baze (dodane za deprotonaciju alkohola) od napada i zamjeni halida. 2,6-Lutidin je glomazna baza koja nemože lagano napasti ugljikov atom, ali može deprotonirati hidroksilnu skupinu i tako stvoriti petočlani ciklički eter. Pet, šest i sedmočlani ciklički eteri se tako dobivaju. [7]



**Slika 2.5.**

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Aparatura

##### 3.1.1. Spektrofotometar

Spektrofotometar je mjerni uređaj kojim se mjeri količina svjetla koju apsorbira uzorak. Apsorpcija svjetlosti kroz otopine matematički se opisuje Beer-Lambertovim zakonom (jedin. 3.1.) pri čemu  $ABS$  predstavlja apsorbanciju na određenoj valnoj duljini svjetlosti,  $\varepsilon$  molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent [ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ], svojstven svakoj molekulskoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti,  $b$  duljinu puta svjetlosti kroz uzorak [cm], a  $c$  koncentraciju tvari u otopini [ $\text{mol dm}^{-3}$ ].

$$ABS = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (3.1.)$$

Za mjerenje aktivnosti enzima i koncentracije proteina u provedenim eksperimentima korišten je uređaj *Shimadzu UV-1800* (Slika 3.1.).



*Slika 3.1. Spektrofotometar Shimadzu UV-1800*

##### 3.1.2. Plinski kromatograf

Plinska kromatografija (engl. *Gas chromatography*, GC) je analitička metoda koja se zasniva na različitoj raspodjeli komponenti uzorka između dvije faze od kojih je jedna stacionarna (nepokretna), a druga mobilna (pokretna). Stacionarna faza može biti čvrsta ili tekuća, a mobilna je plinovita.

Komponente se pod utjecajem mobilne faze kreću kroz stacionarnu fazu različitom brzinom i tako se razdvajaju. Dobiveni kromatogrami kvalitativno i kvantitativno određuju sastav

plinovitog ili tekućeg uzorka. Kvalitativna analiza se provodi prema vremenu zadržavanja komponenti, dok kvantitativna analiza uzorka podrazumijeva integriranje pikova odgovarajućih komponenti. Osnovne komponente korištenog GC sustava (Slika 3.2.) su Parker 9150 generator vodika, plinski kromatograf koji se sastoji od peći za grijanje kolone, injektora, regulatora tlaka plina nosača i zraka te plameno ionizacijskog detektora (engl. *Flame ionization detector*, FID). Cijelim sustavom upravlja softver *GC Solution*. ([www.fkit.unizg.hr/images/50010643/KATALOG\\_FKIT.pdf](http://www.fkit.unizg.hr/images/50010643/KATALOG_FKIT.pdf)). Navedeni uređaj korišten je za određivanje koncentracije acetaldehida, kloroacetaldehida i laktona te za mjerenje kinetike enzima.



**Slika 3.2. Plinski kromatograf Shimadzu GC – 2014 i Parker 9150 generator vodika**

### **3.1.3. Centrifuga**

Centrifuga je korištena za odvajanje enzima od ostatka reakcijske otopine. Uzorci su centrifugirani na 14.000 okr/min u trajanju od 5 min pri 4°C. Korišten je uređaj *Hettich Universal 320R* (Slika 3.3.).



**Slika 3.3. Centrifuga Hettich Universal 320R**

### **3.1.4. Kotlasti bioreaktor**

Eksperimenti su provedeni u staklenim kotlastim reaktorima volumena  $V = 10$  mL (Slika 3.4.). Pri mjerenju kinetike miješanje je provođeno pomoću magnetske miješalice.





*Slika 3.4. Kotlasti bioreaktor*

### **3.1.5. Analitička vaga**

Uzorci potrebni u svrhu provedbe eksperimentalnog postupka vagani su na analitičkoj vazi marke *Shimadzu* s preciznošću na četiri decimale (Slika 3.5.).



*Slika 3.5. Analitička vaga*

### **3.1.6. Homogenizator**

Uzorci su homogenizirani na homogenizatoru *MS2 Minishaker IKA* (Slika 3.6.).



*Slika 3.6. Homogenizator*

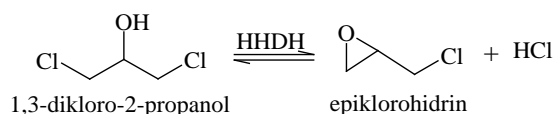
## 3.2. Analitičke metode

### 3.2.1. Određivanje koncentracije klora

Klor je određivan spektrofotometrijski miješanjem otopine nepoznate koncentracije s otopinom halogenog reagensa. Halogeni reagens je smjesa dviju otopina koje se miješaju u omjeru 1:1. Prva otopina je zasićena otopina živina tiocijanata u etanolu (abs.), dok je druga 0,25 M otopina amonij željezo (III) sulfata u 9M HNO<sub>3</sub>. Analiza je provedena na slijedeći način: 200 μL otopine klora je pomiješano s 800 μL halogenog reagensa te je nakon inkubacije od 5 minuta mjerena apsorbancija na λ = 460 nm. Na ovaj način mogu se mjeriti koncentracije klora u otopini do 2,5 mM.

### 3.2.2. Određivanje aktivnosti enzima halohidrin dehidrogenaze

Aktivnost enzima halohidrin dehalogenaze je mjerena u reakciji dehalogenacije 1,3 diklor-2-propanola (1,3-DKP) prema shemi prikazanoj na slici 3.8.



**Slika 3.8.** Shema reakcije dehalogenacije 1,3 diklor-2-propanola (1,3-DKP)

Aktivnost je mjerena u reaktoru volumena 1,5 mL u 0,1 M fosfatnom puferu pH 8. Koncentracija 1,3-dikloropropanola (1,3-DKP) je bila 10 mM, a koncentracija enzima HHDH je iznosila 0,5 mg/mL. Dodatkom enzima u reaktor započeta je reakcija. Iz reaktora je tijekom prvih 10 minuta reakcije u pravilnim vremenskim razmacima uzimano po 250 μL uzorka koji je profiltriran. Potom je u uzorcima određivana koncentracija klora prema prethodno opisanom testu. Iz porasta koncentracije klora u vremenu je mjerena aktivnost enzima izračunata prema slijedećoj jednadžbi.

$$A_s = \frac{\Delta c_{\text{Cl}}}{c_{\text{HHDH}} \Delta t} \quad (3.2.)$$

U uzorcima iz reaktora je prije mjerenja aktivnosti izdvajan enzim od ostatka reakcijske smjese. Naime tijekom reakcije dehalogenacije nastaje klor te njegova prisutnost u uzorku

enzima bi mogla ometati točno određivanje aktivnosti, te tako utjecati na aktivnost enzima. Kako bi se eliminirao utjecaj klora enzim je odvajan od reakcijske smjese korištenjem „eppendorfice“ s filtrom (Slika 3.9.) (engl. *Ultra centrifugal filter device*).



**Slika 3.9.** „Eppendorfica“ s filtrom

### 3.2.3. Određivanje koncentracije $\alpha$ -kloralkohola i epoksida

Koncentracije  $\alpha$ -kloralkohola i epoksida određivane su plinskom kromatografijom s plameno-ionizacijskim detektorom, korištenjem helija kao plina nosioca, na polarnoj koloni ZB-WAX ( $l = 30$  m;  $ID = 0,53$  mm;  $df = 1$   $\mu$ m). Analiza je napravljena otapanjem navedenih komponenata u acetonitrilu, a uvjeti na plinskom kromatografu su bili sljedeći:

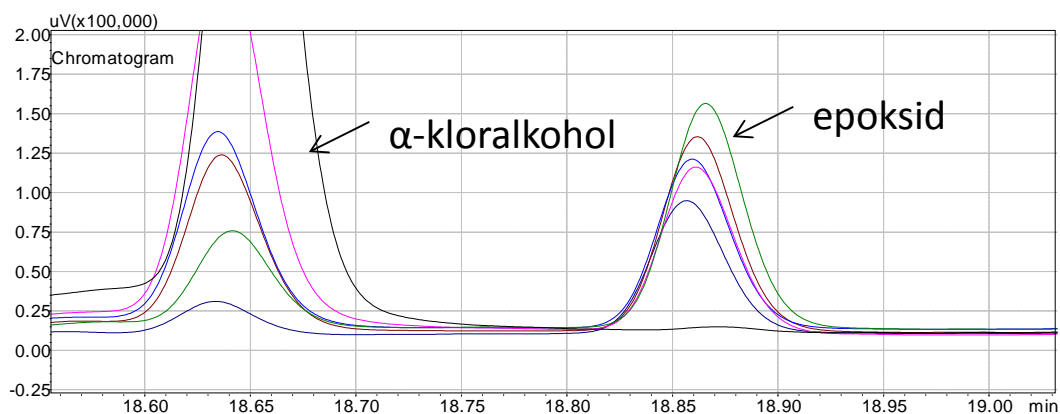
- injektor:  $T = 240^{\circ}\text{C}$
- linearna brzina = 20 cm/s
- kolona:  $T_0 = 50^{\circ}\text{C}$  (5 min)

$dT/dt = 10^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 130^{\circ}\text{C}$  (2 min)

$dT/dt = 20^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 240^{\circ}\text{C}$  (4 min)

- detektor:  $T = 240^{\circ}\text{C}$

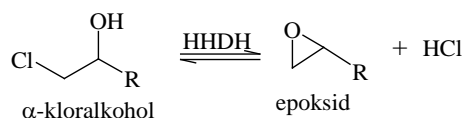
Uzorci iz reaktora su prije mjerenja razrijeđeni u acetonitrilu te profiltrirani kroz filter (*Sartorius*, veličina 5H/N) radi odvajanja biokatalizatora. Vrijeme zadržavanja  $\alpha$ -kloralkohola je bilo 18,6 min, a epoksida 18.9 min (slika 3.10.)



**Slika 3.10.** GC-FID kromatogram za  $\alpha$ -kloralkohol i epoksid

### 3.2.4. Određivanje kinetike enzima halohidrindehalogenaze

Kinetika enzima halohidrin dehalogenaze određivana je u reakciji dehalogenacije  $\alpha$ -kloralkohola (slika 3.11.).



**Slika 3.11.** Reakcija dehalogenacije  $\alpha$ -kloralkohola

Kinetika je mjerena metodom početnih brzina. Mjerenja su provođena u 0,1 M fosfatnom puferu pH 8 u reaktorima volumena 1,5 mL. U svim mjerenjima koncentracija enzima HHDH je bila konstantna i iznosila je 0,5 mg/mL. Koncentracija  $\alpha$ -kloroalkohola je varirala u rasponu od 0-100 mM. Reakcijska brzina je mjerena praćenjem porasta koncentracije klora, te je računata prema jednadžbi (jednadžba 4.1.)

Primjer određivanja reakcijske brzine za jednu koncentraciju  $\alpha$ -kloralkohola je dan u prilogu.

### 3.2.5. Provedba reakcije dehalogenacije $\alpha$ -kloralkohola u reaktoru

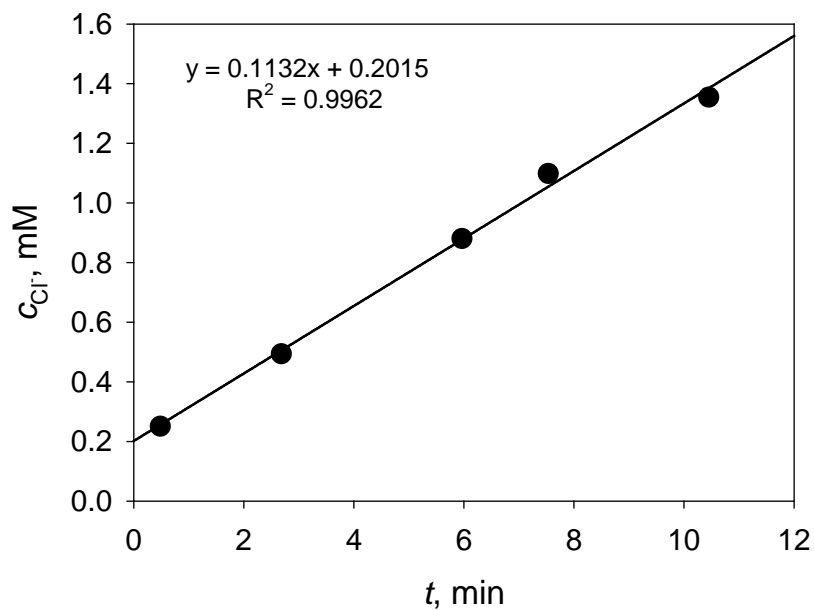
Reakcija dehalogenacije  $\alpha$ -kloroalkohola katalizirana HHDH pri čemu se sintetizira epoksidje provedena u reaktoru volumena 10 mL u 0,1 M fosfatnom puferu pH 8. Koncentracija enzima je bila 10 mg/mL, a  $\alpha$ -kloroalkohola 57 mM. Tijekom reakcije uzimani su uzorci u kojima je određivana koncentracija  $\alpha$ -kloroalkohola i epoksida na GC-FID-u, klora na spektrofotometru, te aktivnost enzima na spektrofotometru.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

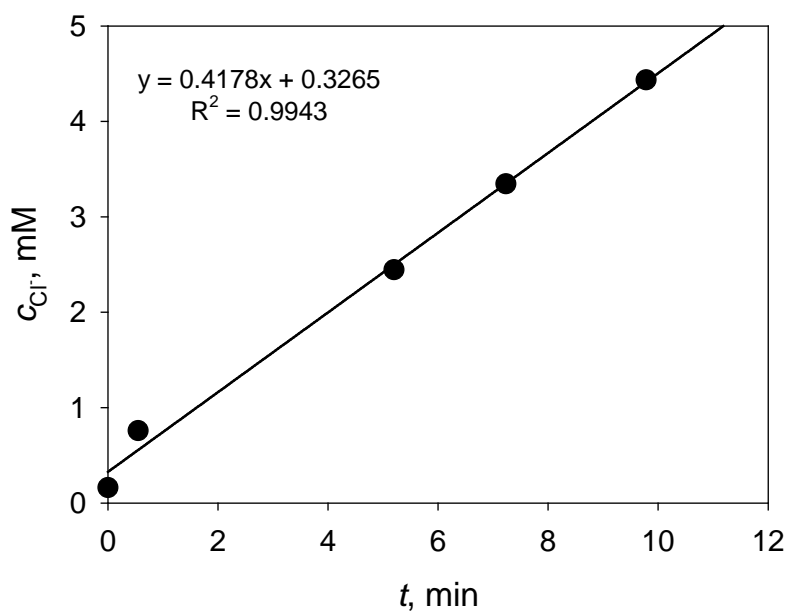
### 4.1. Optimiranje metode određivanja aktivnosti enzima halogenhidrin dehalogenaze

Obzirom da u literaturi nije bilo moguće pronaći metodu za mjerenja aktivnosti enzima HDDH u okviru ovog rada je optimirana metoda mjerenja aktivnosti korištenjem 1,3 diklor-2-propanola kao supstrata. U tu svrhu je provedeno ispitivanje aktivnosti u dva pufera (0,1 M fosfatnom puferu pH 8 i 0,1 M Tris-SO<sub>4</sub> pufer pH 8), te uz dvije različite početne koncentracije supstrata (10 mM i 100 mM). Rezultati su prikazani na slikama 4.1., 4.2., 4.3., 4.4. . Aktivnost je mjerena na način da je u reaktoru praćen porast koncentracije klorovih iona tijekom prvih deset minuta reakcije.

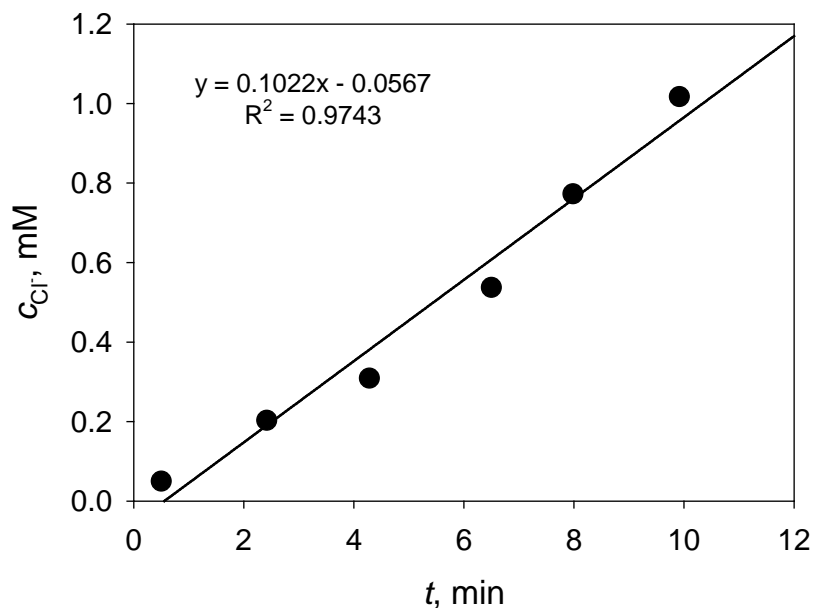
Iz rezultata je vidljivo da je aktivnost enzima veća pri višoj početnoj koncentraciji 1,3 diklor-2-propanola u oba pufera. Navedeno je u skladu s Michelis-Menteničinom kinetikom enzima kada brzina reakcije pri nižim koncentracijama supstrata raste porastom njegove koncentracije. Obzirom da je prilikom mjerenja aktivnosti mjerena koncentracija klorovih iona, a baždarni pravac je do 2,5 mM bio linearan, pri višim koncentracijama supstrata uzorak je morao biti razrjeđivan prije mjerenja njegove apsorbancije. Navedeno utječe na točnost i brzinu mjerenja. Stoga je zaključeno da je aktivnost bolje mjeriti pri nižim koncentracijama supstrata. U fosfatnom puferu je uočena veća aktivnost pri 10 mM koncentraciji supstrata, a isto tako  $R^2$  je bio viši u navedenom puferu. Stoga je kao optimalni pufer za mjerenje aktivnosti HDDH odabran 0,1 M fosfatni pufer pH 8, a kao optimalna 10 mM koncentracija supstrata.



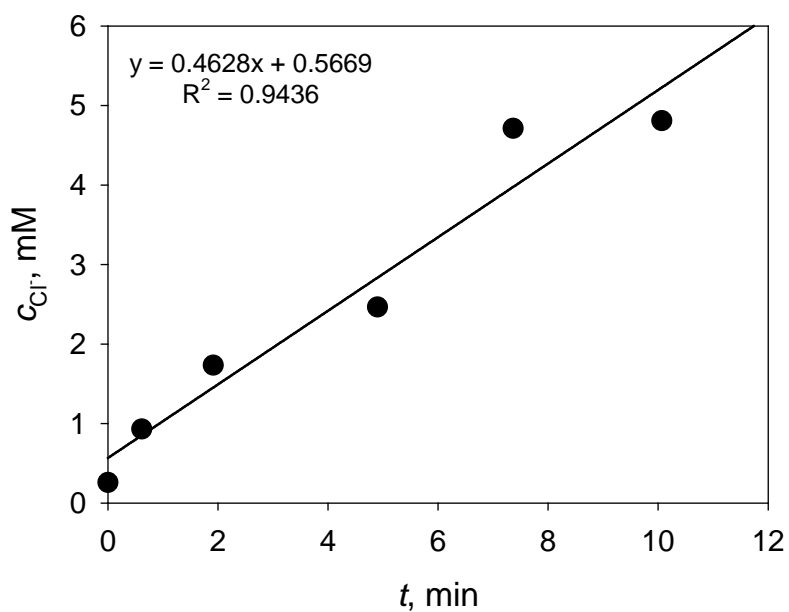
**Slika 4.1.** Testiranje aktivnosti HDDH u 0,1 M fosfatnom puferu pH 8 u reakciji dehalogenacije 1,3 diklor-2-propanola pri koncentraciji supstrata od 10 mM



**Slika 4.2.** Testiranje aktivnosti HDDH u 0,1 M fosfatnom puferu pH 8 u reakciji dehalogenacije 1,3 diklor-2-propanola pri koncentraciji supstrata od 100 mM



**Slika 4.3.** Testiranje aktivnosti HDDH u 0,1 M Tris- $\text{SO}_4$  pufer pH 8u reakciji dehalogenacije 1,3 diklor-2-propanola pri koncentraciji supstrata od 10 mM



**Slika 4.4.** Testiranje aktivnosti HDDH u 0,1 M Tris- $\text{SO}_4$  pufer pH 8u reakciji dehalogenacije 1,3 diklor-2-propanola pri koncentraciji supstrata od 100 mM

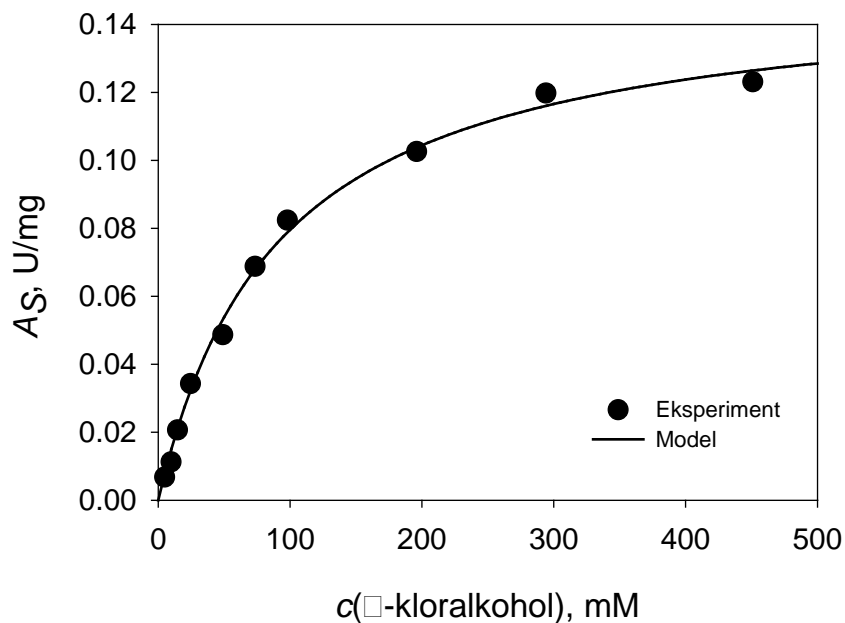
## 4.2. Određivanje kinetike enzima halohidrin dehalogenaze u kotlastom reaktoru

Kinetika reakcije dehalogenacije  $\alpha$ -kloralkohol je mjerena metodom početnih brzina uz različite početne koncentracije supstrata.

Rezultati su prikazani na slici 4.5. Kinetika je opisana Michelis Meneteničino kinetikom jednadžba 4.1.

$$r = \frac{V_m \cdot c_{\text{HHDH}} \cdot c_{\alpha\text{-kloralkohola}}}{K_m + c_{\alpha\text{-kloralkohola}}} \quad (4.1.)$$

Parametri su procijenjeni nelinearnom regresijom u programskom paketu Scientist, te su dani u tablici 4.1.



**Slika 4.5.** Kinetika enzima HHDH u reakciji dehalogenacije  $\alpha$ -kloralkohola (0,1 M fosfatni pufer pH 8,  $c_{\text{HHDH}} = 0,5 \text{ mg/mL}$ )

**Tablica 4.1. Parametri i vrijednosti**

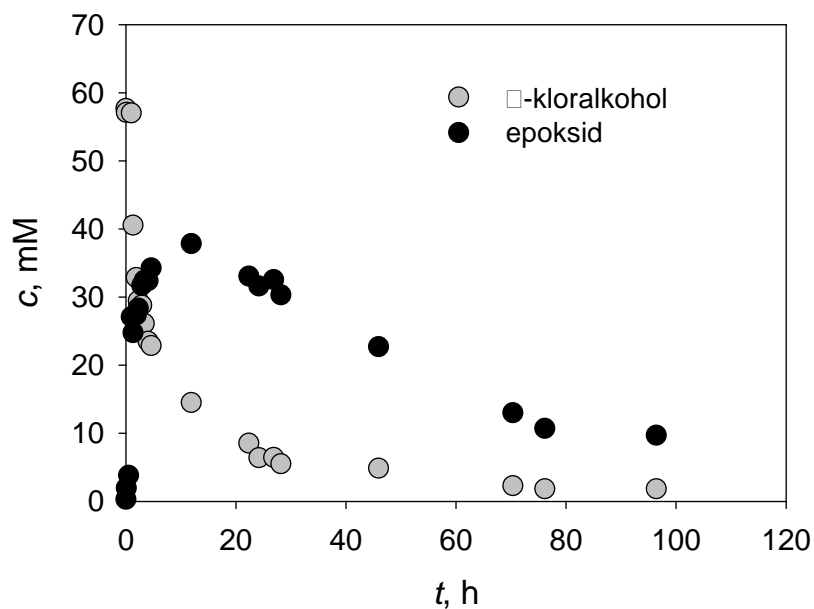
Parametar	Vrijednost
$V_m$ , U/mg	$0,152 \pm 0,004$
$K_m$ , mM	$90,926 \pm 7,022$



Iz dobivenih parametara, tj iz velike vrijednosti Michaeli-Menteničine konstante se može zaključiti da enzim nije izrazito specifičan za korišteni supstrat, te da ima i relativno nisku aktivnost.

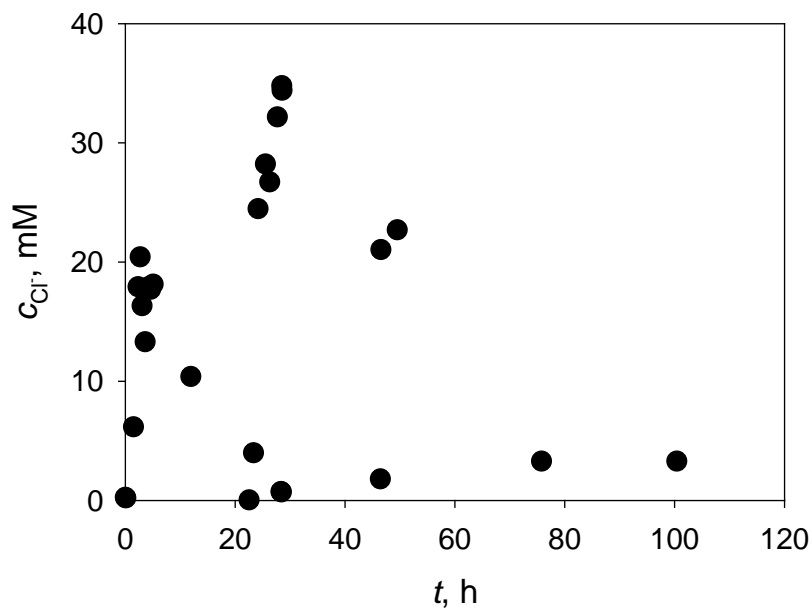
### 4.3. Provedba reakcije dehalogenacije u kotlastom reaktoru

Kako je prikazano na slici 4.6. koncentracija epoksida u početku reakcije raste, a nakon 12-tog sata počinje opadati. Predpostavlja se da je uzrok tome raspad epoksida, koji je očito nestabilan u otopini. (slika 4.6.)



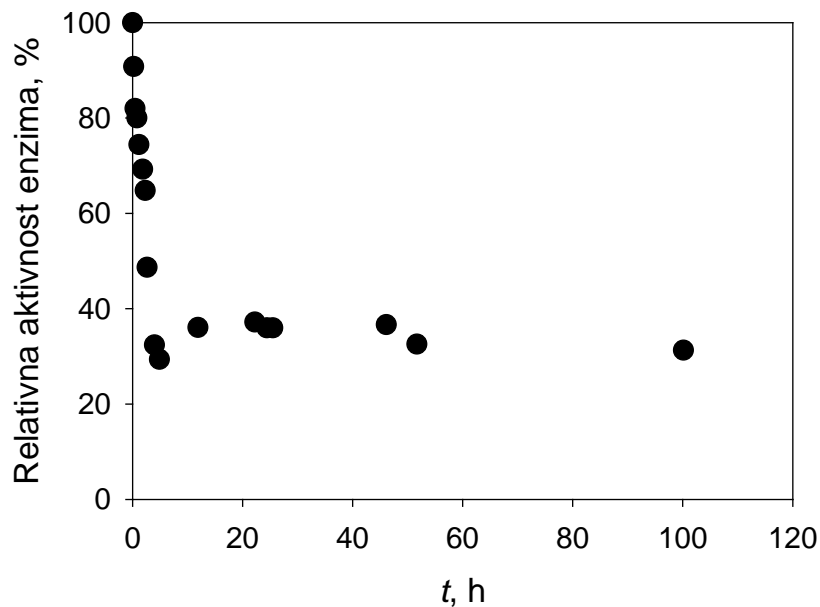
**Slika 4.6.** Vremenska promjena koncentracije  $\alpha$ -kloralkohola i epoksida tijekom provedbe reakcije dehalogenacije u kotlastom reaktoru ( $V_{\text{reaktora}} = 10 \text{ mL}$ ,  $c_{\text{HHDH}} = 10 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\alpha\text{-kloralkohola}0} = 57 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 8)

Rezultati koncentracije klora su dosta raspršeni. Predpostavlja se da je došlo do stvaranja  $Cl_2$ . (slika 4.7.), koji je ispario iz reaktora.



**Slika 4.7.** Vremenska promjena koncentracije klora tijekom provedbe reakcije dehalogenacije u kotlastom reaktoru ( $V_{\text{reaktora}} = 10 \text{ mL}$ ,  $c_{\text{HHDH}} = 10 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\alpha\text{-kloralkohola0}} = 57 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 8)

Aktivnost enzima opada do 4 sata reakcije, a nakon toga se njene vrijednosti ustaljuju, tj. aktivnost postaje konstantna. (slika 4.8.)



**Slika 4.8.** Vremenska promjena relativne aktivnosti enzima HHDH tijekom provedbe reakcije dehalogenacije u kotlastom reaktoru ( $V_{\text{reaktora}} = 10 \text{ mL}$ ,  $c_{\text{HHDH}} = 10 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\alpha\text{-kloralkohola0}} = 57 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 8)

## 5. ZAKLJUČAK

Rezultati su pokazali da enzim halohidrindehalogenaza nije specifičan na  $\alpha$ -kloroalkohol. Kao optimalni pufer za mjerenje aktivnosti odabran je 0.1 M fosfatni pufer pH 8, a kao optimalna 10 mM koncentracija supstrata. Eksperimenti u reaktoru su pokazali da koncentracija epoksida koji je reakcijski produkt opada tijekom provedbe reakcije. Aktivnost enzima također opada, a nakon 4 sata ostaje stalna. To upućuje na zaključak da je reakcijski produkt-epoksid nestabilna reakcijska komponenta.

## 6. SIMBOLI

$C_{HHDH}$	masena koncentracija	[mg / mL]
$K_m$	Michaelis – Menteničina konstanta	[mmol / dm <sup>3</sup> ]
$V_m$	maksimalna brzina reakcije	[U/cm <sup>3</sup> , ili U/mg]
$t$	vrijeme	[min, ili s]
$A_s$	specifična aktivnost enzima	[U / mg]
$c$	molarna koncentracija	[mM]

## 7. LITERATURA

- [1] Wolfgang Aehle (2007); Enzymes in Industry Production and Applications, Wiley-VCH, 1-3, 13-15
- [2] Dordick J.S., Clark D.S. (2002); Biocatalysis and biotransformation, Current Opinion in Chemical Biology, 6:123–124
- [3] Illanes A. (2008); Enzyme Biocatalysis, Principles and applications, izdavač, Springer, 1-3, 16-19
- [4] Nelson, D.L., Cox, M.L. Lehninger (2008), Principles of Biochemistry, University of Wisconsin–Madison, 4<sup>th</sup> Edition, 184-185
- [5] Loughlin, W.A. (2000), Biotransformations in organic synthesis, Bioresource Technology, 74 49.
- [6] M Schallmey, RJ Floor, W Szymanski, and DB Janssen (2012), Hydrolysis and Reverse Hydrolysis: Halohydrin Dehalogenases, University of Groningen, Groningen, 143
- [7] Leroy G. Wade, Organic Chemistry, Prentice Hall (2012), 625-655

## **8. ŽIVOTOPIS**

Rođen sam 1. lipnja 1994. godine u Varaždinu, gdje sam završio 2. osnovnu školu. Maturirao sam 2013. godine u Drugoj gimnaziji Varaždin i iste godine sam upisao studij ekoiženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.