

Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Laura Glavinić

**Ispitivanje smanjenja utjecaja inhibicije enzima supstratom
upotrebom micelarnog medija**

Zagreb, 2025.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu Sveučilišta u Zagrebu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije te u Laboratoriju za stereoselektivnu sintezu i biokatalizu na Institutu Ruđer Bošković pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Martine Sudar uz neposrednu pomoć Petre Švaco, mag. ing. bioproc., i dr. sc. Maje Majerić Elenkov te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2024./2025.

Popis i objašnjenje kratica korištenih u radu

(R)-2	1-azido-2-metil-3-fenilpropan-2-ol, produkt
K_i	Konstanta inhibicije supstratom, mM
K_{ip}	Konstanta inhibicije produktom, mM
K_{m1}	Michaelisova konstanta za <i>rac</i> -1, mM
K_{m2}	Michaelisova konstanta za (R)-2, mM
V_m	Maksimalna brzina reakcije, U/mg
V_r	Volumen reaktora, μ L
c_1	Množinska koncentracija <i>rac</i> -1, mM
c_2	Množinska koncentracija (R)-2, mM
c_p	Množinska koncentracija produkta, mM
k_d	Konstanta deaktivacije, 1/d
BPB	Bromfenolplavo (engl. bromphenol blue)
BSA	Albumin goveđeg seruma
E faktor	Ukupna masa otpada koji stvara proces
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina
HHDH	Halogenhidrin-dehalogenaza
LB hranjiva podloga	Luria-Bertani hranjiva podloga
MiliQ voda	Ultračista voda
MTBE	Metil <i>tert</i> -butil eter
OD600	Optička gustoća pri 600 nm, engl. <i>optical density at 600 nanometers</i>
PNSHH	<i>para</i> -nitro-2-brom-1-feniletanol
R. T.	Retencijsko vrijeme, min
<i>rac</i> -1	2-benzil-2-metiloksiran, supstrat
<i>S. A.</i>	Specifična aktivnost enzima, U/mg

SDS	Natrijev dodecil sulfat
TEMED	Tetrametiletilendiamin
TEMG	Tris-EDTA- β -merkaptotanol-glicerol
$V. A.$	Volumna aktivnost enzima, U/mL
c	Množinska koncentracija supstrata, mM
ee	Enantiomerni višak (engl. <i>enantiomeric excess</i>)
r	Brzina reakcije, U/mg

Sadržaj

1	Uvod.....	1
2	Teorijske osnove	3
2.1	Biokataliza i okoliš	4
2.1.1	Biokatalizatori	5
2.2	Enzimi u ulozi biokatalizatora	6
2.3	Halogenhidrin-dehalogenaze	7
2.3.1	Primjena halogenhidrin-dehalogenaza	9
2.3.2	Enzimi grupe B	10
2.4	Micelarna biokataliza	11
2.4.1	Prednosti micelarnih reakcijskih medija	12
2.5	Enzimski kinetika	13
3	Hipoteza i ciljevi rada	15
4	Eksperimentalni dio	16
4.1	Uzgoj bakterijskih stanica i izolacija željenog enzima	18
4.1.1	Priprema hranjivih podloga, otopina i pufera.....	18
4.1.2	Izolacija pojedinačnih bakterijskih kultura	19
4.1.3	Priprema malih prekonoćnih kultura.....	20
4.1.4	Prekomjerna ekspresija HHDH proteina	20
4.1.5	Izolacija proteina	21
4.2	Karakterizacija dobivenih enzima	22
4.2.1	Elektroforeza	22
4.2.2	Određivanje koncentracije enzima testom po Bradfordu	24
4.3	Reakcija u kotlastom reaktoru	25
4.4	Kinetička mjerenja.....	27
4.4.1	Ispitivanje utjecaja koncentracije supstrata na aktivnost enzima	27
4.4.2	Ispitivanje utjecaja koncentracije nukleofila na aktivnost enzima	29
4.4.3	Ispitivanje utjecaja koncentracije produkta na aktivnost enzima	29
4.5	Usporedba operacijske stabilnosti enzima u puferu i micelarnom mediju	30

4.5.1	Tris-SO ₄	30
4.5.2	TPGS-750-M.....	30
4.5.3	Spektrofotometrijski test	31
4.6	Preliminarni test ponovne upotrebe micelnog medija	31
4.7	Procjena parametara	32
5	Rezultati i rasprava	34
5.1	Elektroforeza	34
5.2	Bradfordov test	35
5.3	Provedba reakcije u puferu i micelarnom mediju.....	35
5.4	Kinetika reakcije azidolize u puferu.....	36
5.5	Kinetika reakcije azidolize u micelarnom mediju	39
5.6	Usporedba operacijske stabilnosti enzima u puferu i micelarnom mediju	40
5.7	Preliminarni test ponovne upotrebe micelnog medija	41
6	Zaključak.....	43
7	Literatura.....	44
8	Sažetak	52
9	Summary	53
10	Prilozi.....	54

1 Uvod

Enzimi kao biokatalizatori sa širokom primjenom u industriji odavno nisu apstraktan pojam, a spektar mogućnosti njihove implementacije svakim danom raste. Najveće prednosti enzimima donijela je upravo evolucija koja ih je učinila najstabilnijima u fiziološkim uvjetima, uvjetima koji su za industrijske pojmove vrlo blagi i čije postizanje ne troši veliku količinu resursa i energenata. Nije tajna da je količina mnogih resursa bez kojih industriju i energetiku danas ne možemo zamisliti ograničena, a uz to su vrlo često štetni za okoliš. Svijet je primoran orijentirati se prema održivijim metodama i materijalima, a biorazgradivost enzima zajedno s njihovim evolucijskim prednostima donijela im je titulu „katalizatora budućnosti“ (Pollard i Woodley, 2007).

Enzime je bilo potrebno modificirati kako bi se njihove evolucijske prednosti mogle iskoristiti na industrijskoj skali. Napredak tehnološkog i informatičkog sektora te različite inovacije na području biotehnologije, molekularne biologije, genetičkog i enzimsko-proteinskog inženjerstva otvorile su vrata današnjoj primjeni enzima i učvrstile njihovo mjesto u području katalize (Timson 2019; Hauer 2020; Wiltschi i sur., 2020; Yi i sur., 2021; Hanefeld i sur., 2022). Danas je gotovo 90 % komercijalno korištenih enzima modificirano, potreba za enzimima u industriji kontinuirano raste, a nezamjenjivi su u farmaceutskoj, prehrambenoj, tekstilnoj, kemijskoj i agro-industriji (Adrio i Demain, 2014; Prasad i Roy, 2018; May, 2019).

Svijet enzima sastoji se od milijardi različitih jedinki od kojih je tek nekolicina otkrivena, aktivno se proučava te primjenjuje. Među njih spadaju halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH), rijetki enzimi zavidnog sintetskog potencijala koji u prirodi imaju važnu ulogu detoksifikacije halogeniranih ksenobiotika (Janssen i sur., 2005; Schallmey i sur., 2014). Kataliziraju reakcije formiranja ugljik-ugljik, ugljik-klor, ugljik-dušik, ugljik-kisik i ugljik-brom veza te su zanimljivi zbog svoje mogućnosti kataliziranja reakcija otvaranja epoksidnih prstenova s različitim nukleofilima (Hasnaoui-Dijoux i sur., 2008; Schallmey i sur., 2014; Schallmey i sur., 2016). Zahvaljujući svemu navedenome, enzimi HHDH imaju veliki potencijal primjene u sintezi prekursora i građevnih blokova u farmaceutskoj, kemijskoj i agrokemijskoj industriji (Findrik Blažević i sur., 2021). Azidi kao nukleofili u reakcijama kataliziranim ovim enzimima daju optički čiste azido alkohole koji se mogu koristiti kao prekursori za važne molekule u organskoj kemiji, kao što su amino alkoholi, aziridini i triazoli (Campbell-Verduyn i sur., 2010; Findrik Blažević i sur., 2021).

Organska otapala su najčešće korišteni reakcijski mediji u organskoj sintezi, prvenstveno zahvaljujući njihovoj mogućnosti da otope različite spojeve, a pritom ostanu kemijski stabilni (Firestone i Gospe, 2009). Enzimi HHDH kataliziraju reakcije čiji su supstrati teško topljivi u vodenim medijima ili s njima reagiraju pa reakcije ne teku željenim putem, zbog čega se nameće primjena pogodnijih organskih otapala (Majerić Elenkov i sur., 2014). Ipak, takva otapala su vrlo često toksična i štetna za okoliš, a imaju loš utjecaj na stabilnost i aktivnost enzima te nerijetko dovode do njihove denaturacije (Gupta, 1992; Ogino i Ishikawa, 2001; Cortes-Clerget i sur., 2019). Preko 80 % otpada koji je nusprodukt sintetske organske kemije upravo je posljedica upotrebe organskih otapala (Lipshutz i sur.,

2016), a uz njihov negativan utjecaj na biokatalizatore potrebno je pronaći zelenija, sigurnija i istovremeno učinkovita otapala.

Micelarna biokataliza podrazumijeva upotrebu vodenih micelarnih reakcijskih medija za provedbu organskih sintetskih reakcija kataliziranih enzimima. Iskorištava svojstvo surfaktanta kao što je na primjer TPGS-750-M da formira agregate micela unutar micela koji se ponašaju kao nanoreaktori, što omogućava odvijanje organskih reakcija u vodi i predstavljaju održiviju obećavajuću alternativu organskim otapalima (Andersson i sur., 2018; Cortes-Clerget i sur., 2019).

Otapala su ključna u provođenju kemijskih reakcija i transformacija općenito te predstavljaju integralan dio svih organskih sinteza. Primjena načela zelene kemije gdje god je to moguće je izrazito važna, a kada uzmemo u obzir da priroda evolucijski provodi kemiju u vodi, sa u njoj topljivim i netopljivim tvarima, jasno je da je isto moguće postići i u laboratorijskim uvjetima (Lipshutz i sur., 2016). Eliminacija organskih otapala, osim smanjenja otpada za sobom povlači mnoge druge prednosti. Upotreba micela kao reakcijskog medija u sintetskoj kemiji je relativno nova alternativna metoda organskim otapalima koja pruža mnogo mogućnosti, ali i postavlja mnogo pitanja te je i dalje predmet istraživanja. Iako je norma organske sinteze izbjegavati vodu kao medij, danas je vrlo izgledno da se razne reakcije formiranja kemijskih veza mogu postići mijenjanjem metodologije i sintetskih puteva uz iskorištavanje vode kao reakcijskog medija pri čemu upravo micelarna kataliza ima potencijal služiti kao inovativno „otapalo“ koje sve to omogućuje (Lipshutz i sur., 2011).

2 Teorijske osnove

Biokataliza podrazumijeva upotrebu prirodnih tvari, dobivenih iz bioloških izvora i stanica živih organizama za ubrzavanje i usmjeravanje kemijskih reakcija (Illanes i sur., 2013). U svom djelovanju isprepliće biologiju i kemiju iskorištavajući nevjerojatnu katalitičku moć glavnih katalizatora prirode – enzima. Enzimi su molekule proteina koje učinkovito ubrzavaju milijarde različitih kemijskih i biokemijskih reakcija u stanicama živih organizama te im omogućuju funkcioniranje brzinom potrebnom za održavanje života (Basso i Serban, 2019). Predstavnicima su biokatalize i njeni najveći aduti, a njihova superiorna kemo-, regio- i stereoselektivnost stavlja ih na visoko mjesto u katalitičkim procesima budućnosti, ne samo zbog doze održivosti koju unose, već i zbog činjenice da omogućuju nove sintetske puteve koji se ne mogu provesti upotrebom tradicionalnih kemijskih katalizatora jednostavno ne može dovesti (Winkler i sur., 2021; Wu i sur., 2021; Hanefeld i sur., 2022). S obzirom na to da gotovo svi industrijski procesi koriste katalizatore u nekom koraku provedbe, upravo biokataliza može omogućiti ostvarenje održivijih pristupa u izvedbi industrijskih procesa koji bi maksimalno iskorištavali resurse, a stvarali minimalan otpad (Alcantara i sur., 2022).

Upotreba reakcija kataliziranih enzimima datira stoljećima unazad kada su se koristili u proizvodnji hrane i alkoholnih napitaka (Buchholz i Bornscheuer, 2017), a danas seže od industrijske primjene do izrazito kompleksnih laboratorijskih sinteza. Industrijski procesi najčešće zahtijevaju oštrije uvjete od onih u kojima su enzimi stabilni pa je *in vitro* primjena enzima zbog njihove prirode i tendencije da izgube ili promjene željena svojstva van uvjeta u kojima su evoluirali do nedavno predstavljala glavnu prepreku njihovoj široj industrijskoj upotrebi (Erdem i Woodley, 2022). Kako bi biokataliza ostvarila svoj potencijal i privukla širok interes znanstvene zajednice i same industrije, enzimi su morali postati lako dostupni i stabilniji u traženim uvjetima. Napreci u sekvencioniranju DNA i enzimsko-proteinskom inženjerstvu uklonili su potrebu prilagodbe postojećih procesa enzimima (Bornscheuer i sur., 2012; Littlechild, 2017). Zahvaljujući tim granama znanosti, enzimi se danas mogu prilagoditi ciljanim procesima pa njihova upotreba u industriji više nije ovisna o razvoju novih procesa i/ili modifikaciji postojećih.

Biokatalitički procesi već su dio brojnih industrija, od prehrambene i kemijske industrije do proizvodnje finih kemikalija i biogoriva (Fasim i sur., 2021). Rutinski se upotrebljavaju u procesima s mogućnošću uvećanja, od jednostavnih kemijskih manipulacija kao što su kiralna rezolucija (de Miranda i sur., 2015) i oksidacija alkohola (Akoh i sur., 2008), do složenih kemoenzimatskih kaskada koje omogućuju pristup molekulama visoke vrijednosti na industrijskoj skali (Huffman i sur., 2019). Daljnja implementacija biokatalize u tradicionalnu kemijsku katalizu ovisi o većoj dostupnosti dobro okarakteriziranih enzima i njihovom prožimanju u logiku same kemijske sinteze, a predviđa se da će biokataliza s vrlo visokom učinkovitošću omogućiti sintezu za sad nepoznatih, sve složenijih molekula (Pyser i sur., 2021).

Biokataliza je najvažnija u farmaceutskoj industriji gdje enzimi zahvaljujući svojoj besprimjernoj stereoselektivnosti imaju integralnu ulogu u sintezi homokiralnih molekula. Homokiralne molekule su

u proizvodnji lijekova neizmjereno važne jer otprilike 56 % aktivnih farmaceutskih sastojaka čine kiralne molekule, a stereoizomerija direktno utječe na biološka svojstva molekula pa je sukladno tome većina lijekova na tržištu homokiralnog oblika (Calcaterra i D'Acquarica, 2018; Jiang i Fang, 2020). Visoka selektivnost enzima uz blage reakcijske uvjete smanjuje ili u potpunosti eliminira mogućnosti izomerizacije, racemizacije i epimerizacije kiralnih intermedijera (Nestl i sur., 2011). Uz ubrzanje sinteze farmaceutika i ostale prednosti koje su biokatalizatori unijeli u repertoar sintetskih kemičara, valja naglasiti da imaju potencijal ubrzati samo otkriće novih lijekova (Dandapani i sur., 2012; Mennen i sur., 2019). Brzina otkrića novih spojeva i sintetskih puteva uvijek je izrazito važna, a posebno u farmaceutskom sektoru gdje razvoj lijeka koji uspije doći do faze kliničkih istraživanja u prosjeku traje 10-15 godina i košta 1-2 milijarde dolara, a unatoč tome 90 % ih ne bude odobreno za prodaju (Dowden i Muro, 2019; Hinkson i sur., 2020).

Tradicionalna kemijska kataliza usprkos izrazito visokom prinosu, ne postiže niti približnu selektivnost kao enzimi (Cao i sur., 2021). Mogućnosti koje pruža biokataliza rastu eksponencijalno razvojem novih tehnologija, računalnih metoda predviđanja strukture vrlo kompleksnih molekula proteina i novih sintetskih puteva, a danas je njena uloga dovoljno čvrsta da se više ne može smatrati nečim odvojivim od tradicionalnog pojma katalize već se treba promatrati kroz prizmu kemijske katalize općenito.

2.1 Biokataliza i okoliš

Dobrobit okoliša godinama je sveprisutna tema o kojoj se ne prestaje pričati kako među općom populacijom, tako i u znanstvenoj zajednici. Količina otpada i povećanje prosječne temperature površine Zemlje vrlo su zabrinjavajući faktori zbog kojih je započela zelena revolucija koja za cilj ima uvođenje kružne ekonomije i maksimalno iskorištenje održivih oblika energije. Glavni uzročnik štete koja je nanijeta planeti nakon prve industrijske revolucije je otpad – onaj opipljivi koji leži u prevelikom broju odlagališta, ali i onaj neopipljivi atmosferski otpad koji zagađuje atmosferu u obliku stakleničkih plinova. Rješenje za navedene probleme može se podijeliti u dva smjera: dekarbonizacija energije i defosilizacija kemikalija (Sheldon i Brady, 2022).

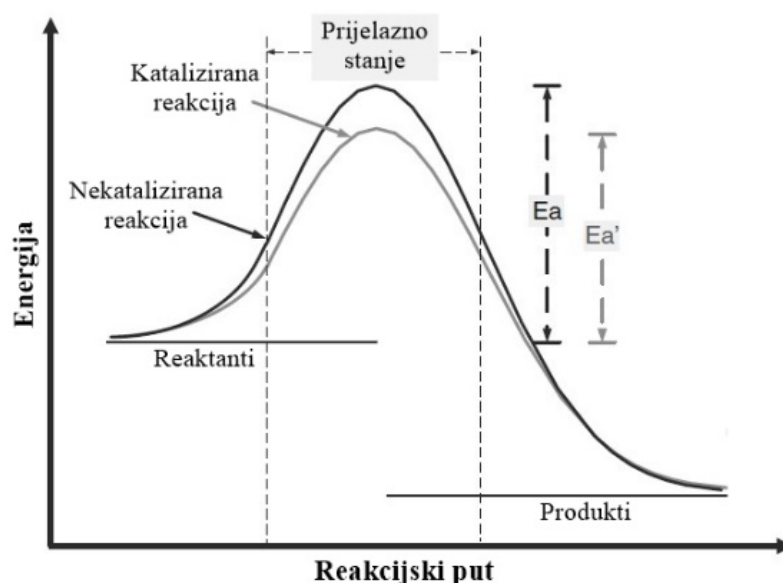
Iako nije najveći zagađivač, kemijska industrija uzročnik je nezanemarive količine otpada stoga su upravo kemičari ti čiji je zadatak pronaći rješenja za probleme vezane uz održivi razvoj i omogućiti zelenu tranziciju industrije. Anastas i Warner su iz tog razloga 1998. godine razvili koncept zelene kemije u kojem su iznijeli 12 načela čiji je cilj omogućiti razvoj održive i ekonomski prihvatljive kemije što će za direktnu posljedicu imati zelenu tranziciju same kemijske industrije (Sheldon i van Pelt, 2013). Zelena kemija podrazumijeva dizajniranje i razvoj procesa proizvodnje kemikalija visoke učinkovitosti, bez ili s minimalnom upotrebom štetnih kemikalija, koristeći obnovljiva sredstva, a s ciljem prevencije otpada i zagađenja. Biokataliza pronalazi svoje mjesto u gotovo svim načelima zelene kemije, a biokatalizatori zamjenjuju tradicionalne kemijske procese, čineći ih održivijima i ekološki prihvatljivijima (Sheldon i Woodley, 2018; Sheldon, 2018; Timson, 2019; Woodley, 2022). Održivost

biokatalitičkih procesa i biorazgradivost enzima predstavlja jednu od najvažnijih kvaliteta tog područja znanosti, a ujedno i razlog zbog kojeg će industrijski interes za isto kontinuirano rasti.

Biokatalitički procesi smatraju se zelenima i održivima (Sheldon i Woodley, 2018) iz nekoliko glavnih razloga (Sheldon i Brady, 2022): enzimi se dobivaju koristeći jeftine i održive resurse, biorazgradivi su, nisu toksični niti opasni na bilo koji način; biokatalitički procesi uglavnom se provode u blagim uvjetima; zahtijevaju manje reakcijskih koraka jer aktivacija funkcionalnih skupina nije potrebna (Wender i sur., 2008) čime proizvode manje otpada; te zahvaljujući svojoj visokoj selektivnosti skraćuju trajanje samih procesa.

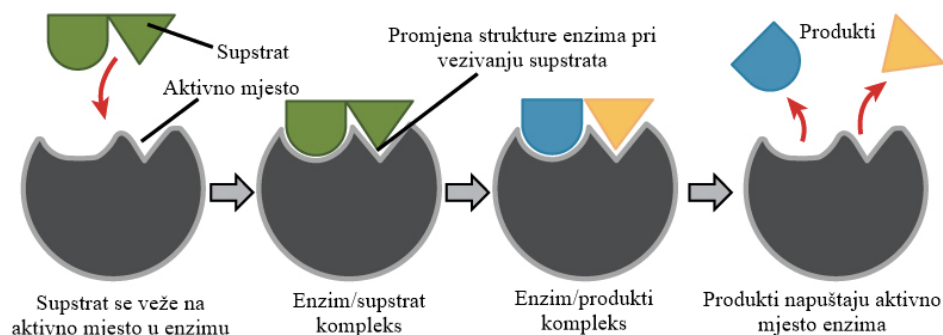
2.1.1 Biokatalizatori

Katalizatori su tvari, odnosno molekule, koje smanjuju energetska barijeru termodinamički mogućih reakcija i na taj ih način ubrzavaju. Aktivno sudjeluju u reakciji, ne ulaze u sastav produkata, a iz reakcije izlaze uglavnom nepromijenjeni i tijekom reakcije se gotovo uopće ne troše. Ne određuju završnu točku reakcije ili njeno ravnotežno stanje, a energetska barijeru smanjuju pretvarajući se u prijelazni aktivirani kompleks koji sudjeluje u nastanku produkata, prikazano na slici 1.



Slika 1: Djelovanje katalizatora. Usporedba energije aktivacije, E_a , katalizirane i nekatalizirane reakcije (Illanes, 2008)

Biokatalizatori su tvari prirodnog podrijetla, čije je katalitičko djelovanje jednako kao i kod tradicionalnih kemijskih katalizatora – oni smanjuju energetska barijeru potrebnu da se reakcija odvije i na taj je način ubrzavaju. Jednostavno gledano, supstrat se veže za aktivno mjesto na enzimu pri čemu nastaje enzim/supstrat kompleks, a enzim katalizira reakciju pretvorbe u produkte koji nakon reakcije napuštaju aktivno mjesto enzima. Mehanizam djelovanja enzima kao katalizatora prikazan je na slici 2.



Slika 2: Mehanizam djelovanja enzima kao katalizatora

(<https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cellular-energetics/enzyme-structure-and-catalysis/a/enzymes-and-the-active-site>)

Biokatalizatori mogu biti enzimi te mikroorganizmi ili cijele stanice. S obzirom na to da su upravo enzimi katalitički aktivna komponenta cijelih stanica, kada se same stanice koriste kao katalizatori supstrati moraju prijeći veći put pa su reakcije u pravilu sporije nego one katalizirane izoliranim enzimima (Carvalho, 2017).

2.2 Enzimi u ulozi biokatalizatora

Enzimi su makromolekule proteina vrlo kompleksne građe, sastavljeni od 100 do nekoliko stotina aminokiselina međusobno povezanih kovalentnim peptidnim vezama. Njihova trodimenzionalna struktura uvelike ovisi o njihovoj vrsti i organizmu iz kojeg potječu, a opisuje se na nekoliko razina složenosti: primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna (Lehninger 1970; Illanes, 2008). Kemijske reakcije odvijaju se interakcijom supstrata s funkcionalnim skupinama enzima odnosno aktivnim mjestima, koja su ključna za njihovo katalitičko djelovanje. Interakcija sa supstratima može dovesti do promjene u strukturi ili konformaciji enzima koje su važne za regulaciju njihove aktivnosti i selektivnosti.

Enzimi se kao katalizatori u različitim kemijskim procesima, kao što su proizvodnja akrilamida i deterdženata, koriste već desetljećima (Yamada i Kobayashi, 1996; Kirk i sur., 2002). Posljednjih godina postaju sve važniji u sintezi kompleksnih molekula, za što su vrlo učinkoviti jer u jednom reagensu spajaju prednosti koje pružaju usmjeravajuće skupine za kontrolu selektivnosti i prednosti koje pruža katalizator te se mogu koristiti s drugim enzimima u „one-pot“ reakcijama (Devine i sur., 2021).

Na industrijskoj razini, enzimi prednjače nad tradicionalnim kemijskim katalizatorima zbog sposobnosti kataliziranja reakcija s većom brzinom, specifičnošću, prinosom i kvalitetom dobivenog proizvoda te činjenicom da je s njima uglavnom sigurno rukovati (Victorino da Silva Amatto i sur., 2022). Osim toga, ekološki su prihvatljivi jer zahvaljujući reakcijskim uvjetima u procesima koji koriste enzime, smanjuju potrošnju energije, kemikalija i stvaranje toksičnih nusproizvoda (Arbige i sur.,

2019). Glavne prednosti i nedostaci enzima kao katalizatora, a ujedno prednosti i nedostaci same biokatalize, prikazane su u tablici 1.

Tablica 1: Prednosti i nedostaci enzima kao katalizatora

Prednosti	Nedostaci
Specifičnost – visoka specifičnost za supstrate minimalizira proizvodnju neželjenih nusprodukata	Identifikacija i modifikacija enzima potrebnog za neku konkretnu reakciju je dugotrajan i često skup proces
Blagi reakcijski uvjeti – smanjuju potrošnju energije	Problemi sa stabilnošću – u oštrijim industrijskim uvjetima podložni su denaturaciji i deaktivaciji
Sigurni za okoliš – smanjuju potrebu za upotrebom štetnih kemikalija i biorazgradivi su	Trošak proizvodnje – enzimi su često skupi što im može ograničiti ekonomsku isplativost
Superiorna selektivnost – dobivanje konačnog proizvoda brže, potrebno manje koraka separacije i/ili pročišćavanja	Inhibicija supstratima i produktima

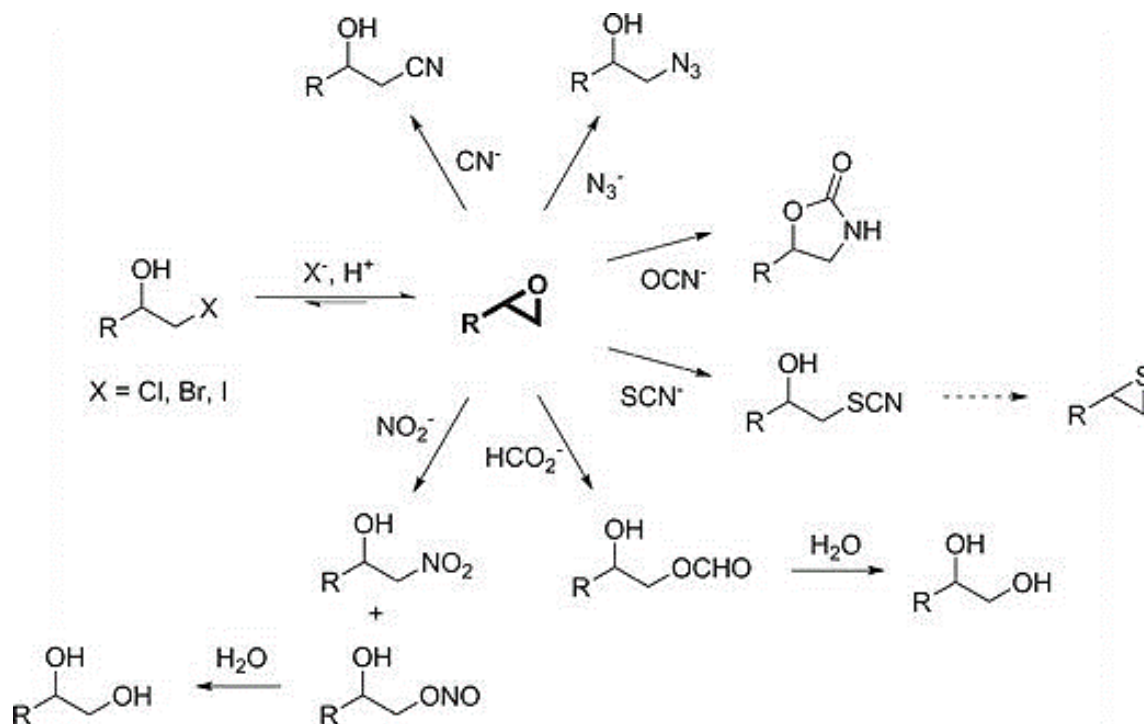
Za uspješnu implementaciju biokatalitičkih procesa na komercijalnoj skali, enzimi moraju postići: zadovoljavajuću termostabilnost, retenciju aktivnosti u oštrijim reakcijskim uvjetima i specifičnost prema širem spektru sintetičkih supstrata (Tang i Zhao, 2009; Jemli i sur., 2016). Prvi korak u prevladavanju ograničenja enzima divljeg-tipa je proteinsko inženjerstvo kojim se svojstva enzima mijenjaju i poboljšavaju pomoću tehnologije rekombinantne DNA uz promjenu aminokiselinskih sekvenci (Kapoor i sur., 2017). Slijede optimizacije i razvoji procesa koji koriste biokatalizatore te njihova integracija u postojeće sustave.

Svijet enzima je vrlo velik, s milijunima još neotkrivenih jedinki od kojih svaka katalizira sebi svojstvenu reakciju ili grupu reakcija te će daljnji tehnološki napreci i inovacije zasigurno otkriti nova blaga koja možemo iskoristiti i pomoću njih optimizirati postojeće industrijske procese.

2.3 Halogenhidrin-dehalogenaze

Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH) su enzimi koji pripadaju grupi liaza, poznati i pod nazivima haloalkohol-dehalogenaze, halohidrin-epoksidaze ili halohidrin hidrogen-halid liaze (Schamalley i sur, 2014). Kataliziraju reverzibilne reakcije dehalogeniranja β -haloalkohola što rezultira stvaranjem epoksida, a osim za dobivanje enantiomerno čistih haloalkohola i epoksida, važnu ulogu imaju u sintezama ugljik-ugljik, ugljik-dušik, ugljik-sumpor i ugljik-kisik veza (Lutje Spelberg i sur., 1999; Haak i sur., 2007). Enantiomerno čisti epoksidi i produkti koji nastaju njihovim otvaranjem česti su građevni blokovi za sintezu farmaceutika (Dokli i sur., 2021). Zahvaljujući svojoj svestranoj katalitičkoj prirodi koja im je omogućila da za otvaranje epoksidnih prstenova iskoriste velik broj neprirodnih supstrata, kao što su cijanid, azid, nitrit i tiocijanat, učinila ih je izrazito važnima za organsku sintezu,

zbog čega su i postali predmetom istraživanja (Hasnaoui-Dijoux i sur., 2008, Schallmeyer i sur., 2014). Katalitički opseg enzima HHDH u reakcijama dehalogeniranja i otvaranja epoksidnih prstenova prikazan je na slici 3.

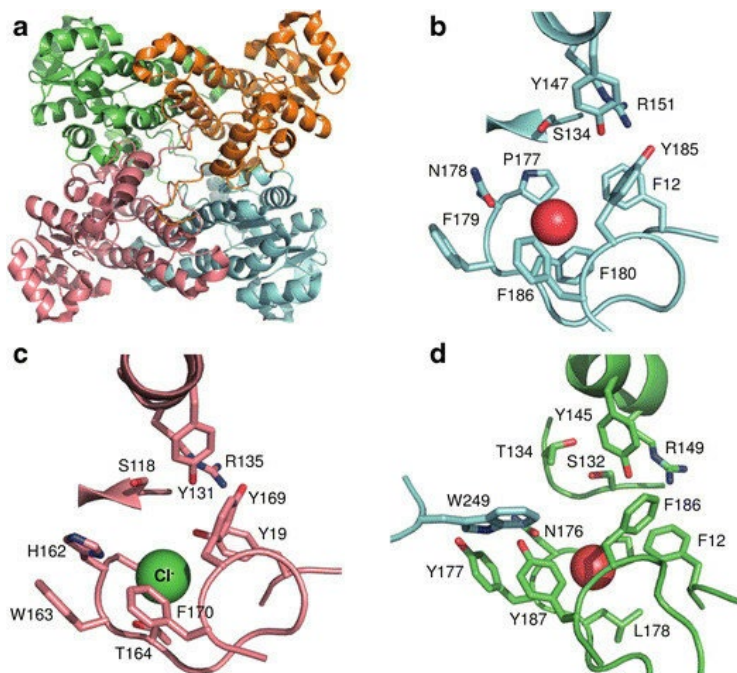


Slika 3: Katalitički opseg halogenhidrin-dehalogenaza u reakcijama dehalogeniranja i otvaranja epoksidnih prstenova (Hasnaoui-Dijoux i sur., 2008)

Enzimi HHDH u prirodi su rijetki, otkriveni u svega nekoliko vrsta bakterijskih organizama u kojima imaju vrlo važnu ulogu razgradnje ksenobiotika, kao što je epiklorhidrin (Janssen i sur., 2005). Vrlo su stabilni kada se izoliraju iz stanica, a danas su lako dostupni zahvaljujući naprecima u molekularnoj biologiji te se mogu relativno jednostavno izolirati iz rekombinantne *E. coli* metodom prekomjerne ekspresije proteina (Dvorak i sur., 2014; Findrik Blažević i sur., 2021).

Do početka 21. stoljeća bio je poznat mali broj enzima HHDH koji su na temelju sličnosti aminokiselinske sekvence bili podijeljeni u tri grupe: A, B i C (van Hylckama Vlieg i sur., 2001; Majerić Elenkov i sur., 2014). HheA i HheB enzimi preferiraju sličan raspon supstrata, pri čemu enzimi grupe A pokazuju visoku regioselektivnost i nisku enantioselektivnost (van den Wijngaard i sur., 1991), dok enzimi grupe B pokazuju nižu aktivnost i osrednju enantioselektivnost (Nakamura i sur., 1994; Findrik Blažević i sur., 2021). Najistraživaniji su enzimi HHDH grupe C koji pokazuju visoku aktivnost i enantioselektivnost prema aromatskim supstratima (Lutje Spelberg i de Vries, 2012). Usporedbom struktura HheA2, HheA, HheB i HheC uočeno je da svi enzimi imaju jednaku homotetramernu građu i slično aktivno mjesto (de Jong i sur., 2003; de Jong i sur., 2006; Watanabe i sur., 2015). Od 2014. godine do danas, klasifikacija HHDH proširila se za četiri nove grupe, D, F, E i G, u koje su enzimi grupirani prema međusobnim sličnostima u aminokiselinskim sekvencama i bioaktivnosti (Schallmeyer i

Schallmeyer, 2016; Koopmeiners i sur., 2016). Primjer strukture enzima HDDH i njihovih aktivnih mjesta prikazan je na slici 4.



Slika 4: Strukturni aspekti enzima HDDH, prikazani strukturom HheC (a). Aktivna mjesta HheA2 (b), HheB (c) i HheC (d) enzima (Schallmeyer i Schallmeyer, 2016)

2.3.1 Primjena halogenhidrin-dehalogenaza

Halogenhidrin-dehalogenaze u industriji koriste se za sintezu različitih spojeva koji svoju primjenu nalaze u farmaceutskoj, agrokemijskoj i kemijskoj industriji. Zahvaljujući njihovoj sposobnosti cijepanja i stvaranja različitih vrsta veza, s enzimima HDDH može se provoditi veliki broj reakcija sinteze različitih produkata. Najvažniji spojevi koji se sintetiziraju koristeći enzime HDDH kao katalizatore prikazani su u tablici 2.

Tablica 2: Industrijska primjena HDDH skupine enzima

Spoj	Primjena	Reference
Epiklorhidrin	Proizvodnja epoksi smole, sintetskih guma, surfaktanata, insekticida, raznih otapala i farmaceutika	Kasai i sur., 1998 Faber i Kroutil, 2005
(<i>R</i>)-4-cijano-3-hidroksibutanoat	Proizvodnja atorvastatina, lijeka za sniženje kolesterola	You i sur., 2014 Schallmeyer i Schallmeyer, 2016
(<i>S</i>)-glicidol	Proizvodnja (<i>S</i>)-cidofovira	Suzuki i Kasai, 2003

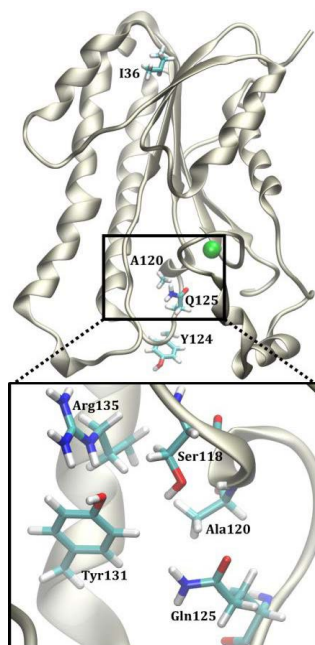
Osim za sintezu farmaceutika, imaju velik potencijal da se koriste u bioremedijaciji. Razni halogenirani spojevi koji se koriste u proizvodnji insekticida, herbicida i intermedijera za farmaceutike izrazito su štetni za okoliš jer osim što su toksični, vrlo su stabilni zbog čega se spontano ne raspadaju

(Olaniran i sur., 2004; Emanuelsson i sur., 2008). Enzimi HDDH razgrađuju takve spojeve cijepanjem veze ugljik-halogen (Janssen i sur., 2005).

2.3.2 Enzimi grupe B

Među prvim otkrivenim enzimima HDDH bili su enzimi grupe B, HheB iz *Corynebacterium sp.* (soj N-1074) i HheB2 iz *Mycobacterium sp.* (soj GP1) (Nakamura i sur., 1991; Nakamura i sur., 1994; van Hylckama Vlieg, 2001). Dugi niz godina nakon što je okarakteriziran i izoliran 1999. godine, enzim HheB2 bio je zanemaren u biokatalitičkim istraživanjima jer je pokazao nisku enantioselektivnost prema malom broju supstrata za koje je testiran (Majerić Elenkov i sur., 2006; Schrittwieser i sur., 2009; Majerić Elenkov i sur., 2018). Dok se HheB2 smatrao enzimom niske enantioselektivnosti i visoke regioselektivnosti na temelju istraživanja njegovog katalitičkog djelovanja u reakcijama konverzije *para*-nitro-2-brom-1-feniletanola u epoksid i cijanolize strukturno različitih alifatskih epoksida, (Lutje Spelberg i sur., 2002; Majerić Elenkov i sur., 2006) otkriveno je da enzim HheB pokazuje vrlo visoku enantioselektivnost u pretvorbi 1,3-diklor-2-propanola u (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitril (Nakamura i sur., 1991).

U posljednjih nekoliko godina, primjenom metoda ciljane mutageneze bazirane na strukturi enzima i slučajne mutageneze, konstruirani su HheB mutanti poboljšane enantioselektivnosti u konverziji 1,3-diklor-2-propanola i opisana je njihova kristalna struktura (Watanabe i sur., 2015; Watanabe i sur., 2016; Dokli i sur., 2021). Usporedbom i određivanjem aminokiselinske sekvence HheB i HheB2 enzima primijećeno je da se razlikuju u samo četiri aminokiseline. Dijelev visoku homologiju sekvence (95 %), a razlikuju se u sljedećim aminokiselinama: Ile36/Phe36, Ala120/Thr120, Tyr124/Cys124, Gln125/His125 (Watanabe i sur., 2015). Na slici 5 prikazano je aktivno mjesto HheB s istaknutim katalitičkim aminokiselinama i ograncima koji se razlikuju u dva enzima.



Slika 5: Aktivno mjesto HheB s označenim katalitičkim aminokiselinama (Ser118, Tyr131, Arg135) i ograncima (Ile36, Ala120, Tyr124, Gln125) koji se razlikuju u dva enzima (Mehić i sur., 2022)

Mehić i suradnici (2022) u svom radu pokazali su da HheB i HheB2 enzimi mogu katalizirati reakcije sterički zahtjevnih 2,2-disupstituiranih epoksida s vrlo visokom enantioselektivnošću ($E > 200$), čime omogućuju biokatalitičku sintezu optički čistih velikih tercijarnih alkohola, molekula čija je sinteza izazovna i koje su vrlo važne za proizvodnju farmaceutika. Iako je u proučavanim reakcijama primijećena inhibicija enzima supstratima, to ne umanjuje novootkrivenu katalitičku važnost enzima HHDH grupe B te su potrebna daljnja istraživanja usmjerena prema optimizaciji procesa i pronalaženju reakcijskih uvjeta koji bi otključali pun potencijal ovih biokatalizatora.

2.4 Micelarna biokataliza

Većina kemijskih reakcija, transformacija i organskih sinteza ne bi bila moguće bez upotrebe otapala, koja imaju nezamjenjivu ulogu u osiguravanju učinkovitog kontakta između reagensa i katalizatora, upravljanju prijenosom topline, održavanju potrebnih reakcijskih uvjeta i olakšavanju svih poslijereakcijskih manipulacija (Lorenzetto i sur., 2022). Dodatno, stabiliziraju intermedijere i prijelazna stanja u reakcijama čime utječu na kemo-, regio- i stereoselektivnost (Dyson i Jessop, 2016). Sve to čini pravilan odabir otapala ključnim dijelom razvoja svakog procesa koji uključuje bilo kakvu vrstu kemijskih reakcija.

Otapala čine 60 % kemijske mase u farmaceutskoj industriji i negativno utječu na održive parametre procesa kao što je E faktor (Benison i Rayne, 2022; Sheldon i sur., 2022), dok je preko 80 % otpada nastalog kao nusprodukt sintetske organske kemije posljedica upotrebe organskih otapala (Lipshutz i sur., 2016). Navedeno stavlja odabir otapala među najvažnije stavke za osiguravanje održivosti nekog procesa.

Organska otapala predstavljaju najšire korištene reakcijske medije u organskoj sintezi, prvenstveno zahvaljujući njihovoj mogućnosti da otope različite spojeve, a pritom ostanu kemijski stabilni (Firestone i Gospe, 2009). Klorinirana i aromatska otapala, alifatski ugljikovodici, aceton i etanol najčešće su korištena organska otapala u kemijskim procesima (Grodowska i Parczewski 2014; Lorenzetto i sur., 2022). Takva otapala su uglavnom toksična i vrlo štetna za okoliš, a imaju loš utjecaj na stabilnost i aktivnost enzima te nerijetko dovode do njihove denaturacije (Gupta, 1992; Ogino i Ishikawa, 2001; Cortes-Clerget i sur., 2019).

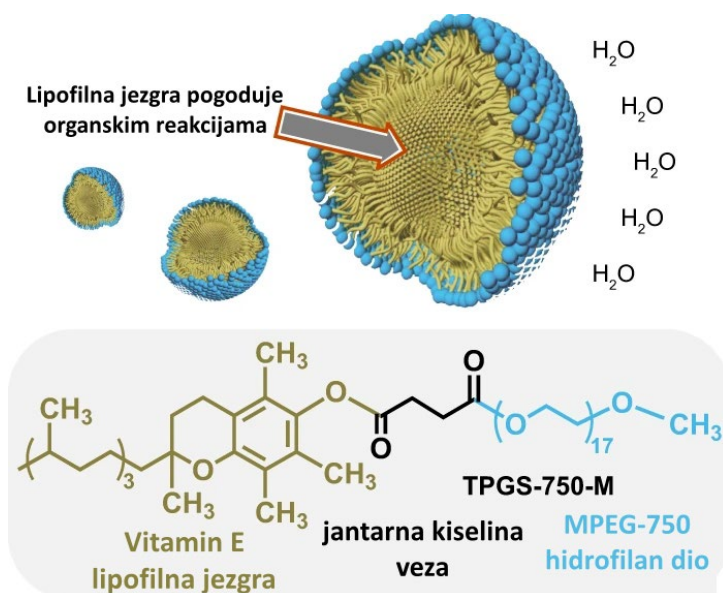
Posljednjih godina provedena su brojna istraživanja usmjerena prema razvoju zelenih otapala, kao što su ionske tekućine, superkritični CO₂ i duboka eutektička otapala (Plechova i Seddon, 2008; Hoang i sur., 2017; Hansen i sur., 2021). Voda, iako dugo izbjegavana kao reakcijski medij u organskim sintezama, predstavlja idealan reakcijski medij za biokatalizu jer pogoduje održavanju stabilnosti i aktivnosti enzima u reakcijskim smjesama. U svojoj srži voda je održivo, lako dostupno, jeftino, nezapaljivo i netoksično otapalo s vrlo visokim toplinskim kapacitetom (Parmentier i sur., 2017). Upotreba vode kao otapala raste, kako u organskoj sintezi, tako i u kemijskoj katalizi te biokatalizi, posebno zahvaljujući vodenim micelarnim reakcijskim medijima koji rješavaju probleme topljivosti organskih reagensa i metalnih katalizatora u vodi (Gallou, 2020; Lipshutz i sur., 2016; Cortes-Clerget i sur., 2021).

Micelarni reakcijski mediji osim prednosti koje nameće upotreba vode nad organskim otapalima, otvara mogućnost recikliranja katalitičkih sustava, posebice u reakcijama gdje su produkti više hidrofobni od početnih materijala (Zhao i sur., 2013; Scarso i Strukul, 2019; Shen i sur., 2021). Surfaktanti kao što su TPGS-750-M, Nok i PS-750-M otvorili su vrata provođenju raznih katalitičkih reakcija u vodi, u blagim reakcijskim uvjetima i s velikom učinkovitošću (Lipshutz i sur., 2011; Klumphu i Lipshutz, 2014; Brals i sur., 2017).

Micele su agregati molekula surfaktanata koje unutar reakcijske smjese formiraju nanostrukture čime stvaraju jedinstvenu reakcijsku okolinu koja može pozitivno utjecati na brzine i selektivnost kemijskih reakcija (Turro i sur., 1985; Gallou i Lipshutz, 2019; Strukul i sur., 2022). Micelarna biokataliza podrazumijeva upotrebu vodenih micelarnih reakcijskih medija za provedbu organskih sintetskih reakcija kataliziranih enzimima. Iskorištava svojstvo TPGS-750-M surfaktanta da formira aggregate micela unutar micela koji se ponašaju kao nanoreaktori, omogućavaju odvijanje organskih reakcija u vodi i predstavljaju održiviju obećavajuću alternativu organskim otapalima (Andersson i sur., 2018; Cortes-Clerget i sur., 2019).

2.4.1 Prednosti micelarnih reakcijskih medija

Micelarni reakcijski mediji obećavajuća su alternativna tradicionalnim organskim otapalima. Cortes-Clerget i suradnici u svom radu (2019) ispitivali su i optimizirali „one-pot“ reakcije katalizirane različitim prijelaznim metalima u kojima kao produkti nastajali ketoni koji se dalje reduciraju alkohol-dehalogenazama. Kao reakcijski medij koristili su vodene otopine koje sadrže micele formirane upotrebom TPGS-750-M surfaktanta, pri čemu njegova hidrofobna jezgra omogućuje da se organske reakcije odvijaju u vodi bez potrebe za dodatnim organskim otapalima. Struktura nanoreaktora kojeg tvori surfaktant TPGS-750-M prikazana je na slici 6.



Slika 6: Nanoreaktori koje tvore micele TPGS-750-M surfaktanta u vodi

Na temelju primijećenih rezultata zaključili su da se u reakcijskoj smjesi koja koristi micelarni medij kao otapalo javlja „efekt rezervoara“. Efekt rezervoara odnosi se na mogućnost da se miclele ponašaju kao spremišta odnosno rezervoari za supstrate, produkte i katalizatore tijekom trajanja reakcije. Miclele koje tvore surfaktanti kao što je TPGS-750-M imaju hidrofobnu jezgru koja može uhvatiti i otopiti hidrofobnne supstrate, zbog čega dolazi do dinamičke izmjene tvari između micela i okolnog vodenog medija.

Zahvaljujući efektu rezervoara, povećava se učinkovitost i kemijski kataliziranih i enzimski kataliziranih reakcija, jer povećava dostupnost supstrata, smanjuje inhibiciju enzima, omogućava integraciju više katalitičkih procesa u „one-pot“ reakcijama i u konačnici otvara vrata razvoju novih učinkovitijih sintetskih puteva. Povezane prednosti upotrebe micelarnih reakcijskih medija navedene su u tablici 3.

Tablica 3: Prednosti upotrebe micelarnih reakcijskih medija u biokatalizi

Prednost	Razlog
Povećana topljivost hidrofobnih supstrata	Hidrofobnna jezgra može otopiti nepolarne supstrate i supstrate slabo topljive u vodi.
Veće brzine reakcije	Kada se supstrati nađu unutar micela može doći do većih lokalnih koncentracija što često dovodi do povećanja brzine reakcije.
Smanjenje inhibicije enzima	Miclele se ponašaju kao rezervoari za supstrate i produkte što minimalizira nekompetitivnu inhibiciju i povećava učinkovitost katalitičkog procesa.

Iako su micelarni mediji vrlo obećavajući kako u katalizi općenito, tako i u biokatalizi, znanje o ponašanju micela u ovom kontekstu i dalje je ograničeno te su potrebna su daljnja istraživanja usmjerena prema optimizacijama samih micelarnih medija i procesa u kojima će se koristiti kako bi se prevladali neki od izazova kao što je stabilnost enzima medijima, topljivost supstrata i uvećanje procesa koji koriste ove medije.

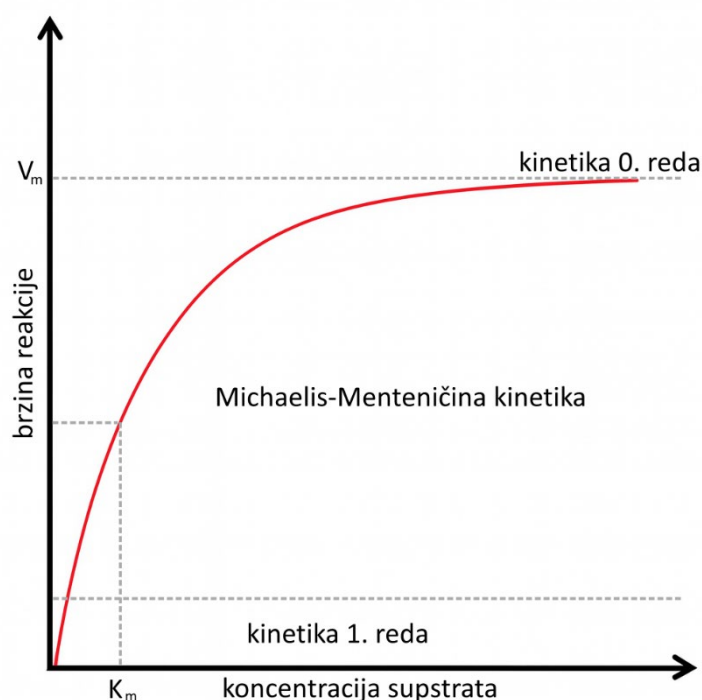
2.5 Enzimska kinetika

Enzimska kinetika opisuje koliko učinkovito enzimi kataliziraju neku reakciju odnosno koliko učinkovito prevode supstrate reakcije u produkte. Reakcije katalizirane enzimima obično slijede Michaelis-Menteničinu kinetiku, koja pretpostavlja da enzim reagira sa supstratom pri čemu nastaje enzim-supstrat kompleks koji sudjeluje u nastanku produkata te da se koncentracija enzima u samoj reakciji ne mijenja. Mehanizam enzimski katalizirane reakcije prikazan je shemom 1, pri čemu E predstavlja enzim, S supstrat, ES kompleks enzim-supstrat, a P produkt.



Shema 1: Mehanizam enzimski katalizirane reakcije

Michaelis-Menteničina kinetika grafički je prikazana na slici 7. V_m predstavlja maksimalnu brzinu reakcije, a K_m Michaelisovu konstantu. Kada se brzina reakcije izjednači s maksimalnom brzinom reakcije, sav enzim vezan je u obliku enzim-supstrat kompleksa. Brzina reakcije ne povećava se u beskonačnost jer enzim postaje zasićen kod viših koncentracija supstrata, što predstavlja jednu od najvažnijih značajki Michaelis-Menteničine kinetike.



Slika 7: Ovisnost brzine enzimске reakcije o koncentraciji supstrata za Michaelis-Menteničinu kinetiku

K_m vrijednost numerički izražava afinitet enzima prema supstratu i jednaka je koncentraciji supstrata pri kojoj brzina reakcije iznosi polovicu maksimalne brzine. Neovisna je o koncentraciji enzima, mijenja se ovisno o kombinaciji koncentracije enzima i supstrata, a što je vrijednost ove konstante niža, afinitet prema supstratu je veći i reakcija će puno prije dostići maksimalnu brzinu.

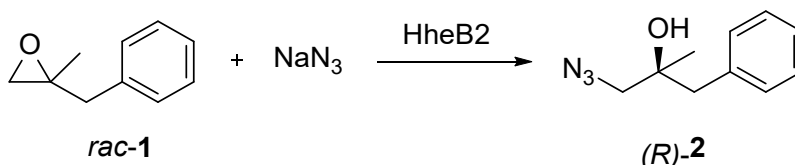
Područje Michaelis-Menteničine kinetike nalazi se između područja kinetike prvog i nultog reda. Kod kinetike prvog reda brzina reakcije proporcionalna je koncentraciji supstrata ($c \ll K_m$), a kod kinetike nultog reda brzina reakcije je maksimalna i neovisna o koncentraciji supstrata ($c \gg K_m$). Sama Michaelis-Menteničina kinetika može se opisati jednadžbom 1 gdje c predstavlja koncentraciju supstrata, a r brzinu reakcije.

$$r = \frac{V_m * c}{K_m + c}$$

Jednadžba 1: Michaelis-Menteničina jednadžba

3 Hipoteza i ciljevi rada

U reakciji azidolize 2-benzil-2-metiloksirana, kataliziranoj enzimom HheB2 dolazi do inhibicije enzima supstratom. Reakcija je prikazana shemom 2, pri čemu *rac*-1 predstavlja supstrat 2-benzil-2-metiloksiran, a (*R*)-2 predstavlja produkt (*R*)-1-azido-2-metil-3-fenilpropan-2-ol.



Shema 2: Reakcija azidolize *rac*-1 katalizirana enzimom HheB2

Pretpostavljeno je da je moguće smanjiti inhibiciju enzima supstratom upotrebom micelnog reakcijskog medija. S obzirom da se radi o hidrofobnom organskom supstratu, očekuje se da će micelarni sustav na bazi TPGS-750-M povući dio molekula u svoju hidrofobnu jezgru, čime se istodobno povećava ukupna topljivost supstrata u vodi i snižava njegova slobodna koncentracija u neposrednoj okolini enzima. Taj „efekt rezervoara“ trebao bi pogodovati smanjenju inhibicije HheB2 jer umanjuje vjerojatnost da 2-benzil-2-metiloksiran kompetitivno ili nekompetitivno blokira aktivno mjesto HheB2.

Cilj rada bio je usporedbom procijenjenih kinetičkih parametara u puferu, Tris-SO_4 , i micelarnom mediju koji se sastoji od TPGS-750-M surfaktanta u koncentraciji 2 % v/v, potvrditi da se radi o smanjenju enzimске inhibicije supstratom. U tu svrhu, ispitivan je utjecaj koncentracije supstrata ([4.4.1](#)), nukleofila ([4.4.2](#)) i produkta ([4.4.3](#)) na aktivnost enzima te operacijska stabilnost enzima u puferu i micelarnom mediju ([4.5](#)). Dodatno je proveden preliminarni test ponovne upotrebe 2 % TPGS-750-M ([4.6](#)).

4 Eksperimentalni dio

Eksperimentalni dio ovog istraživanja podijeljen je u nekoliko koraka: uzgoj bakterijskih stanica i izolacija željenog enzima, karakterizacija dobivenog enzima testom po Bradfordu i elektroforezom, usporedba operacijske stabilnosti enzima u puferu i micelarnom mediju te ispitivanje utjecaja koncentracija supstrata, nukleofila i produkta na aktivnost enzima. Dodatno je proveden preliminarni test ponovne upotrebe micelnog medija. Eksperimenti su detaljno opisani prema redosljedu izvođenja, od poglavlja [4.1](#) do poglavlja [4.6](#).

Instrumenti i uređaji koji su korišteni u eksperimentu navedeni su u tablici 5. Sve kemikalije korištene u eksperimentima ili su navedene u tablici 4 ili pripremljene iz njih. Komercijalno nedostupne kemikalije, para-nitro-2-brom-1-feniletanol (PNSHH), 2-benzil-2-metiloksiran (supstrat, *rac*-1) i (*R*)-1-azido-2-metil-3-fenilpropan-2-ol (produkt, (*R*)-2) sintetizirani su ranije u Laboratoriju za stereoselektivnu sintezu i biokatalizu na Institutu Ruđer Bošković.

Tablica 4: Kemikalije korištene u eksperimentima

Naziv	Molekulska formula	Proizvođač
Agar	/	Difco
Akrilamid	C ₃ H ₅ NO	Carl Roth
Amonijev persulfat	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Carl Roth
Bromfenolplavo	C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S	Carl Roth
BSA	/	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blue R 250	/	Merck
DMSO	C ₂ H ₆ OS	Carl Roth
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Carl Roth
Etanol	C ₂ H ₆ O	Sigma-Aldrich
Etil acetat	C ₄ H ₈ O ₂	Carl Roth
Fosforna kiselina	H ₃ PO ₄	Sigma-Aldrich
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	Carl Roth
Glicin	C ₂ H ₅ NO ₂	Carl Roth
L-arabinoza	/	Carl Roth
Luria-Bertani hranjiva podloga	/	Difco
MTBE	(CH ₃) ₃ COCH ₃	Sigma Aldrich
Natijev azid	NaN ₃	Alfa Aesar
Natrijev dodecil sulfat	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	Carl Roth
Natrijev hidroksid	NaOH	Sigma-Aldrich
Natrijev sulfat	Na ₂ SO ₄	Carl Roth
Natrijeva sol ampicilina	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₄ S	Carl Roth

Octena kiselina	C ₂ H ₄ O ₂	Sigma-Aldrich
PageRuler Unstained Protein Ladder	/	ThermoScientific
Proteazni inhibitor	/	Roche
SDS	NaSO ₄ C ₁₂ H ₂₅	Sigma-Aldrich
Sumporna kiselina	H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich
TEMED	C ₆ H ₁₆ N ₂	Carl Roth
TPGS-750-M	/	Sigma Aldrich
Tris	(HOCH ₂) ₂ C(NH ₂)CH ₃	Sigma-Aldrich
β-merkaptioetanol	C ₂ H ₆ OS	Carl Roth

Tablica 5: Instrumenti korišteni u eksperimentalnom radu

Naziv instrumenta	Namjena
Agilent 7820A GC	Plinska kromatografija, analiza uzoraka
Agilent 8860 GC	Plinska kromatografija, analiza uzoraka
Agilent HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm)	Kromatografska kolona
Amicon® Ultra Filter, 10 kDa MWCO	Filtracija reakcijskih smjesa
Bandelin Sonopuls, TS102	Sonifikacija staničnih ekstrakata
Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra	Elektroforeza
Bio-Rad PowerPac™ Basic	Elektroforeza
BioSan Thermo-Shaker TS100C	Provedba reakcija
Büchi Rotavapor RE 111	Uparivanje etil acetata iz micelnog medija
CHROMAFIL® Xtra H-PTFE-20/13	Filtriranje otopina i Bradfordovog reagensa
IKA RCT Basic	Magnetska miješalica
Macherey-Nagel Hydrodex g-DiMOM (25 m × 0,25 mm)	Kromatografska kolona
Merck Milipore Tank PE030, Filter MPK01	MiliQ voda
Mettler Toledo FiveEasy	Podešavanje pH otopina pufera
Shimadzu UV-1280	Spektrofotometrijska mjerenja
Thermo Scientific MaxQ 4450	Inkubacija bakterijskih kultura
Thermo Scientific SL 8R	Ekstrakcija, centrifugiranje

Specifična aktivnost enzima (*S.A.*) određena je putem omjera volumne aktivnosti (*V.A.*) i koncentracije HheB2: $S.A. = \frac{V.A.}{V_{HheB2}}$.

Volumna aktivnost određena je putem sljedeće relacije: $V.A. = \frac{dc}{dt} * \frac{V_r}{V_{HheB2}}$. V_r predstavlja volumen reakcijske smjese, a V_{HheB2} volumen enzima u reakcijskoj smjesi.

Omjer $\frac{dc}{dt}$ predstavlja nagib pravca dobiven iz promjene koncentracije *rac-1* ili (*R*)-**2** tijekom reakcije. Koncentracija navedenih tvari u uzorcima određivana je plinskom kromatografijom, preko površine produkta i supstrata i prethodno izrađenih baždarnih dijagrama ovisnosti površine *rac-1* odnosno (*R*)-**2** o njihovoj koncentraciji. Retencijska vremena *rac-1* i (*R*)-**2** navedena su u tablici 6.

Tablica 6: Retencijska vremena i uvjeti analize na GC-u

Kolona	Uvjeti	R.T. <i>rac-1</i> , min	R.T. (<i>R</i>)- 2 , min
HP-5 Agilent (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm)	40 °C 2 min, 10 °C/min do 200 °C 5 min	8,25	12,46
	40 °C 2 min, 10 °C/min do 160 °C 5 min		

Kod mjerenja operacijske stabilnosti enzima, gradijent $\frac{dc}{dt}$ određivan je spektrofotometrijskom metodom kasnije opisanom u poglavlju [4.5.3](#) praćenjem promjene apsorbancije u vremenu pomoću softvera *UVProbe*.

Konverzija je određena putem omjera enantiomernog viška supstrata i produkta: $\frac{ee_s}{ee_s + ee_p} * 100 \%$. Enantiomerni višak određen je praćenjem koncentracija odnosno površina oba enantiomera *rac-1* i (*R*)-**2**: $ee = \left| \frac{S_S - S_R}{S_S + S_R} \right|$.

4.1 Uzgoj bakterijskih stanica i izolacija željenog enzima

Enzim HheB2 pripremljen je metodom prekomjerne ekspresije u stanicama *E. coli* (soj MC1601). Protokol uzgoja bakterijskih stanica i izolacije željenog enzima provodi se u nekoliko koraka: priprema hranjivih podloga, otopina i pufera, izolacija pojedinačnih bakterijskih kultura, priprema malih prekonocnih kultura, prekomjerna ekspresija HHDH proteina te izolacija proteina.

4.1.1 Priprema hranjivih podloga, otopina i pufera

Otopine i puferi koji su pripremljeni za potrebe eksperimenta su: otopina ampicilina, L-arabinoze, otopina EDTA te puferi Tris-SO₄ i TEMG. Način pripreme otopina i pufera opisan je u tablici 7.

Tablica 7: Priprema otopina i pufera za uzgoj bakterijskih stanica i izolaciju željenog enzima

Kemikalija	Koncentracija / pH	Način pripreme
Ampicilin	100 mg/mL / Ø	Priprema se u miliQ vodi i sterilizira propuštanjem kroz sterilni filter (0,2 μm). Čuvanje pri -20 °C.
L-arabinoza	200 mg/mL / Ø	Priprema se u miliQ vodi i sterilizira propuštanjem kroz sterilni filter (0,2 μm). Čuvanje pri -20 °C.
EDTA	0,01 mol/L / Ø	Priprema se u miliQ vodi. U otopinu se dokapava otopina NaOH do potpunog otapanja EDTA.

Tris-SO ₄	0,01 mol/L / 7,5	Priprema se otapanjem Tris baze u miliQ vodi, a pH se podešava dodavanjem H ₂ SO ₄ .
TEMG	0,25 g/mL / Ø	50 mL TEMG pufera priprema se miješanjem: 0,5 mL Tris-SO ₄ , 5 mL EDTA, 5 mL glicerola, 3 µL β-merkaptetanola i nadopunjavanjem miliQ vodom.

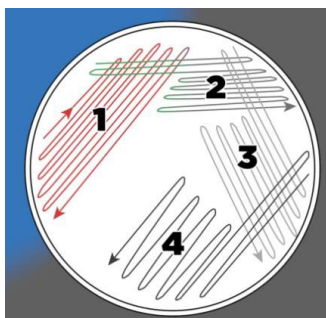
Nakon pripreme potrebnih otopina i pufera, pripremljene su krute i tekuće Luria-Bertani (LB) hranjive podloge. Kruta hranjiva podloga priprema se u Erlenmeyerovoj tikvici od 250 mL, a tekuće hranjive podloge pripremaju se u dvije Erlenmeyerove tikvice od 200 mL i dvije Erlenmeyerove tikvice od 2 L. Pripremljene podloge homogenizirane su uz pomoć magnetske miješalice niže prikazane na slici 16 te zajedno sa staklenim priborom za uzgoj stanica sterilizirane u autoklavu na temperaturi od 120 °C tijekom 20 minuta. Nakon sterilizacije, hranjive podloge ohlađene su na sobnoj temperaturi. Način pripreme LB hranjivih podloga opisan je u tablici 8.

Tablica 8: Priprema hranjivih podloga za uzgoj bakterijskih stanica i izolaciju željenog enzima

Podloga	Koncentracija	Priprema
Kruta LB hranjiva podloga	$\gamma(\text{LB}) = 25 \text{ g/L}$ $\gamma(\text{agar}) = 15 \text{ g/L}$	Otapanje 6,25 g LB hranjive podloge i 3,75 g agara u 250 mL miliQ vode.
Tekuća LB hranjiva podloga (x2)	$\gamma(\text{LB}) = 25 \text{ g/L}$	Otapanje 0,5 g LB hranjive podloge u 20 mL miliQ vode.
Tekuća LB hranjiva podloga (x2)	$\gamma(\text{LB}) = 25 \text{ g/L}$	Otapanje 12,5 g LB hranjive podloge u 500 mL miliQ vode.

4.1.2 Izolacija pojedinačnih bakterijskih kultura

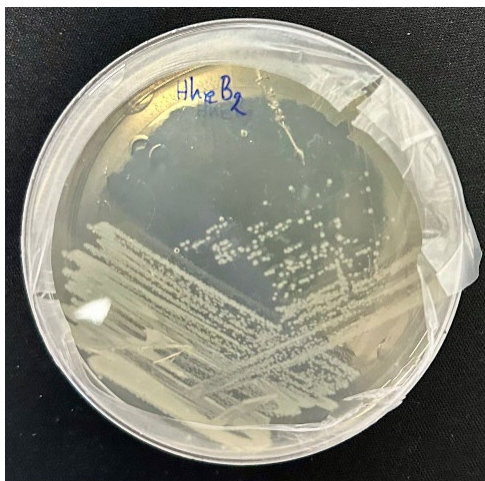
Ohlađena kruta hranjiva podloga izlivena je u sterilne plastične Petrijeve zdjelice, gdje je puštena da očvrсне. Bakterijske kulture *E. coli* naciepljene su koristeći sterilnu ezu, metodom iscrpljivanja koja je shematski prikazana na slici 8. Pri naciepljivanju potrebno je paziti da je agar na pločama suh kako vlaga ne bi uzrokovala kontaminaciju ili spriječila da stanice rastu kao pojedinačne kolonije. Rub Petrijevih zdjelica obložen je parafilmom u svrhu sprječavanja izmjene vlage i kontaminacije, a naciepljene kulture inkubirane su poklopcem prema dolje, na 37 °C u trajanju od 24 sata. Cijeli postupak provoden je u sterilnim uvjetima uz plamenik.



Slika 8: Iscrpljivanje stanica do pojedinačnih kolonija
(<https://hardydiagnostics.com/blog/petri-plate-2023>)

4.1.3 Priprema malih prekonoćnih kultura

U sterilizirane Erlenmeyerove tikvice s 20 mL LB tekuće hranjive podloge dodano je 20 μ L ampicilina. Nacijepljene stanice *E. coli* koje nose uputu za sintezu HheB2 enzima nose gen za otpornost na ampicilin pa je ovaj antibiotik dodan u hranjive podloge kako bi se spriječio rast drugih, neželjenih mikroorganizama. Sterilnom ezom dodane su 1-2 pojedinačne kolonije naraslih transformanata s Petrijevih zdjelica, prikazanih na slici 9. Cijeli postupak provoden je u sterilnim uvjetima uz plamenik.



Slika 9: Nacijepljena kultura s naraslim pojedinačnim kolonijama

Tako pripremljene male prekonoćne kulture inkubirane su na 37 °C i 250 okr/min u trajanju od 18 sati. Tijekom tog vremena postignuto je maksimalno zasićenje podloge živim bakterijskim stanicama. Uređaj korišten za inkubaciju prikazan je na slici 10.



Slika 10: Thermo Scientific MaxQ 4450

4.1.4 Prekomjerna ekspresija HHDH proteina

Nakon 18 sati inkubacije, mala prekonoćna kultura pohranjena je u hladnjak kako bi se zaustavio daljnji rast stanica. U sterilizirane Erlenmeyerove tikvice od 2 L s 500 mL LB tekuće hranjive podloge dodano je 500 μ L ampicilina i 5 mL male prekonoćne kulture. Pripremljena smjesa inkubirana je na 37

°C i 200 okr/min, u uređaju prikazanom na slici 10. Za vrijeme inkubacije, kako bi se procijenila koncentracija stanica u bakterijskoj kulturi praćena je optička gustoća kulture pri valnoj duljini od 600 nm (engl. *optical density at 600 nanometers*, OD600). Postupak uzorkovanja provođen je u sterilnim uvjetima uz plamenik.

OD600 praćena je svakih 20 minuta, od trenutka naciepljivanja velike kulture. Mjerenja su provedena koristeći UV-VIS spektrofotometar prikazan na slici 11, u čistim kivetama. Prije mjerenja apsorbancije uzoraka, apsorbancija je podešena na 0 koristeći uzorak LB tekuće hranjive podloge bez naciepljenih bakterijskih stanica. Inkubacija je zaustavljena kada je OD600 iznosila između 0,4 i 0,6 jer je tada dostignut optimalan rast stanica.



Slika 11: Shimadzu UV-1280

U tikvicu je dodano 500 μ L pripremljene temeljne otopine arabinoze u svrhu induciranja proizvodnje željenog enzima. Tako pripremljena hranjiva podloga s kulturom stanica inkubirana je na 30 °C pri 200 okr/min u trajanju od 18 sati. Inkubacija je provedena u uređaju prikazanom na slici 10. Cijeli postupak provođen je u sterilnim uvjetima uz plamenik.

4.1.5 Izolacija proteina

U velikoj prekonoćnoj kulturi nalaze se cijele stanice koje sadrže željeni enzim. Navedena kultura raspodijeljena je u Falcon epruvete i centrifugirana 30 min, na 4 °C i 4500 okr/min. Centrifugiranje je provedeno u uređaju prikazanom na slici 12. Nadtalozi su bačeni, a talozi isprani Tris-SO₄ puferom kako bi se stanice očistile od hranjive podloge.



Slika 12: Thermo Scientific SL 8R

Isprani talozi ponovno su centrifugirani u istim uvjetima. Nastali nadtalozu su bačeni, a talozi resuspendirani u TEMG puferu. U suspenziju je dodan proteazni inhibitor, 400 μ L inhibitora na 10 mL TEMG pufera. Proteazni inhibitor dodaje se kako proteaze, enzimi prirodno prisutni u *E. coli* ne bi razgradili ciljane HHDH proteine. Nakon dodavanja proteaznog inhibitora, suspenzija je sonificirana (sonda TS102) kako bi se razbile stanične stijenke i oslobodio stanični ekstrakt u kojima se nalaze proteini, koristeći uređaj prikazan na slici 13.



Slika 13: Bandelin Sonopuls

Sonificiranje je provedeno u 10 ciklusa od 10 sekundi nakon kojih slijedi 10 sekundi pauze, uz amplitudu od 60 %, u trajanju od 3 minute. Tijekom sonifikacije, vrlo je važno da resuspendirane bakterijske stanice budu u hladnim uvjetima za što je korištena čaša s ledom. Pauze su bile potrebne kako bi se spriječila denaturacija proteina zbog pregrijavanja smjese.

Nakon sonifikacije, suspenzija je prebačena u Eppendorf epruvete od 2 mL koje su centrifugirane 45 min na 11000 okr/min. Nadtalozu predstavljaju sirovi enzimski ekstrakt u kojemu se nalazi i ciljani enzim, HheB2, te su oni odvojeni i pohranjeni na -20 °C.

4.2 Karakterizacija dobivenih enzima

Sirovi enzimski ekstrakti dobiveni postupcima opisanim u poglavlju [4.1](#) okarakterizirani su određivanjem njihove koncentracije testom po Bradfordu te SDS-PAGE elektroforezom.

4.2.1 Elektroforeza

Sam proces provedbe elektroforeze podijeljen je u tri koraka: priprema i polimerizacija gelova za elektroforezu, priprema uzoraka pročišćenih proteina i otopina za elektroforezu, elektroforeza te bojanje i odbojavanje gelova.

4.2.1.1 Priprema i polimerizacija gelova

Pripremljena su dva gela: gel za razdvajanje i gel za koncentriranje. Gelovi su pripremljeni miješanjem različitih volumena otopina prikazanih u tablici 9. Otopine za polimerizaciju gelova pripremljene su neposredno prije upotrebe. Navedene otopine ne smiju se vorteksirati jer je SDS sklon pjenjenju pa je u svrhu homogeniziranja sadržaj lagano miješan štapićem.

Tablica 9: Priprema gelova za elektroforezu

Gel za razdvajanje		Gel za koncentriranje	
Otopina	Volumen, mL	Otopina	Volumen, mL
H ₂ O	3,350	H ₂ O	3,050
1,5 M Tris pH=8,8	2,500	0,5 M Tris pH=6,8	1,250
Akrilamid, w=30 %	4,000	Akrilamid, w=30 %	0,660
SDS, w=10 %	0,100	SDS, w=10 %	0,050
Amonijev persulfat (APS), w=10 %	0,050	Amonijev persulfat (APS), w=10 %	0,050
TEMED	0,007	TEMED	0,007

Gel za razdvajanje nanesen je pipetom između stakalca aparature za elektroforezu, do unaprijed ucertane oznake. Pipetom je dodan sloj vode kako se gel ne bi osušio, a pripremljen sadržaj ostavljen je da polimerizira 30 minuta. Nakon polimerizacije gela za razdvajanje voda je izlivena, a vrh gela osušen papirom.

Dalje je pripremljena otopina gela za koncentriranje koji je pipetom nanesen do ruba urezane ploče. Nakon nanošenja gela u aparaturu su umetnuti češljici. Sadržaj je također ostavljen da polimerizira 30 minuta pa su češljici izvađeni.

4.2.1.2 Priprema uzoraka proteina i otopina za elektroforezu

Pripremljena su dva pufera: jedan za provedbu elektroforeze i jedan za pripremu uzoraka. Pufer za provedbu elektroforeze pripremljen je otapanjem kemikalija prikazanih u tablici 10 u 1 L destilirane vode. Tako pripremljen pufer prije korištenja razrijeđen je 10 puta. Pufer za pripremu uzoraka proteina pripremljen je miješanjem otopina prikazanih u tablici 11.

Tablica 10: Pufer za provedbu elektroforeze

Kemikalija	Odvaga, g
Tris	30,29
Glicin	144,13
SDS	10,00

Tablica 11: Pufer za pripremu uzoraka

Kemikalija	Volumen, mL
H ₂ O	3,55
0,5 M Tris, pH=6,8	1,25
Glicerol	2,50
SDS, w=10 %	2,00
BPB, w=10 %	0,20

Neposredno prije pripreme uzoraka pufer za njihovu pripremu u digestoru je pomiješan s 50 µL β-merkaptetanola. 10 µL ekstrakta proteina iz svakog uzorka pomiješano je s 10 µL pripremljenog pufera u Eppendorf epruvetama od 1,5 mL. Sadržaj svake epruvete vorteksiran je 1 minutu i stavljen na tresilicu 10 minuta na 95 °C kako bi se proteini u uzorcima denaturirali. Nakon denaturacije, uzorci su ponovno vorteksirani 1 minutu.

Jažice nastale po vađenju češljica iz aparature za elektroforezu, prostor iznad jažica i gornja komora za pufer napunjeni su pripremljenim puferom za elektroforezu. Jažice su napunjene uzorcima pomoću igle. U prvu jažicu stavljeno je 5 µL proteinskog markera (engl. *page ruler*), a u ostale po 10 µL pripremljenih uzoraka enzimskih ekstrakata. Elektroforeza je provedena pri konstantnom naponu od 150 V 85 minuta, do spuštanja uzoraka na dno gela.

4.2.1.3 Bojanje i odbojavanje gelova

Pripremljena je otopina za bojanje otapajući 100 mg *Coomassie Brilliant Blue R 250* reagensa u otopini čiji je sastav prikazan u tablici 12. Gelovi su u navedenoj otopini bili potopljeni uz miješanje na tresilici 60 minuta.

Tablica 12: Otopina za bojanje gelova

Kemikalije	Volumen, mL
CH ₃ OH	50
CH ₃ COOH, w=10 %	7
H ₂ O	43

Nakon bojanja, reagens je izliven, a gelovi odbojavani koristeći otopinu octene kiseline (w=10 %). Otopina se zasitila plavom bojom nakon otprilike 30 minuta pa je sadržaj zamijenjen svježom otopinom octene kiseline. Odbojavanje je provedeno na tresilici u ukupnom trajanju od 80 minuta.

4.2.2 Određivanje koncentracije enzima testom po Bradfordu

Za određivanje koncentracije enzima testom po Bradfordu, bilo je potrebno izraditi baždarni pravac mjerenjem apsorbancije referentnog proteina različite koncentracije. Mjerenje je provedeno koristeći spektrofotometar prethodno prikazan na slici 11. Kao referentni protein korišten je albumin iz

goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA). Sva mjerenja vrijednosti apsorbancije rađena su u tri ponavljanja.

Najprije je pripremljen Bradfordov reagens, koji je nakon pripreme višestruko filtriran koristeći špricu i filter veličine pora 0,45 μ L. Bradfordov reagens čuva se u boci omotanoj aluminijskom folijom, na 4 °C, a prije korištenja ga je potrebno zagrijati na sobnu temperaturu. Način pripreme reagensa prikazan je u tablici 13.

Tablica 13: Priprema Bradfordovog reagensa

Kemikalija	Količina
Coomassie Brilliant Blue R 250	10 mg
Etanol, w=95 %	5 mL
Fosforna kiselina, w=85 %	10 mL
miliQ voda	85 mL

Za potvrdu koncentracije standarda, pripremljena je otopina BSA koncentracije 1 mg/mL i provjerena je njena apsorbancija pri 280 nm, koja treba iznositi 0,660. Kada je koncentracija standarda potvrđena, pripremljene su otopine BSA za izradu baždarnog pravca, koncentracija: 0, 1, 5, 10, 15 i 20 mg/L. Otopine su pripremljene razrjeđivanjem BSA ultračistom vodom.

Osamnaest čistih kiveta napunjeno je miliQ vodom i izmjerena je njihova apsorbancija pri 450 i 595 nm. Kivete su ispražnjene, pazeći da u njima ne zaostanu kapljice vode te je u njih redom, u po tri kivete, dodano 500 μ L pripremljenih otopina BSA poznatih koncentracija. Potom je u kivete dodano po 500 μ L Bradfordovog reagensa, s razmakom od 20 sekundi između dodavanja i kivete su kratko homogenizirane protresanjem. Nakon 10 minuta, započeto je mjerenje apsorbancije svakog uzorka pri 450 i 595 nm. S pomoću dobivenih rezultata konstruiran je baždarni pravac.

Razrijeđeni uzorci pripremljenog enzimskog ekstrakta pomiješani su s Bradfordovim reagensom. U kivetu je dodano 0,8 mL uzorka i 0,2 mL reagensa. Tako dobiven uzorak inkubiran je 10 minuta nakon čega je snimljena njegova apsorbancija pri istim valnim duljinama na kojima su snimane otopine poznate koncentracije. Apsorbancija svakog uzorka nepoznate koncentracije također je mjerena u tri ponavljanja. Odgovarajuće nepoznate koncentracije enzima u uzorcima izračunate su iz dobivene jednadžbe pravca.

4.3 Reakcija u kotlastom reaktoru

Tijek reakcije azidolize 2-benzil-2-metiloksirana (*rac*-1), kataliziran enzimom HheB2, ispitivan je u svrhu usporedbe konverzije supstrata u puferu i micelarnom mediju. Sastav reakcijske smjese korištene za ispitivanja prikazan je u tablici 14. Sva mjerenja napravljena su u tri ponavljanja.

Tablica 14: Sastav reakcijske smjese za praćenje tijeka reakcije

$V_r, \mu\text{L}$	$V_{HheB2}, \mu\text{L}$	$V_{rac-1}, \mu\text{L}$	$V_{NaN_3}, \mu\text{L}$ $c=500 \text{ mM}$	$V_{Tris-SO_4}, \mu\text{L}$ $c=200 \text{ mM}$	$V_{TPGS-750-M}, \mu\text{L}$ $w=2 \%$
500	70	7,4	55	367,6	

Pripremljeno je osam reakcijskih otopina. U prve četiri otpipetiran je zadani volumen Tris-SO₄ pufera, a u druge četiri zadani volumen TPGS-750-M micelnog medija nakon čega je u sve reakcijske otopine otpipetiran zadani volumen supstrata. Reaktori su kratko vorteksirani i stavljeni na tresilicu 2 minute, na 50 °C i 1000 okr/min. Korištena tresilica prikazana je na slici 14.



Slika 14: BioSan TS100C

Kada su se otopine ohladile na sobnu temperaturu, u reaktore je otpipetiran zadani volumen NaN₃ i isti su kratko vorteksirani te stavljeni na magnetsku miješalicu, na 25 °C pri 250 okr/min. Po dodavanju enzima u reaktor, pokrenuta je štoperica i time započeto praćenje tijeka reakcije. Korištena magnetska miješalica prikazana je na slici 15.



Slika 15: IKA RCT Basic

Reaktori s puferom kao otapalom uzorkovani su u 20., 30., 60. i 120. minuti, a reaktori s micelnim medijem kao otapalom uzorkovani su u 10., 25., 45., 60. i 120. minuti. Reakcije su uzorkovane, odnosno zaustavljene u željenom vremenu dodatkom 300 μL etil acetata s mesitilenom kao unutarnjim standardom. Nakon dodatka etil acetata, reaktori s puferom vorteksirani su 40 sekundi, a reaktori s micelama 60 sekundi te stavljeni u centrifugu prethodno prikazanu na slici 12 na 60 sekundi, 20 °C i 4500 okr/min kako bi se slojevi odijelili.

Po završetku ekstrakcije, 25 μL iz gornjeg organskog sloja otpipetirano je u Eppendorf epruvetu od 2 mL, a ostatak organskog otapala uklonjen je iz reaktora. Ekstrakcija je ponovljena još tri puta, dok

u Eppendorf epruveti nije skupljeno ukupno 100 μL alikvota. U epruvetu je dodano 1200 μL etil acetata, sadržaj je vorteksiran i osušen na bezvodnom Na_2SO_4 .

Analiza uzorka provedena je plinskom kromatografijom na uređaju prikazanom na slici 16, uz sljedeće uvjete: 40 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 200 $^{\circ}\text{C}$ 5 min. Za analizu je korištena HP-5 Agilent (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm) kolona.



Slika 16: Agilent 7820A GC

4.4 Kinetička mjerenja

Ispitan je utjecaj koncentracije supstrata, nukleofila i produkta na aktivnost enzima. Određivanje utjecaja koncentracije *rac*-**1**, NaN_3 i (*R*)-**2** na aktivnost enzima provedeno je metodom početnih reakcijskih brzina što znači da su uzorkovanja bila provedena u periodu prvih 10 % konverzije supstrata kada ne dolazi do izražaja potencijalno prisutna inhibicija produktom ili nusproduktom, kao niti vremenski ovisna deaktivacija enzima.

4.4.1 Ispitivanje utjecaja koncentracije supstrata na aktivnost enzima

Ispitivanje utjecaja koncentracije supstrata na aktivnost enzima provedeno je pri različitim koncentracijama *rac*-**1** dok su ostali reakcijski uvjeti održavani konstantnima. Kinetika reakcije promatrana je u puferu i micelarnom mediju.

4.4.1.1 Izrada baždarnog pravca za supstrat

Otopine poznatih koncentracija *rac*-**1** (0 do 100 mM) pripremljene su u Eppendorf epruvetama od 2 mL, koje su sadržavale potrebne volumene 200 mM Tris- SO_4 odnosno 2 % TPGS-750-M, *rac*-**1** i DMSO. Temeljne otopine *rac*-**1** pripremljene su razrjeđenjem čistog *rac*-**1**. Nakon pipetiranja svih kemikalija u epruvete, otopine su kratko vorteksirane i stavljene na tresilicu prethodno prikazanu na

slici 14, 2 minute, na 50 °C i 1000 okr/min. Nakon hlađenja, iz njih je uzeto 10 µL alikvota koji je razrijeđen u 500 µL MTBE i osušen na bezvodnom Na₂SO₄.

Analiza uzoraka provedena je plinskom kromatografijom na uređaju prethodno prikazanom na slici 16, uz sljedeće uvjete: 40 °C 2 min, 10 °C/min do 160 °C 5 min. Za analizu je korištena HP-5 Agilent (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) kolona. Baždarni dijagram izrađen je pomoću ovisnosti površine *rac-1* očitane s kromatograma o koncentraciji *rac-1*.

Enantiomerna čistoća *rac-1* provjerena je koristeći Hydrodex g-DiMOM (25 m × 0,25 mm, Macherey-Nagel) kolonu, uz sljedeće uvjete: 100 °C 2 min, 2 °C/min do 115 °C; 10 °C/min do 180 °C. Uređaj korišten za ovu analizu prikazan je na slici 17.



Slika 17: Agilent 8860 GC

4.4.1.2 Tris-SO₄

Pripremljeno je 11 reakcijskih smjesa ukupnog volumena 1000 µL, raspona koncentracija *rac-1* od 0 do 100 mM, koje su se sastojale od 200 mM Tris-SO₄ reakcijskog pufera, *rac-1*, NaN₃, DMSO i HheB2. U reaktore je otpipetiran potreban volumen DMSO kako bi njegov udio uvijek iznosio 5%, *rac-1* i pufera te su reaktori stavljeni na tresilicu 2 min, na 50 °C i 1000 okr/min. Nakon hlađenja, u reaktore je dodan potreban volumen otopine NaN₃ i reaktori su stavljeni na tresilicu na 25 °C i 1000 okr/min.

U trenutku dodavanja potrebnog volumena enzima u reaktor pokrenuta je štoperica. Iz reaktora je uzet alikvot od 20 µL koji je razrijeđen u 500 µL MTBE kako bi se zaustavila reakcija. Sadržaj je kratko vorteksiran i osušen na bezvodnom Na₂SO₄. Postupak je ponovljen još četiri puta tijekom prvih 5 minuta reakcije. Sva mjerenja provedena su na ovaj način.

Analiza uzoraka provedena je plinskom kromatografijom na način prethodno opisan u poglavlju [4.4.1.1.](#)

4.4.1.3 TPGS-750-M

Pripremljeno je 11 reakcijskih smjesa ukupnog volumena 1000 μL , raspona koncentracija *rac-1* od 0 do 500 mM, koje su se sastojale od 2 % TPGS-750-M reakcijskog medija, *rac-1*, NaN_3 , DMSO i HheB2. U reaktore je otpipetiran potreban volumen DMSO kako bi njegov udio uvijek iznosio 5%, *rac-1* i micelnog medija te su reaktori stavljeni na tresilicu 2 min, na 50 °C i 1000 okr/min. Nakon hlađenja, u reaktore je dodan potreban volumen otopine NaN_3 i reaktori su stavljeni na tresilicu na 25 °C i 1000 okr/min.

U trenutku dodavanja potrebnog volumena enzima u reaktor pokrenuta je štoperica. Iz reaktora je uzet alikvot od 20 μL koji je razrijeđen u 500 μL MTBE kako bi se zaustavila reakcija. Sadržaj je kratko vorteksiran i osušen na bezvodnom Na_2SO_4 . Postupak je ponovljen još četiri puta tijekom prvih 10 minuta reakcije. Sva mjerenja provedena su na ovaj način.

Analiza uzoraka provedena je plinskom kromatografijom na način prethodno opisan u poglavlju [4.4.1.1.](#)

4.4.2 Ispitivanje utjecaja koncentracije nukleofila na aktivnost enzima

Ispitivanje utjecaja nukleofila, NaN_3 , na aktivnost enzima provedeno je pri različitim koncentracijama NaN_3 dok su ostali reakcijski uvjeti održavani konstantnima. Utjecaj koncentracije nukleofila promatran je u puferu.

Pripremljeno je 12 reakcijskih smjesa ukupnog volumena 1000 μL , raspona koncentracija NaN_3 od 0 do 160 mM, koje su se sastojale od 200 mM Tris- SO_4 reakcijskog pufera, *rac-1*, NaN_3 , DMSO i HheB2. U reaktore je otpipetiran potreban volumen DMSO kako bi njegov udio uvijek iznosio 5%, *rac-1* i pufera te su reaktori zagrijani na tresilici 2 min, na 50 °C i 1000 okr/min. Nakon hlađenja, u reaktore je dodan potreban volumen otopine NaN_3 i reaktori su stavljeni na tresilicu na 25 °C i 1000 okr/min.

U trenutku dodavanja potrebnog volumena enzima u reaktor pokrenuta je štoperica. Iz reaktora je uzet alikvot od 20 μL koji je razrijeđen u 500 μL MTBE kako bi se zaustavila reakcija. Sadržaj je kratko vorteksiran i osušen na bezvodnom Na_2SO_4 . Postupak je ponovljen još četiri puta tijekom prvih 5 minuta reakcije. Sva mjerenja provedena su na ovaj način.

Analiza uzoraka provedena je plinskom kromatografijom na način prethodno opisan u poglavlju [4.4.1.1.](#)

4.4.3 Ispitivanje utjecaja koncentracije produkta na aktivnost enzima

Ispitivanje utjecaja produkta, (*R*)-**2**, na aktivnost enzima provedeno je pri različitim koncentracijama (*R*)-**2** dok su ostali reakcijski uvjeti održavani konstantnima. Utjecaj koncentracije produkta ispitivan je u puferu.

Pripremljeno je 6 reakcijskih smjesa ukupnog volumena 1000 μL , raspona koncentracija (*R*)-**2** od 0 do 50 mM, koje su se sastojale od 200 mM Tris- SO_4 reakcijskog pufera, *rac-1*, NaN_3 , DMSO i HheB2.

U reaktore je otpipetiran potreban volumen DMSO kako bi njegov udio uvijek iznosio 5%, *rac-1*, (*R*)-**2** i pufera te su reaktori zagrijani na tresilici 2 min, na 50 °C i 1000 okr/min. Nakon hlađenja, u reaktore je dodan potreban volumen otopine NaN₃ i reaktori su stavljeni na tresilicu na 25 °C i 1000 okr/min.

U trenutku dodavanja potrebnog volumena enzima u reaktor pokrenuta je štoperica. Iz reaktora je uzet alikvot od 20 µL koji je razrijeđen u 500 µL MTBE kako bi se zaustavila reakcija. Sadržaj je kratko vorteksiran i osušen na bezvodnom Na₂SO₄. Postupak je ponovljen još pet puta tijekom prvih 6 minuta reakcije. Sva mjerenja provedena su na ovaj način.

Analiza uzoraka provedena je plinskom kromatografijom na način prethodno opisan u poglavlju [4.4.1.1](#).

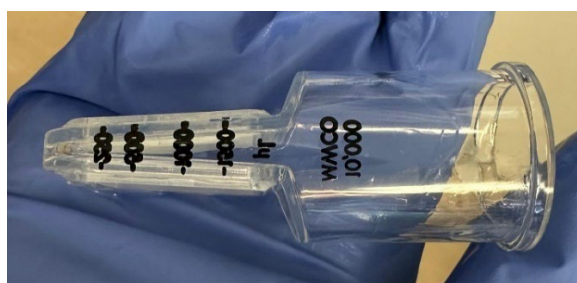
4.5 Usporedba operacijske stabilnosti enzima u puferu i micelarnom mediju

Za ispitivanje operacijske stabilnosti enzima korišten je spektrofotometrijski test niže upisan u poglavlju [4.5.3](#). Operacijska stabilnost enzima određivana je u puferu i u micelarnom mediju, na isti način. Svi reakcijski uvjeti osim reakcijskog medija održavani su konstantnima.

4.5.1 Tris-SO₄

Pripremljeno je 7 reakcijskih smjesa ukupnog volumena 500 µL koje su se sastojale od 200 mM Tris-SO₄ reakcijskog pufera, *rac-1*, NaN₃ i HheB2. U reaktore je otpipetiran potreban volumen *rac-1* i pufera te su reaktori zagrijani na tresilici 2 min, na 50 °C i 1000 okr/min. Nakon hlađenja, u reaktore je dodan potreban volumen otopine NaN₃ i reaktori su stavljeni na tresilicu na 25 °C i 1000 okr/min.

Po dodavanju enzima u reaktore pokrenuta je štoperica. Reakcije su redom zaustavljene nakon 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 sati. Cijeli sadržaj reaktora prebačen je u Amicon filtere prikazane na slici 18 i stavljen u centrifugu na 20 °C i 4500 okr/min u trajanju od 15 minuta. Iz filtera je uzeto 30 µL alikvota koji je analiziran spektrofotometrijskim testom niže opisanim u poglavlju [4.5.3](#).



Slika 18: Amicon® Ultra Centrifugal Filter, 10 kDa MWCO

4.5.2 TPGS-750-M

Pripremljeno je 7 reakcijskih smjesa ukupnog volumena 500 µL koje su se sastojale od 2 % TPGS-750-M reakcijskog medija, *rac-1*, NaN₃ i HheB2. U reaktore je otpipetiran potreban volumen *rac-1* i micelnog medija te su reaktori zagrijani na tresilici 2 min, na 50 °C i 1000 okr/min. Nakon hlađenja,

u reaktore je dodan potreban volumen otopine NaN_3 i reaktori su stavljeni na tresilicu na 25 °C i 1000 okr/min.

Po dodavanju enzima u reaktore pokrenuta je štoperica. Reakcije su redom zaustavljene nakon 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 sati te je cijeli sadržaj reaktora prebačen u Amicon filtere gdje je razrijeđen s 1950 μL Tris- SO_4 pufera ($c=200$ mM). Centrifugiranje je trajalo 30 minuta, na 20 °C i 4500 okr/min. Iz filtera je uzeto 100 μL alikvota koji je analiziran spektrofotometrijskim testom niže opisanim u poglavlju [4.5.3](#).

4.5.3 Spektrofotometrijski test

Aktivnost enzima određivana je spektrofotometrijskim testom, praćenjem apsorbancije uzorka pri valnoj duljini od 310 nm tijekom prvih 5 minuta reakcije. Za analizu je korišten spektrofotometar prethodno prikazan na slici 11 i softver *UVProbe*.

U čiste kivete otpipetirano je 998 μL Tris- SO_4 ($c=100$ mM) pufera i 2 μL PNSHH. Sadržaj je homogeniziran protresanjem i provjerena je apsorbancija tako pripremljene otopine koja mora iznositi između 0,6 i 0,7.

Kada je potvrđeno da apsorbancija otopine odgovara navedenim vrijednostima, u otopine je dodan uzorak enzima koji je zaostao u filterima nakon centrifugiranja. Čim je enzim dodan u uzorak, otopina je kratko homogenizirana protresanjem i započeto je spektrofotometrijsko mjerenje. Promjena apsorbancije u vremenu po dodatku enzima treba biti između 0,02 i 0,2/min.

4.6 Preliminarni test ponovne upotrebe micelnog medija

Kako bi se odredilo koliko je puta moguće reciklirati micelni medij, bilo je potrebno odrediti koliko dugo će konverzija supstrata i enantioselektivnost ostati na istoj razini tijekom ponovne upotrebe reakcijskog medija. Pripremljen je reaktor ukupnog volumena 792 μL , u kojem je koncentracija supstrata *rac-1* bila 100 mM, a čiji je sastav reakcijske smjese prikazan u tablici 15. U reaktor je otpipetiran zadani volumen TPGS-750-M, Tris- SO_4 i *rac-1*, nakon čega je reaktor kratko vorteksiran i stavljen na tresilicu 2 minute, na 50 °C i 1000 okr/min.

Tablica 15: Sastav reakcijske smjese za preliminarni test ponovne upotrebe micelnog medija

$V_{rac-1}, \mu\text{L}$	$V_{Tris-SO_4}, \mu\text{L}$ $c=200$ mM	$V_{TPGS-750-M}, \mu\text{L}$ $w=6$ %	$V_{NaN_3}, \mu\text{L}$ $c=1$ M	$V_{HheB2}, \mu\text{L}$
10	225	450	37	70

Kada se reakcijska smjesa ohladila, u reaktor je otpipetiran zadani volumen NaN_3 , sadržaj je kratko vorteksiran i stavljen na magnetsku miješalicu, na 25 °C pri 250 okr/min. Po dodavanju enzima u reaktor, pokrenuta je štoperica. Po završetku reakcije, nakon 2 sata, reakcija je zaustavljena dodatkom 2 mL etil acetata u reakcijsku smjesu. Gornji organski sloj odijeljen je kapaljkom i prebačen u Eppendorf epruvetu od 2 mL.

Uzeto je 30 μL alikvota iz Eppendorf epruvete, koji je ponovno razrijeđen s 1 mL etil acetata i osušen na bezvodnom Na_2SO_4 . Uzorak je analiziran koristeći Hydrodex g-DiMOM (25 m $\times$ 0,25 mm, Macherey-Nagel) kolonu, uz sljedeće uvjete: 100 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ do 130 $^{\circ}\text{C}$.

Kako bi se izolirao preostali supstrat i produkt iz otopine micela, reakcijska smjesa ekstrahirana je još četiri puta s 2 mL etil acetata. Nakon dodavanja etil acetata, reaktor je stavljen u centrifugu, na 60 sekundi, 20 $^{\circ}\text{C}$ i 11000 okr/min. Gornji organski sloj odvojen je i bačen nakon svakog ciklusa ekstrakcije.

Nakon svih ciklusa ekstrakcije, reaktor s preostalim micelarnim medijem uparen je na rotacijskom vakuumskom uparivaču kako bi se uklonio zaostao etil acetat. Uparavanje je trajalo 20 minuta, a uređaj koji je korišten za uparavanje prikazan je na slici 19.

Kada je uparavanje završeno, reakcija je ponovno pokrenuta u istoj otopini micela dodatkom 10 μL *rac-1* i 70 μL HheB2 u reaktor. Cijeli postupak analize, izolacije supstrata i produkta iz otopine micela, uklanjanja etil acetata i ponovnog pokretanja reakcije ponavljen je na isti način još dva puta.



Slika 19: Büchi Rotavapor RE 111

4.7 Procjena parametara

Kinetički parametri procijenjeni su nakon eksperimentalnih mjerenja pomoću programskog paketa MATLAB (R2022b), korištenjem dvosupstratnog Michaelis-Menteničinog modela. Procijenjeni su sljedeći kinetički parametri: V_m , K_{m1} , K_{m2} , K_i , K_{ip} , i k_d . Jednadžbe korištene za procjenu kinetičkih parametara prikazane su u tablici 16.

Tablica 16: Modeli korišteni za procjenu kinetičkih parametara

Model: Michaelis-Meteničina dvosupstratna kinetika uz prisutnu inhibiciju supstratom	$r = \frac{(V_m \cdot c_1 \cdot c_2)}{\left(K_{m1} + c_1 + \frac{c_1^2}{K_i}\right) \cdot (K_{m2} + c_2)}$
Model: Michaelis-Meteničina dvosupstratna kinetika uz prisutnu inhibiciju supstratom i produktom	$r = \frac{(V_m \cdot c_1 \cdot c_2)}{\left(K_{m1} \cdot \left(1 + \frac{c_p}{K_{ip}}\right) + c_1 + \frac{c_1^2}{K_i}\right) \cdot (K_{m2} + c_2)}$
Model: kinetika prvog reda	$\frac{d\gamma_{HheB2}}{dt} = -k_d \cdot \gamma_{HheB2}$

Konstanta V_m predstavlja maksimalnu brzinu reakcije koja se postiže kada su sva aktivna mjesta u strukturi enzima zasićena supstratom.

Michaelisova konstanta, K_m , numerički izražava afinitet enzima prema supstratu i jednaka je koncentraciji supstrata pri kojoj brzina reakcije iznosi polovicu maksimalne brzine. Što je navedena vrijednost niža to je afinitet enzima prema supstratu veći, a reakcija će puno prije doseći maksimalnu brzinu i pri nižim koncentracijama supstrata.

Konstanta inhibicije, K_i , predstavlja koncentraciju inhibitora pri kojoj je aktivnost enzima smanjena za pola i kvantificira jačinu inhibicijskog djelovanja neke tvari.

Konstanta deaktivacije, k_d , direktno je povezana s operacijskom stabilnosti enzima jer govori o brzini kojom enzim gubi svoju aktivnost tijekom vremena. Što je konstanta deaktivacije niža, to će enzim dulje ostati aktivan.

5 Rezultati i rasprava

U ovom radu proučavana je reakcija azidolize 2-benzil-2-metiloksirana katalizirana enzimom HheB2 ([Shema 2](#)). U tu svrhu pripremljen je i pročišćen enzim HheB2 te je njegova čistoća potvrđena elektroforezom. Reakcija azidolize provedena je u puferu te u micelarnom mediju koji se sastoji od TPGS-750-M surfaktanta u koncentraciji 2 % v/v. Ispitan je utjecaj koncentracije supstrata i nukleofila te produkta na aktivnost enzima u puferu te dodatno utjecaj koncentracije supstrata na aktivnost enzima u micelarnom mediju. Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka, procijenjeni su i kinetički parametri.

Provedena su i mjerenja praćenja aktivnosti enzima tijekom provedbe reakcije u svrhu određivanja operacijske stabilnosti enzima u puferu i micelarnom mediju. Dodatno je proveden i preliminarni test ponovne upotrebe 2 % TPGS-750-M koji je dosta skup te je zbog toga potrebno istražiti je li ga moguće višestruko koristiti.

5.1 Elektroforeza

Elektroforeza je elektroanalitička separacijska metoda visoke rezolucije koja razdvaja proteine na temelju naboja, omjera naboja i mase ili veličine i oblika. Proteini se razdvajaju pod utjecajem relativno velikog gradijenta napona, prema različitim brzinama putovanja kroz otopinu. SDS-PAGE elektroforeza, koja je korištena u ovom radu, je najčešće upotrebljavana tehnologija za postizanje analitičke separacije visoke rezolucije kod analiza smjesa proteina, a uglavnom se koristi za procjenu čistoće proteina i evaluaciju ekspresije proteina (Nowakowski i sur., 2014; Gallagher i Wiley, 2021).

SDS-PAGE elektroforezom analizirani su različiti enzimi HHDH proizvedeni u Laboratoriju za stereoselektivnu sintezu i biokatalizu na Institutu Ruđer Bošković. Rezultati elektroforeze prikazani su na slici 20. Uzorak proteina proizvedenog u sklopu ovog rada označen je zelenim pravokutnikom. Uspješna ekspresija proteina potvrđena je prisutnošću različitih linija očekivane molekulske mase u stupcima uzorka. Krajnji lijevi stupac je referentni stupac na koji je nanesen proteinski marker koji pokazuje put proteina poznate molekulske mase po gelu.

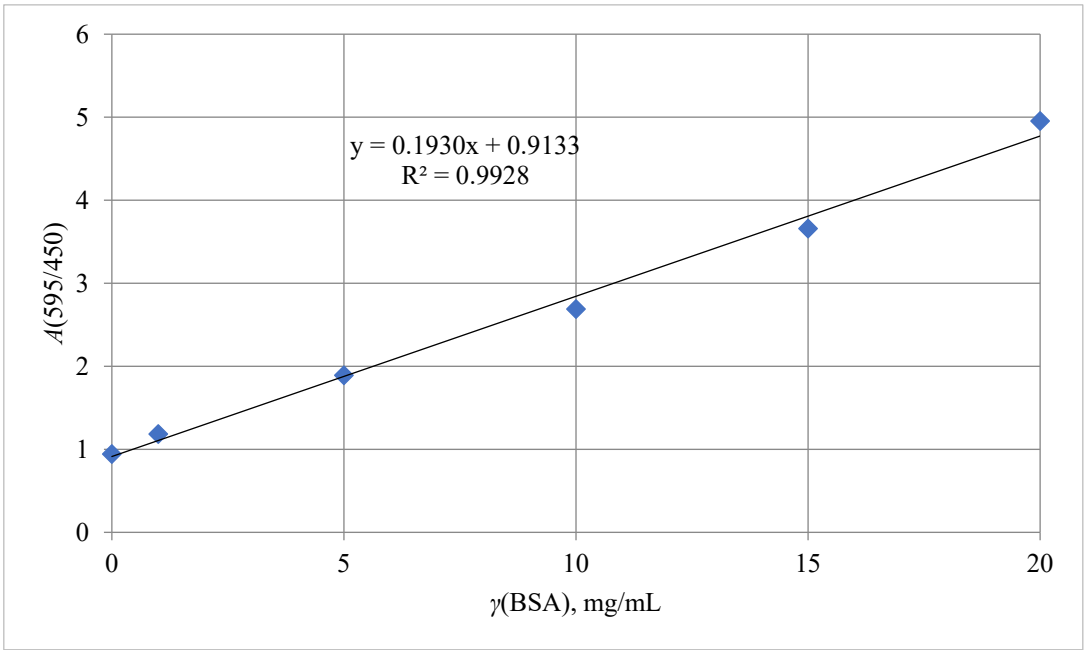


Slika 20: SDS-PAGE elektroforeza. Uzorak proteina proizvedenog u sklopu ovog rada označen je zelenim pravokutnikom

5.2 Bradfordov test

Test po Bradfordu je brza i osjetljiva metoda koja se upotrebljava za određivanje koncentracije proteina, a temelji se na pomaku maksimuma apsorpcije CBB boje s 450 na 595 nm. CBB boja veže se na proteine, a učinkovitost kojom će se boja vezati za proteine ovisi o njihovom aminokiselinskom sastavu (Rekowski i sur., 2021).

Izrađuje se baždarni pravac koristeći otopine proteina poznate koncentracije kao standarde, a koncentracija nepoznatog proteina računa se pomoću izmjerenog omjera apsorbancije 595/450 i dobivene jednadžbe pravca. Za pripremu standardnih otopina najčešće se koristi BSA, koji je korišten i u ovom radu. Slika 21 prikazuje baždarni pravac dobiven testom po Bradfordu. Tablica 17 prikazuje koncentraciju proizvedenog enzima.



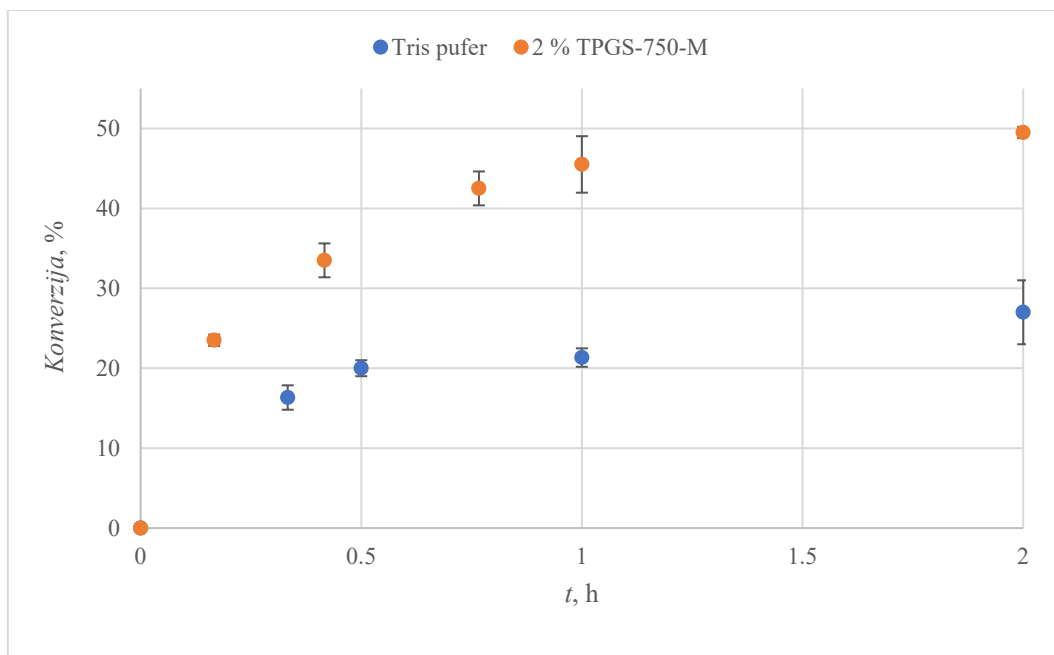
Slika 21: Baždarni pravac dobiven testom po Bradfordu

Tablica 17: Koncentracija HheB2 određena testom po Bradfordu

Tip enzima	Koncentracija, mg/mL
HheB2	3,78

5.3 Provedba reakcije u puferu i micelarnom mediju

Promatrana je reakcija azidolize ([Shema 2](#)) u kojoj je pretpostavljeno da dolazi do inhibicije enzima supstratom, 2-benzil-2-metiloksiranom (*rac*-1) te da je inhibiciju moguće smanjiti upotrebom micelnog reakcijskog medija. Tijek ove reakcije praćen je u 200 mM Tris-SO₄ i 2 % TPGS-750-M pri čemu su svi reakcijski uvjeti osim reakcijskog medija držani konstantnim. Rezultati dobiveni na temelju eksperimentalnog praćenja tijeka reakcije prikazani su na slici 22.

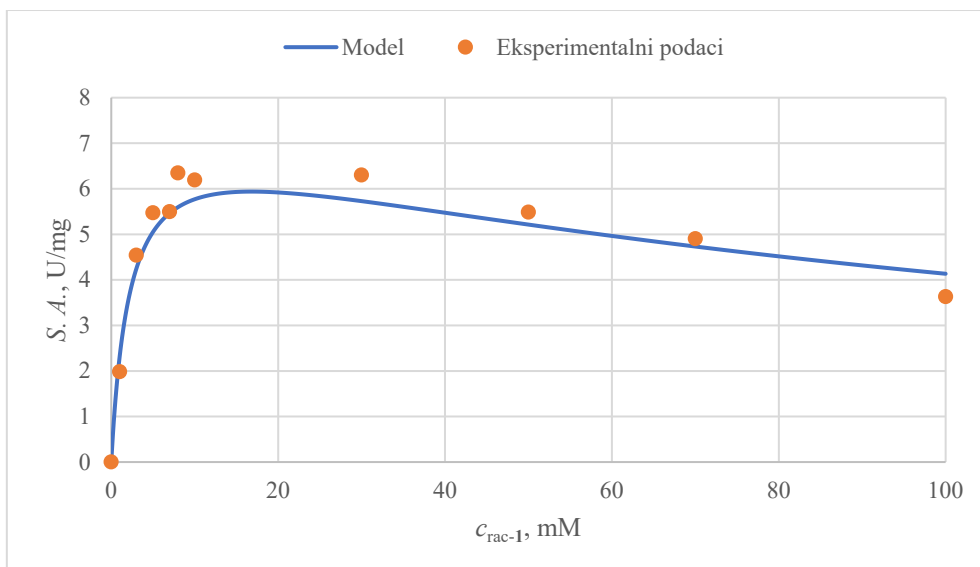


Slika 22: Usporedba tijeka reakcije azidolize *rac-1* katalizirane enzimom HheB2 u puferu i micelarnom mediju. Reakcijski uvjeti: $c_{rac-1}=100$ mM, $c_{NaN_3}=55$ mM, $\gamma_{HheB2}=0,529$ mg/mL, $V_r=500$ μ L, 25 °C, 250 okr/min

Konverzija *rac-1* praćena je kroz period od 2 sata. Na samom početku reakcije, nakon 20 min, konverzija *rac-1* u puferu iznosi 16 %, a nakon 2 sata iznosi 27 %, dok u micelarnom mediju na početku, nakon 10 min, iznosi 24 %, a nakon 2 sata dostiže 50 %. S obzirom na to da su svi reakcijski uvjeti osim reakcijskog medija držani konstantnima, značajno povećanje konverzije sugerira da TPGS-750-M pruža povoljnije uvjete za katalizator HheB2 i time smanjuje njegovu inhibiciju ostalim molekulama prisutnim u reakcijskoj smjesi.

5.4 Kinetika reakcije azidolize u puferu

Specifična aktivnost enzima je mjera katalitičke aktivnosti i čistoće enzima, koja se definira kao količina produkta nastalog u vremenu po mg enzima prisutnog u reakcijskoj smjesi i vrlo je korisna za usporedbu katalitičke učinkovitosti enzima u drugačijim reakcijskim uvjetima. Ovisnost specifične aktivnosti enzima u puferu kao reakcijskom mediju o koncentraciji supstrata *rac-1* dobivena eksperimentalnim mjerenjima prikazana je na slici 23.



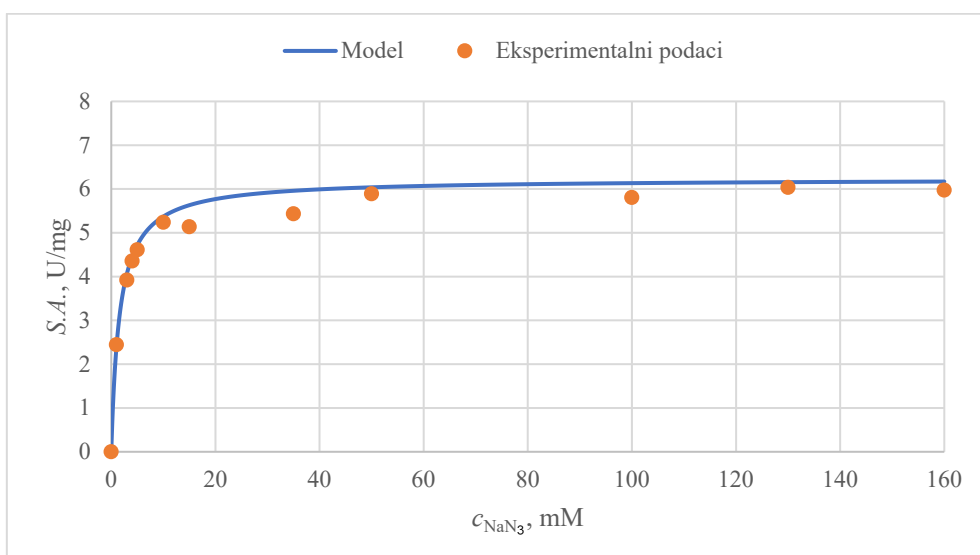
Slika 23: Ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentraciji epoksida *rac-1*. Reakcijski uvjeti:

$V_r=1$ mL, 200 mM Tris- SO_4 , pH 7,5, 25 °C, DMSO 5 % v/v, 1000 okr/min, $c_{\text{NaN}_3}=20$ mM,

$\gamma_{\text{HheB2}}=0,038$ mg/mL

Smanjenje aktivnosti enzima nakon dosegnutog maksimuma ukazuje na to da nakon određene koncentracije supstrata dolazi do inhibicije enzima, zbog čega njegova specifična aktivnost opada. Svi reakcijski uvjeti osim koncentracije *rac-1* održavani su konstantnima prilikom ovih mjerenja. Vidljivo je da se specifična aktivnost povećava povećanjem koncentracije *rac-1* i dostiže svoj maksimum pri koncentracijama supstrata od oko 10 mM, nakon čega opada. Pad specifične aktivnosti enzima ukazuje da pri višim koncentracijama epoksida dolazi do inhibicije HheB2 supstratom.

Ispitan je i utjecaj koncentracije nukleofila (slika 24) i produkta reakcije (slika 25) na specifičnu aktivnost HheB2 enzima. Specifična aktivnost enzima određena je u rasponu koncentracija NaN_3 od 0 do 160 mM, a rezultati su prikazani na slici 24.



Slika 24: Ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentraciji NaN_3 . Reakcijski uvjeti: $V_r=1$ mL,

200 mM Tris- SO_4 , pH 7,5, 25 °C, DMSO 5 % v/v, 1000 okr/min, $c_{\text{rac-1}}=10$ mM, $\gamma_{\text{HheB2}}=0,038$ mg/mL

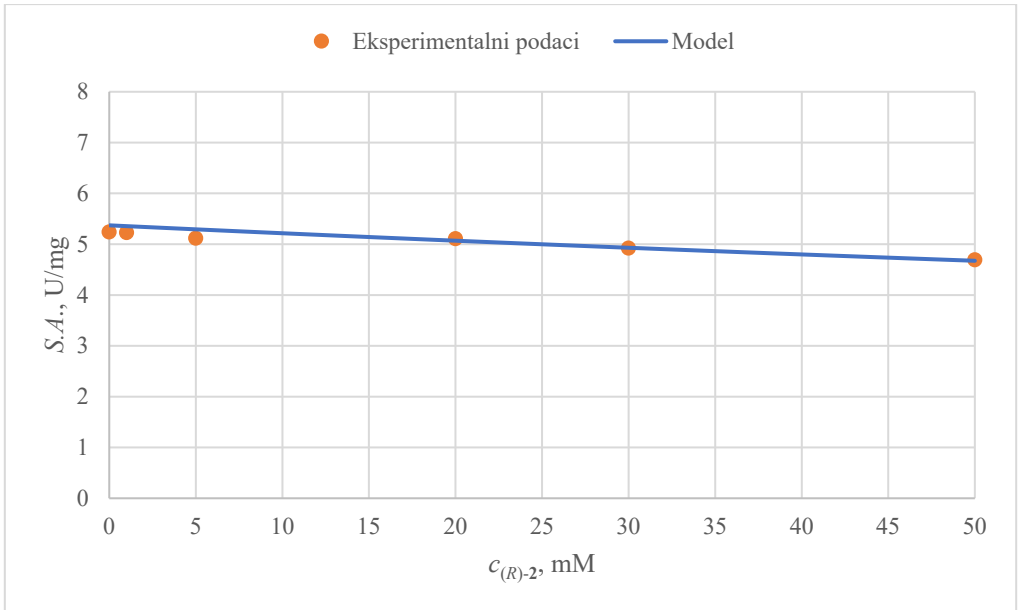
Trend na slici 25 pokazuje da specifična aktivnost enzima raste s porastom koncentracije NaN₃ do koncentracija 20-30 mM, nakon čega stagnira. Graf prikazuje tipičnu Michaelis-Menteničinu krivulju ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata. Prema tome, može se zaključiti da se natrijev azid ne ponaša kao inhibitor u promatranom reakcijskom sustavu.

Kinetički parametri procijenjeni na temelju prikazanih rezultata navedeni su u tablici 18. Malo niža vrijednost K_{m2} upućuje na to da HheB2 pokazuje nešto veći afinitet prema NaN₃ nego prema *rac*-1.

Tablica 18: Procijenjeni kinetički parametri u reakciji s prisutnom inhibicijom enzima HheB2 supstratom u puferu

Reakcijski medij	V_m , U/mg	K_{m1} , mM	K_{m2} , mM	K_i , mM
200 mM Tris-SO ₄	8,14 ± 0,52	2,26 ± 0,54	1,60 ± 0,26	125,00 ± 28,78

Rezultati dobiveni ispitivanjem utjecaja produkta na aktivnost enzima prikazani su na slici 26. Specifična aktivnost enzima HheB2 blago opada povećanjem koncentracije azido alkohola u reakcijskoj smjesi, što upućuje na inhibicijsko djelovanje (*R*)-2.



Slika 25: Ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentraciji azido alkohola (*R*)-2. Reakcijski uvjeti: V_r =1 mL, 200 mM Tris-SO₄, pH 7,5, 25 °C, DMSO 5 % v/v, 1000 okr/min, c_{rac-1} =10 mM, c_{NaN_3} =20 mM, γ_{HheB2} =0,038 mg/mL

Procijenjena vrijednost K_{ip} dana je u tablici 19. Tijekom procjene K_{ip} korištene su fiksne V_m , K_{m1} , K_{m2} i K_i vrijednosti, prethodno prikazane u tablici 18. Dobivena vrijednost konstante inhibicije K_{ip} potvrđuje da i produkt inhibira enzim.

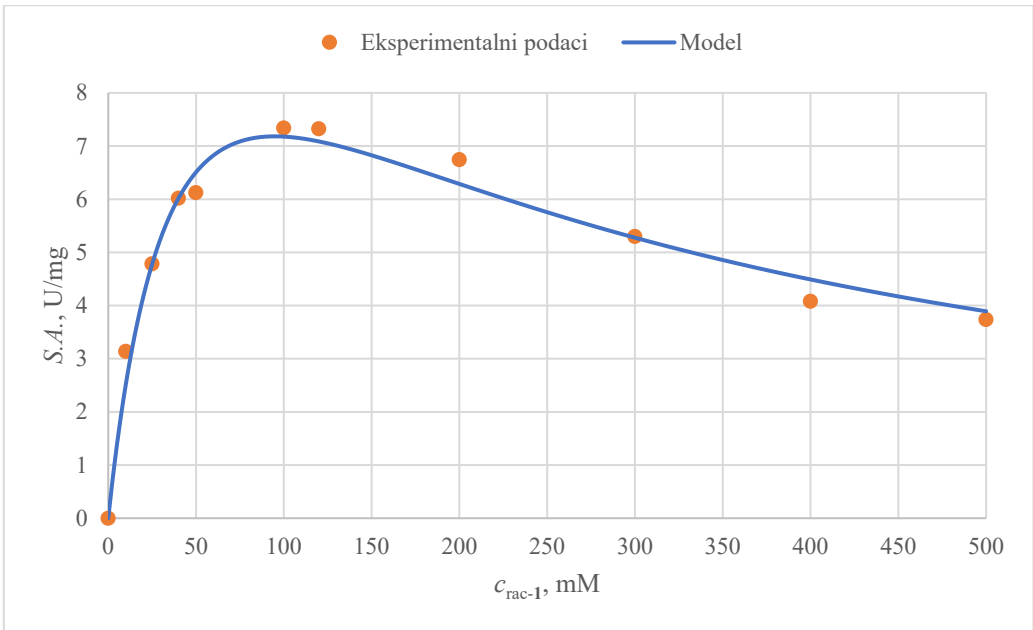
Tablica 19: Procijenjen kinetički parametar inhibicije enzima HheB2 produktom reakcije

Reakcijski medij	K_{ip} , mM
200 mM Tris-SO ₄	57,94 ± 16,80

Vrijednost K_i za supstrat iznosi 125 mM, što znači da će pri toj koncentraciji brzina reakcije pasti na polovicu maksimalne brzine (V_m). Slično tome, K_i za produkt iznosi 58 mM, što ukazuje na to da će nakupljanje produkta u sustavu također usporiti reakciju. Stoga je poželjno provoditi reakciju pri nižim koncentracijama supstrata i produkta ili koristiti kontinuirani reaktorski sustav s *in situ* odvajanjem produkta, poput membranskog reaktora, kako bi se spriječila odnosno smanjila inhibicija.

5.5 Kinetika reakcije azidolize u micelarnom mediju

Ovisnost specifične aktivnosti enzima u 2 % TPGS-750-M kao reakcijskom mediju o koncentraciji supstrata *rac-1* prikazana je na slici 26. Svi reakcijski uvjeti osim koncentracije *rac-1* održavani su konstantnima te su isti kao u odgovarajućim mjerenjima u kojima je kao reakcijski medij korišten pufer Tris-SO₄.



Slika 26: Ovisnost specifične aktivnosti HheB2 o koncentraciji *rac-1* u micelarnom mediju. Reakcijski uvjeti: V_r =1 mL, 2 % TPGS-750-M, pH 7,5, 25 °C, DMSO 5 % v/v, 1000 okr/min, c_{NaN_3} =20 mM, γ_{HheB2} =0,038 mg/mL

Kada je korišten TPGS-750-M kao reakcijski medij, maksimum aktivnosti enzima je pomaknut prema većim koncentracijama *rac-1* (70-100 mM) što potvrđuje da micelarni medij pruža bolje uvjete za enzim. Kinetički parametri procijenjeni na temelju eksperimentalnih rezultata prikazani su u tablici 20. S obzirom da je prethodno pokazano da se NaN₃ ne ponaša kao inhibitor u promatranom reakcijskom sustavu, a pretpostavka je da se zadržava u vodenoj fazi, tijekom procjene parametara u micelarnom mediju korištena je ranije procijenjena vrijednost parametra K_{m2} iz mjerenja u puferu (5.4).

Tablica 20: Procijenjeni kinetički parametri u reakciji s prisutnom inhibicijom enzima HheB2 supstratom u micelarnom mediju

Reakcijski medij	V_m , U/mg	K_{m1} , mM	K_{m2} , mM	K_i , mM
2 % TPGS-750-M	$15,17 \pm 2,23$	$45,29 \pm 12,17$	$1,60 \pm 0,26$	$198,66 \pm 50,92$

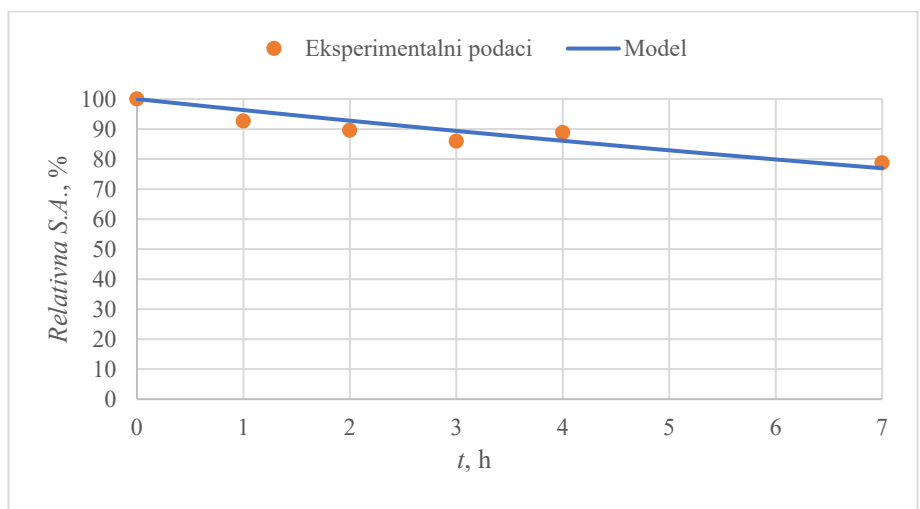
Viša vrijednost V_m u micelarnom mediju u odnosu na pufer ukazuje da reakcija može doseći više brzine reakcije prije nego se enzim zasiti sa supstratom, što potvrđuje pozitivan utjecaj micelnog medija na aktivnost enzima. Dodatno, viša vrijednost ove konstante upućuje na to da prijenos supstrata iz micelnog okruženja do aktivnog mjesta enzima nije ograničavajući čimbenik, odnosno difuzija ne predstavlja problem.

Povećane vrijednosti K_{m1} konstante u micelarnom mediju mogu se pripisati mogućim promjenama u dostupnosti supstrata, njegovoj topljivosti i različitoj interakciji s HheB2 zbog micelarne strukture TPGS-750-M unutar vodenog medija. Pretpostavka je da se supstrat *rac-1* nalazi u hidrofobnim micelama, čime se smanjuje njegova efektivna koncentracija u vodenoj fazi.

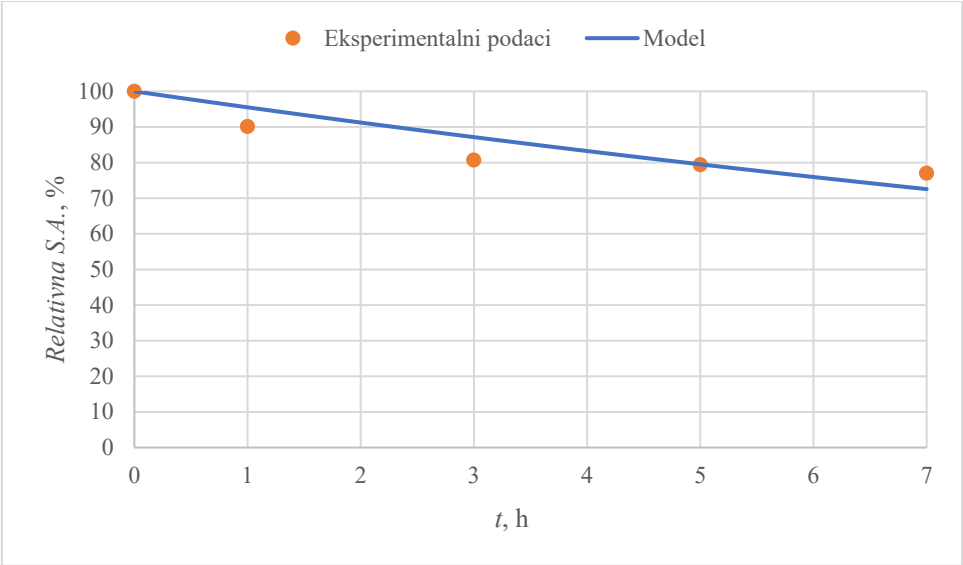
Viša vrijednost konstante inhibicije, K_i , ukazuje da je u micelarnom mediju reakciju moguće provoditi s višim koncentracijama supstrata (198,66 mM u micelarnom mediju u usporedbi sa 125,00 mM u puferu) prije nego se enzimska aktivnost smanji za pola. U micelarnom mediju, enzim može tolerirati veće koncentracije supstrata prije nego što dođe do inhibicije. Navedeno upućuje da micelarni medij pogoduje smanjenju inhibicije HheB2 supstratom.

5.6 Usporedba operacijske stabilnosti enzima u puferu i micelarnom mediju

Rezultati dobiveni promatranjem operacijske stabilnosti HheB2 u Tris-SO₄ i TPGS-750-M prikazani su na slikama 27 i 28. U oba slučaja, specifična aktivnost enzima postupno se smanjuje tijekom vremena, ali u micelarnom mediju postiže više vrijednosti tijekom cijelog trajanja reakcije.



Slika 27: Operacijska stabilnost enzima tijekom inkubacije u reakcijskom sustavu s Tris-SO₄ reakcijskim medijem. Reakcijski uvjeti: V_r =500 μ L, 200 mM Tris-SO₄, pH 7,5, 25 $^{\circ}$ C, DMSO 5 % v/v, 1000 okr/min, c_{rac-1} =10 mM, c_{NaN_3} =20 mM, γ_{HheB2} =0,227 mg/mL



Slika 28: Operacijska stabilnost enzima tijekom inkubacije u reakcijskom sustavu s TPGS-750-M reakcijskim medijem. Reakcijski uvjeti: $V_r=500\text{ }\mu\text{L}$, 2 % TPGS-750-M, pH 7,5, 25 °C, DMSO 5 % v/v, 1000 okr/min, $c_{rac-1}=10\text{ mM}$; $c_{NaN_3}=20\text{ mM}$, $\gamma_{HheB2}=0,227\text{ mg/mL}$)

Stabilnost enzima određuje koliko dugo će on ostati aktivan u određenim reakcijskim uvjetima. Procijenjene konstante deaktivacije prikazane su u tablici 21.

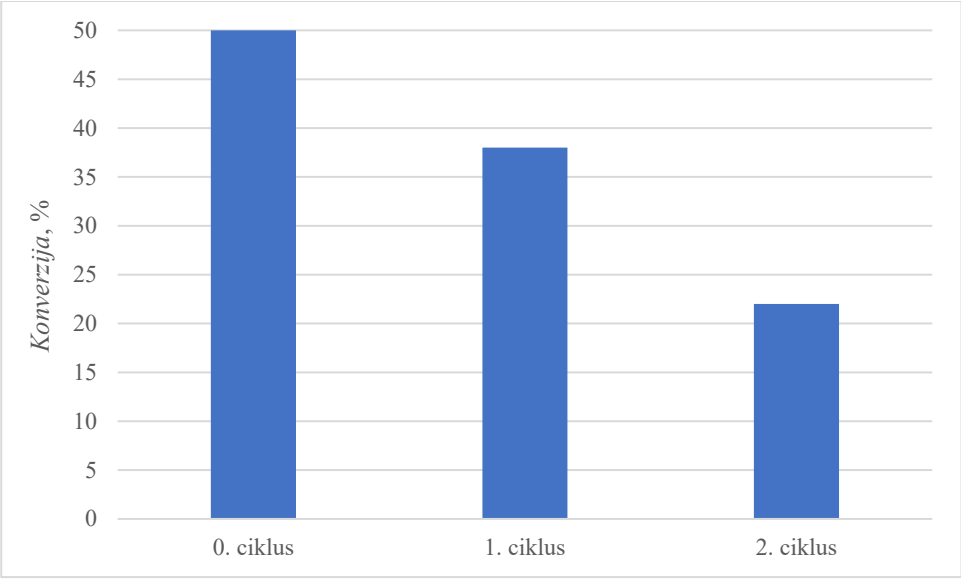
Tablica 21: Procijenjene vrijednosti konstante deaktivacije

Reakcijski medij	k_d, d^{-1}	$t_{1/2}, d^{-1}$
200 mM Tris-SO ₄	$0,90 \pm 0,20$	0,77
2 % TPGS-750-M	$1,10 \pm 0,32$	0,63

Iako je vrijeme poluraspada $t_{1/2}$ nešto niže u micelarnom mediju, važno je u obzir uzeti povećanu aktivnost enzima u TPGS-750-M. Prednosti koje pruža micelarni medij u kontekstu povećanja specifične aktivnosti enzima i smanjenja inhibicije enzima supstratom uvelike nadmašuju neznatno smanjenu operacijsku stabilnost u odnosu na pufer kao reakcijski medij.

5.7 Preliminarni test ponovne upotrebe micelnog medija

Nakon provedbe prve reakcije, micelarni medij je ponovno upotrjebljen još dva puta. Konverzija *rac-1* je nakon svakog ciklusa ponovne upotrebe bila smanjena za 12-16 % (slika 29). Iako su rezultati obećavajući i upućuju na to da je ponovna upotreba micelnog medija moguća bez značajnog utjecaja na učinkovitost samog procesa, navedeno je potrebno ispitati na većoj skali.



Slika 29: Preliminarni test ponovne upotrebe micelarnog medija

6 Zaključak

Rezultati prikazani u ovom radu potvrdili su da u reakciji azidolize epoksida 2-benzil-2-metiloksirana, kataliziranoj enzimom HheB2, epoksid inhibira djelovanje enzima. Nukleofil, NaN_3 , ne utječe na aktivnost enzima i ne ponaša se kao inhibitor, dok se produkt reakcije, azido alkohol 1-azido-2-metil-3-fenilpropan-2-ol, ponaša kao inhibitor.

Upotreba micelnog medija (2 % TPGS-750-M) omogućuje postizanje viših konverzija supstrata, povećava maksimalnu specifičnu aktivnost enzima i umanjuje inhibiciju enzima supstratom, što potvrđuju više vrijednosti kinetičkih parametara V_m (200 mM Tris- SO_4 $8,14 \pm 0,52$ U/mg; 2 % TPGS-750-M $15,17 \pm 2,23$ U/mg) i K_i (200 mM Tris- SO_4 $125,00 \pm 28,78$ mM; 2 % TPGS-750-M $198,66 \pm 50,92$ mM). Povećanje K_m vrijednosti za supstrat koji se ponaša kao inhibitor upućuje da micelarni medij može utjecati na dostupnost supstrata, čime mijenja afinitet enzima. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se micelarni reakcijski mediji mogu upotrijebiti za poboljšanje katalitičke učinkovitosti enzima u promatranom reakcijskom sustavu te se, uz daljnja ispitivanja, može koristiti kao potencijalna optimizacijska strategija u sustavima gdje inhibicija enzima supstratom predstavlja izazov. Osim toga, micelarno okruženje znatno poboljšava topljivost hidrofobnih organskih supstrata, što je inače jedno od glavnih ograničenja enzimskih reakcija u vodenom mediju.

Mjerenja operacijske stabilnosti upućuju na to da je operacijska stabilnost HheB2 enzima nešto lošija u micelarnom mediju nego u puferu (200 mM Tris- SO_4). Usprkos tome, treba uzeti u obzir da iako je k_d nešto viša kada se kao reakcijski medij koristi TPGS-750-M, njeno povećanje je zanemarivo u odnosu na velike prednosti koje pruža upotreba micelnog reakcijskog medija u kontekstu smanjenja inhibicije enzima supstratima i povećanja njegove aktivnosti.

TPGS-750-M za enzim HheB2 stvara bolju reakcijsku okolinu i reakcijske uvjete te značajno umanjuje njegovu inhibiciju supstratima reakcije, najvjerojatnije zahvaljujući efektu rezervoara. Prednosti koje pruža upotreba micelnog reakcijskog medija svakako treba iskoristiti kada je potrebno povećati aktivnost enzima i smanjiti inhibiciju, osobito kada se upotrebljavaju visoke koncentracije supstrata. Primjena micelnog medija može biti ključna za optimizacije procesa koji koriste reakcije katalizirane enzimima, kako u laboratorijskoj primjeni, tako i na višim razinama.

7 Literatura

1. *Adrio J. L., Demain A. L.*, Microbial enzymes: tools for biotechnological processes, *Biomolecules*, **4** (2014), 117-139.
2. *Akoh C. C., Chang S. W., Lee G. C., Shaw J. F.*, Biocatalysis for the production of industrial products and functional foods from rice and other agricultural produce, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56** (2008), 10445-10451.
3. *Alcántara A. R., Domínguez de María P., Littlechild J. A., Schürmann M., Sheldon R. A., Wohlgemuth R.*, Biocatalysis as key to sustainable industrial chemistry, *ChemSusChem*, **15** (2022), e202102709.
4. *Andersson M. P., Gallou F., Klumphu P., Takale B. S., Lipshutz B. H.*, Structure of nanoparticles erived from designer surfactant TPGS-750-M in water at room temperature, *Chemistry – A European Journal*, **24** (2018), 6778–6786
5. *Arbige M. V., Shetty J. K., Chotani G. K.*, Industrial enzymology: the next chapter, *Trends in Biotechnology*, **37** (2019), 1355-1366.
6. *Basso A., Serban S.*, Industrial applications of immobilized enzymes: A review, *Molecular Catalysis*, **479** (2019), 110607
7. *Benison C. H., Payne P. R.*, Manufacturing mass intensity: 15 years of process as intensity and development of the metric into plant cleaning and beyond, *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, **5** (2022), 100229.
8. *Bornscheuer U. T., Huisman G. W., Kazlauskas R. J., Lutz S., Moore J. C., Robins K.*, Engineering the third wave of biocatalysis, *Nature*, **485** (2012), 185-194
9. *Brals J., Smith J. D., Ibrahim F., Gallou F., Handa S.*, Micelle-enabled palladium catalysis for convenient sp²-sp³ coupling of nitroalkanes with aryl bromides in water under mild conditions, *ACS Catalysis*, **7** (2017), 7245-7250.
10. *Buchholz K., Bornscheuer U. T.*, Enzyme technology: history and current trends, *Applied Bioengineering: Innovations and Future Directions*, (2017), 11-46.
11. *Calcaterra A., D’Acquarica I.*, The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **147** (2018), 323-340.
12. *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, *Chemical Communications*, **46** (2010), 898-900.
13. *Cao Y., Li X., Ge J.*, Enzyme catalyst engineering toward the integration of biocatalysis and chemocatalysis, *Trends in Biotechnology*, **39** (2021), 1173-1183.

14. Cortes-Clerget M., Akporji N., Zhou J., Gao F., Guo P., Parmentier M., Gallou F., Berthon J. Y., Lipshutz B. H., Bridging the gap between transition metal-and bio-catalysis via aqueous micellar catalysis, *Nature Communications*, **10** (2019), 2169.
15. Cortes-Clerget M., Yu J., Kincaid J. R., Walde P., Gallou F., Lipshutz B. H., Water as the reaction medium in organic chemistry: from our worst enemy to our best friend, *Chemical Science*, **12** (2021), 4237-4266.
16. Dandapani S., Rosse G., Southall N., Salvino J. M., Thomas C. J., Selecting, acquiring, and using small molecule libraries for high-throughput screening, *Current Protocols in Chemical Biology*, **4** (2012), 177-191.
17. de Carvalho C. C., Whole cell biocatalysts: essential workers from Nature to the industry, *Microbial Biotechnology*, **10** (2017), 250-263.
18. 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, *Journal of Bacteriology*, **188** (2006), 4051-4056.
19. de Miranda A. S., Miranda L. S., de Souza R. O., Lipases: Valuable catalysts for dynamic kinetic resolutions, *Biotechnology Advances*, **33** (2015), 372-393.
20. Devine P. N., Howard R. M., Kumar R., Thompson M. P., Truppo M. D., Turner N. J., Extending the application of biocatalysis to meet the challenges of drug development, *Nature Reviews Chemistry*, **2** (2018), 409-421.
21. Dokli I., Milčić N., Marin P., Miklenić M. S., Sudar M., Tang L., Findrik Blažević Z., Majerić Elenkov M., Halohydrin dehalogenase-catalysed synthesis of fluorinated aromatic chiral building blocks, *Catalysis Communications*, **152** (2021), 106285.
22. Dowden H., Munro J., Trends in clinical success rates and therapeutic focus, *Nature Reviews Drug Discovery*, **18** (2019), 495-496.
23. Dvorak P., Bidmanova S., Damborsky J., Prokop Z., Immobilized synthetic pathway for biodegradation of toxic recalcitrant pollutant 1, 2, 3-trichloropropane, *Environmental Science & Technology*, **48** (2014), 6859-6866.
24. Dyson P. J., Jessop P. G., Solvent effects in catalysis: rational improvements of catalysts via manipulation of solvent interactions, *Catalysis Science & Technology*, **6** (2016), 3302-3316.
25. Erdem E., Woodley J. M., Industrially useful enzymology: Translating biocatalysis from laboratory to process, *Chem Catalysis*, **2** (2022), 2499-2505.
26. Faber K., Kroutil W., New enzymes for biotransformations, *Current Opinion in Chemical Biology*, **9** (2005), 181-187.
27. Fasim A., More V. S., More S. S., Large-scale production of enzymes for biotechnology uses, *Current Opinion in Biotechnology*, **69** (2021), 68-76.

28. Findrik Blažević Z., Milčić N., Sudar M., Majerić Elenkov M., Halohydrin dehalogenases and their potential in industrial application—a viewpoint of enzyme reaction engineering, *Advanced Synthesis & Catalysis*, **363** (2021), 388-410.
29. Firestone J. A., Gospe Jr S. M., Organic solvents, In *Clinical Neurotoxicology* (pp. 401-414). WB Saunders, (2009)
30. Gallagher S. R., Wiley E. A., (Eds.) *Current protocols essential laboratory techniques*, John Wiley & Sons, (2012)
31. Gallou F., Lipshutz B. H., *Organometallics in process chemistry*, *Topics in Organometallic Chemistry*, (2019), 199-216.
32. Gallou F., Sustainability as a Trigger for Innovation!, *Chimia*, **74** (2020), 538-538.
33. Grodowska K., Parczewski A., *Organic solvents in the pharmaceutical industry*, (2010)
34. Gupta M. N., Enzyme function in organic solvents, *European Journal of Biochemistry*, **203** (1992), 25-32.
35. Haak R. M., Tarabiono C., Janssen D. B., Minnaard A. J., De Vries J. G., Feringa B. L., Synthesis of enantiopure chloroalcohols by enzymatic kinetic resolution, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **5** (2007), 318-323.
36. Hanefeld U., Hollmann F., Paul C. E., Biocatalysis making waves in organic chemistry, *Chemical Society Reviews*, **51** (2022), str. 594-627
37. Hansen B. B., Spittle S., Chen B., Poe D., Zhang Y., Klein J. M., Horton A., Adhikari L., Zelovich T., Doherty B. W., Gurkan B., Maginn E. J., Ragauskas A., Dadmun M., Zawodzinski T. A., Baker G. A., Tuckerman, M. E., Savinell R. F., Sangoro J. R., Deep eutectic solvents: A review of fundamentals and applications, *Chemical Reviews*, **121** (2020), 1232-1285.
38. Hasnaoui-Dijoux G., Majeric Elenkov M., Lutje Spelberg J. H., Hauer B., Janssen D. B., Catalytic promiscuity of halohydrin dehalogenase and its application in enantioselective epoxide ring opening, *ChemBioChem*, **9** (2008), 1048-1051.
39. 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.
40. Hauer B., Embracing Nature's Catalysts: A Viewpoint on the Future of Biocatalysis, *ACS Catalysis*, **10** (2020), str. 8418-8427
41. Hinkson I. V., Madej B., Stahlberg E. A., Accelerating therapeutics for opportunities in medicine: a paradigm shift in drug discovery, *Frontiers in pharmacology*, **11** (2020), 770.
42. Hoang H. N., Matsuda T., Biotransformation using liquid and supercritical CO₂, In *Future Directions in Biocatalysis* (pp. 3-25), Elsevier, (2017)
43. Huffman M. A., Fryszkowska A., Alvizo O., Borra-Garske M., Campos K. R., Canada K. A., Devine N. P., Forstater J. H., Grosser S. T., Hughes G. J., Duan D., Halsey H. M., Jo J., Joyce L. A., Kolev J. N., Liang J., Maloney K. M., Mann B. F., Marshall N. M., McLaughlin M., Moore J. C., Murphy G. S., Nawrat C. C., Nazor J., Novick S., Patel N. R., Rodriguez-Granillo A.,

- Robaire S. A., Sherer E. C., Truppo, M. D., Whittaker A. M., Verma D., Xiao L., Xu Y., Yang H., Design of an in vitro biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir, Science, 366 (2019), 1255-1259.*
44. *Illanes A., Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications, Springer, Valparaíso, 2008., 2, 4, 12, 24, 61*
 45. *Illanes A., Wilson L., Vera C., Problem solving in enzyme biocatalysis, John Wiley & Sons, Ltd., United Kingdom, 2013.*
 46. *Janssen D. B., Dinkla I. J., Poelarends G. J., Terpstra P., Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities, Environmental Microbiology, 7 (2005), 1868-1882.*
 47. *Jemli S., Ayadi-Zouari D., Hlima H. B., Bejar S., Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes, Critical Reviews in Biotechnology, 36 (2016), 246-258.*
 48. *Jiang W., Fang B., Synthesizing chiral drug intermediates by biocatalysis, Applied Biochemistry and Biotechnology, 192 (2020), 146-179.*
 49. *Kapoor S., Rafiq A., Sharma S., Protein engineering and its applications in food industry, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57 (2017), 2321-2329.*
 50. *Kirk O., Borchert T. V., Fuglsang C. C., Industrial enzyme applications, Current Opinion in Biotechnology, 13 (2002), 345-351.*
 51. *Klumphu P., Lipshutz B. H., "Nok": a phytosterol-based amphiphile enabling transition-metal-catalyzed couplings in water at room temperature, The Journal of Organic Chemistry, 79 (2014), 888-900.*
 52. *Koopmeiners J., Halmschlag B., Schallmeyer M., Schallmeyer A., Biochemical and biocatalytic characterization of 17 novel halohydrin dehalogenases. Applied Microbiology and Biotechnology, 100 (2016), 7517-7527.*
 53. *Lehninger A., Biochemistry, Worth Publishing Inc., New York, 1970, 833*
 54. *Lipshutz B. H., Gallou F., Handa S., Evolution of solvents in organic chemistry, ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 4 (2016), 5838-5849.*
 55. *Lipshutz B. H., Ghorai S., Abela A. R., Moser R., Nishikata T., Duplais C., Krasovskiy A., Gaston R. D., Gadwood R. C., TPGS-750-M: a second-generation amphiphile for metal-catalyzed cross-couplings in water at room temperature, The Journal of Organic Chemistry, 76 (2011), 4379-4391.*
 56. *Littlechild J. A., Improving the 'tool box' for robust industrial enzymes, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 44 (2017), 711-720.*
 57. *Liu X., Kokare C., Chapter 11 microbial enzymes of use in industry, Ind Biotechnol Microb Enzymes, 2016, 267-298.*
 58. *Lorenzetto T., Frigatti D., Fabris F., Scarso A., Nanoconfinement effects of micellar media in asymmetric catalysis, Advanced Synthesis & Catalysis, 364 (2022), 1776-1797.*

59. *Lutje Spelberg J. H., Tang L., van Gelder M., Kellogg R. M., Janssen D. B.*, Exploration of the biocatalytic potential of a halohydrin dehalogenase using chromogenic substrates, *Tetrahedron: Asymmetry*, **13** (2002), 1083-1089.
60. *Lutje Spelberg J. H., van Hylckama Vlieg J. E., Bosma T., Kellogg R. M., Janssen D. B.*, A tandem enzyme reaction to produce optically active halohydrins, epoxides and diols, *Tetrahedron: Asymmetry*, **10** (1999), 2863-2870.
61. *Majerić Elenkov M., Čičak M., Smolko A., Knežević A.*, Halohydrin dehalogenase-catalysed transformations of epifluorohydrin, *Tetrahedron Letters*, **59** (2018), 406-408.
62. *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, *Advanced Synthesis & Catalysis*, **348** (2006), 579-585.
63. *Majerić Elenkov M., Primožič I., Hrenar T., Smolko A., Dokli I., Salopek-Sondi B., Tang L.*, Catalytic activity of halohydrin dehalogenases towards spiroepoxides, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **10** (2012), 5063-5072.
64. *Majerić Elenkov M., Szymanski W., Janssen D. B.*, in *Science of Synthesis: Biocatalysis in Organic Synthesis 2* (Eds.: K. Faber, W.- D. Fessner, N. Turner), Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2014, pp. 507-527
65. *Mehić E., Hok L., Wang Q., Dokli I., Miklenić M. S., Blažević Z. F., Tang L., Vianello R., Majerić Elenkov M.*, Expanding the scope of enantioselective halohydrin dehalogenases—Group B, *Advanced Synthesis & Catalysis*, **364** (2022), 2461-2461.
66. *Mennen S. M., Alhambra C., Allen C. L., Barberis M., Berritt S., Brandt T. A., Campbell A. D., Castañón J., Cherney A. H., Christensen M., Damon D. B., de Diego J. E., Garcia-Cerrada S., Garcia-Losada P., Haro R., Janey J., Leitch D. C., Li L., Liu F., Lobben P. C., MacMillan D. W. C., Magano J., McInturff E., Monfette S., Post R. J., Schultz D., Sitter B. J., Stevens J. M., Strambeanu I. I., Twilton J., Wang Ke, Zajac M. A.*, The evolution of high-throughput experimentation in pharmaceutical development and perspectives on the future, *Organic Process Research & Development*, **23** (2019), 1213-1242.
67. *Milčić N., Sudar M., Marić A. K., Kos K., Majerić Elenkov M., Findrik Blažević Z.*, HHDH-Catalyzed synthesis of enantioenriched fluorinated β -hydroxy nitrile—process advances through a reaction engineering approach, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **63** (2024), 7051-7063.
68. *Nakamura T., Nagasawa T., Fujio Y., Watanabe I., Yamada H.*, A new catalytic function of halohydrin hydrogen-halide-lyase, synthesis of β -hydroxynitriles from epoxides and cyanide, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **180** (1991), 124-130.
69. *Nakamura T., Nagasawa T., Yu F., Watanabe I., Yamada H.*, A new enzymatic synthesis of (R)- γ -chloro- β -hydroxybutyronitrile, *Tetrahedron*, **50** (1994), 11821-11826.
70. *Nestl B. M., Nebel B. A., Hauer B.*, Recent progress in industrial biocatalysis, *Current opinion in Chemical Biology*, **15** (2011), 187-193.

71. Nowakowski A. B., Wobig W. J., Petering D. H., Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions, *Metallomics*, **6** (2014), 1068-1078.
72. Ogino H., Ishikawa H., Enzymes which are stable in the presence of organic solvents, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **91** (2001), 109-116.
73. Parmentier M., Gabriel C. M., Guo P., Isley N. A., Zhou J., Gallou F., Switching from organic solvents to water at an industrial scale, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, **7** (2017), 13-17.
74. Plechkova N. V., Seddon K. R., Applications of ionic liquids in the chemical industry, *Chemical Society Reviews*, **37** (2008), 123-150.
75. Pollard D. J., Woodley J. M., Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now, *Trends in Biotechnology*, **25** (2007), 66-73.
76. Prasad S., Roy I., Converting enzymes into tools of industrial importance, *Recent Patents on Biotechnology*, **12** (2018), 33-56.
77. Pyser J. B., Chakrabarty S., Romero E. O., Narayan A. R., State-of-the-art biocatalysis, *ACS Central Science*, **7** (2021), 1105-1116.
78. Rekowski A., Langenkämper G., Dier M., Wimmer M. A., Scherf K. A., Zörb C., Determination of soluble wheat protein fractions using the Bradford assay, *Cereal Chemistry*, **98** (2021), 1059-1065.
79. Scarso A., Strukul G., Transition Metal Catalysis in Micellar Media: Much More Than a Simple Green Chemistry Promise, Chapter 12, *RSC Green Chemistry Series*, **61** (2019), 268–288.
80. Schallmey A., Schallmey M., Recent advances on halohydrin dehalogenases—from enzyme identification to novel biocatalytic applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **100** (2016), 7827-7839.
81. Schallmey M., Koopmeiners J., Wells E., Wardenga R., Schallmey A., Expanding the halohydrin dehalogenase enzyme family: identification of novel enzymes by database mining, *Applied and Environmental Microbiology*, **80** (2014), 7303-7315.
82. Schrittwieser J. H., Lavandera I., Seisser B., Mautner B., Kroutil W., Biocatalytic Cascade for the Synthesis of Enantiopure β -Azidoalcohols and β -Hydroxynitriles, (2009)
83. Sheldon R. A., Bode M. L., Akakios S. G., Metrics of green chemistry: Waste minimization, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, **33** (2022), 100569.
84. Sheldon R. A., Brady D., Green chemistry, biocatalysis, and the chemical industry of the future, *ChemSusChem*, **15** (2022), e202102628.
85. Sheldon R. A., Metrics of green chemistry and sustainability: past, present, and future, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **6** (2018), 32-48.
86. Sheldon R. A., van Pelt S., Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chemical Society Reviews*, **42** (2013), 6223-6235.

87. *Sheldon R. A., Woodley J. M.*, Role of biocatalysis in sustainable chemistry, *Chemical Reviews*, **118** (2018), 801-838.
88. *Shen T., Zhou S., Ruan J., Chen X., Liu X., Ge X., Qian C.*, Recent advances on micellar catalysis in water, *Advances in Colloid and Interface Science*, **287** (2021), 102299.
89. *Strukul G., Fabris, F. A., Scarso* in *Supramolecular Catalysis: New Directions and Developments*, Chapter 31 (Eds: P. W. N. M. van Leeuwen, Matthieu Raynal), Wiley 2022, pp. 451–466
90. *Suzuki, T., Kasai, N.*, Generation of optically active glycerol derivatives by microbial resolution for development of useful synthetic units for pharmaceuticals, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **15** (2003), 329-349.
91. *Tang W. L., Zhao H.*, Industrial biotechnology: tools and applications, *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, **4** (2009), 1725-1739.
92. *Timson, D.J.*, Four Challenges for Better Biocatalysts, *Fermentation*, **5** (2019), str. 39-48
93. *Turro N. J., Sidney Cox G., Paczkowski M. A.*, Photochemistry in micelles. In *Photochemistry and Organic Synthesis*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, (2005), pp. 57-97
94. *van Hylckama Vlieg J. E., Tang L., Lutje Spelberg J. H., Smilda T., Poelarends G. J., Bosma T., van Merode A. E. J., Fraaije M. W., Janssen D. B.*, Halohydrin dehalogenases are structurally and mechanistically related to short-chain dehydrogenases/reductases, *Journal of Bacteriology*, **183** (2001), 5058-5066.
95. *Victorino da Silva Amatto I., Gonsales da Rosa-Garzon N., Antonio de Oliveira Simoes F., Santiago F., Pereira da Silva Leite N., Raspante Martins J., Cabral H.*, Enzyme engineering and its industrial applications, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **69** (2022), 389-409.
96. *Watanabe F., Yu F., Ohtaki A., Yamanaka Y., Noguchi K., Odaka M., Yohda M.*, Improvement of enantioselectivity of the B-type halohydrin hydrogen-halide-lyase from *Corynebacterium* sp. N-1074, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **122** (2016), 270-275.
97. *Watanabe F., Yu F., Ohtaki A., Yamanaka Y., Noguchi K., Yohda M., Odaka M.*, Crystal structures of halohydrin hydrogen-halide-lyases from *Corynebacterium* sp. N-1074, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **83** (2015), 2230-2239.
98. *Wender P. A., Verma V. A., Paxton T. J., Pillow T. H.*, Function-oriented synthesis, step economy, and drug design, *Accounts of Chemical Research*, **41** (2008), 40-49.
99. *Wiltschi B., Cernava T., Dennig A., Casas M. G., Geier M., Gruber S., Haberbauer M., Heidinger P., Acero E. H., Kratzer R., Luley-Goedl C., Müller C.A., Pitzer J., Ribitsch D., Sauer M., Schmölzer K., Schnitzhofer W., Sensen C. W., Soh J., Steiner K., Winkler C. K., Winkler M., Wriessnegger T.*, Enzymes revolutionize the bioproduction of value-added compounds: From enzyme discovery to special applications, *Biotechnology Advances*, **40** (2020)
100. *Winkler C. K., Schrittwieser J. H., Kroutil W.*, Power of biocatalysis for organic synthesis, *ACS Central Science*, **7** (2021), 55-71.

101. Wohlgemuth R., Littlechild J., Monti D., Schnorr K., van Rossum T., Siebers B., Menzel P., Kublanov I. V., Rike A. G., Skretas G., Szabo Z., Peng X., Young M. J., Discovering novel hydrolases from hot environments, *Biotechnology Advances*, **36** (2018), 2077-2100
102. Woodley J. M., Ensuring the sustainability of biocatalysis, *ChemSusChem*, **15** (2022), e202102683.
103. Wu S., Snajdrova R., Moore J. C., Baldenius K., Bornscheuer U. T., Biocatalysis: enzymatic synthesis for industrial applications, *Angewandte Chemie International Edition*, **60** (2021), 88-119.
104. Yamada H., Kobayashi M., Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **60** (1996), 1391-1400.
105. Yi D., Bayer T., Badenhorst C. P. S., Wu S., Doerr M., Höhne M., Bornscheuer U. T., Recent trends in biocatalysis, *Chemical Society Reviews*, **50** (2021), 8003-8049
106. You Z. Y., Liu Z. Q., Zheng Y. G., Chemical and enzymatic approaches to the synthesis of optically pure ethyl (R)-4-cyano-3-hydroxybutanoate, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98** (2014), 11-21.
107. Zhao M., Wang H. B., Ji L. N., Mao Z. W., Insights into metalloenzyme microenvironments: biomimetic metal complexes with a functional second coordination sphere, *Chemical Society Reviews*, **42** (2013), 8360-8375.
108. <https://hardydiagnostics.com/blog/petri-plate-2023> (pristup 15.4.2025.)
109. <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cellular-energetics/enzyme-structure-and-catalysis/a/enzymes-and-the-active-site> (pristup 8.3.2025.)

8 Sažetak

Autorica: Laura Glavinić

Naslov rada: Ispitivanje smanjenja utjecaja inhibicije enzima supstratom upotrebom micelnog medija

Predvođena enzimima, biokataliza je samo jedna od mnogih grana i smjerova znanosti koje nastoje spojiti tehnološke prednosti doba u kojem živimo i znanja iz prirode u svrhu razvoja metoda i procesa koji su održiviji i općenito pogodniji za okoliš. Enzimi se nerijetko nazivaju biokatalizatorima budućnosti jer omogućuju odvijanje katalitičkih reakcija u blagim reakcijskim uvjetima, čime štede energiju i smanjuju potrebu za štetnim kemikalijama.

Halogenhidrin-dehalogenaze su enzimi velikog katalitičkog potencijala koje u prirodi igraju važnu ulogu u razgradnji ksenobiotika i mogu katalizirati formiranje različitih kemijskih veza, uključujući ugljik-ugljik i ugljik-dušik. Njihova primjena posebno je važna u sintezi farmaceutskih prekursora jer kataliziraju reverzibilne reakcije dehalogeniranja β -haloalkohola što rezultira stvaranjem epoksida. Enzimi HDDH grupe B dugo su bili zanemarivani jer su smatrani enzimima niske enantioselektivnosti. Ipak, nedavna istraživanja pokazala su da ovi enzimi mogu katalizirati reakcije otvaranja sterički zahtjevnih 2,2-disupstituiranih epoksida s vrlo visokom enantioselektivnošću ($E > 200$). Ova grupa enzima HDDH usprkos prethodnim vjerovanjima, pokazala se kao grupa enzima s izuzetnom selektivnošću i aktivnošću koja ima izrazito veliki katalitički potencijal za sintezu velikih tercijarnih alkohola.

Organska otapala najčešće su korišteni mediji u organskim sintezama. Često su toksična i vrlo štetna za okoliš, uz što vrlo negativno utječu na aktivnost i stabilnost enzima te nerijetko dovode do njihove denaturacije. Micelarna biokataliza, koja kao reakcijski medij koristi vodu u kojoj se nalaze nanoreaktori koje su formirale micle, nudi održiviji pristup u kojem biokatalizatori opstaju. Prethodnim ispitivanjima ponašanja alkohol-dehalogenaza pokazalo se da TPGS-750-M pogoduje učinkovitosti katalitičkog procesa jer stvara pogodniju reakcijsku okolinu za enzime i omogućuje topljivost organskih supstrata u vodenom mediju.

U reakciji azidolize 2-benzil-2-metiloksirana, kataliziranoj enzimom HheB2, dolazi do inhibicije enzima supstratom. U svrhu smanjenja inhibicije enzima supstratom upotrijebljen je 2 % TPGS-750-M kao reakcijski medij. Upotreba micelnog medija omogućila je postizanje viših konverzija supstrata, povećala maksimalnu specifičnu aktivnost enzima te umanjila inhibiciju enzima supstratom, što su potvrdile vrijednosti kinetičkih parametara.

Ispitivanjem kinetičkih parametara i tijekom reakcije u micelnom mediju i u puferu uspješno je potvrđeno da je u promatranoj reakciji moguće smanjiti inhibiciju enzima supstratom upotrebom micelnog medija.

Ključne riječi: inhibicija enzima, micelarni medij, TPGS-750-M, halogenhidrin-dehalogenaze

9 Summary

Author: Laura Glavinić

Paper title: Study on Reducing the Impact of Substrate Inhibition on Enzymes Using Micellar Media

Led by enzymes, biocatalysis is just one of the many branches and directions in science that seek to combine the technological advantages of our era with knowledge from nature to develop methods and processes that are more sustainable and generally more environmentally friendly. Enzymes are often referred to as the biocatalysts of the future because they enable catalytic reactions to occur under mild reaction conditions, thereby saving energy and reducing the need for harmful chemicals.

Halohydrin dehalogenases are enzymes with significant catalytic potential that play an important role in nature in the degradation of xenobiotics and can catalyse the formation of various chemical bonds, including carbon-carbon and carbon-nitrogen bonds. Their application is particularly important in the synthesis of pharmaceutical precursors because they catalyse the reversible dehalogenation of β -haloalcohols, resulting in the formation of epoxides. Group B HHDH enzymes were long neglected because they were considered to have low enantioselectivity. However, recent research has shown that these enzymes can catalyse the opening of sterically demanding 2,2-disubstituted epoxides with very high enantioselectivity ($E > 200$). Contrary to previous beliefs, this group of enzymes HHDH has proven to have exceptional selectivity and activity, making them highly valuable for the synthesis of large tertiary alcohols.

Organic solvents are the most commonly used media in organic syntheses. They are mostly toxic and highly harmful to the environment and can negatively affect enzyme activity and stability, often leading to their denaturation. Micellar biocatalysis, which uses water as a reaction medium containing nanoreactors formed by micelles, offers a more sustainable approach where biocatalysts can thrive. Previous studies on alcohol dehalogenase behaviour have shown that TPGS-750-M enhances the efficiency of the catalytic process by creating a more favourable reaction environment for enzymes and allowing the solubility of organic substrates in an aqueous medium.

In the azidolysis reaction of 2-benzyl-2-methyloxirane, catalysed by the enzyme HheB2, enzyme inhibition by the substrate occurs. To reduce enzyme inhibition by the substrate, 2 % TPGS-750-M was used as the reaction medium. The use of a micellar medium enabled higher substrate conversions, increased the enzyme's maximum specific activity and reduced enzyme inhibition by the substrate, which was confirmed by the values of the kinetic parameters.

By examining the kinetic parameters and the reaction course in both micellar medium and buffer, it was successfully confirmed that in the observed reaction it is possible to reduce substrate inhibition of the enzyme by using a micellar medium.

Keywords: enzyme inhibition, micellar media, TPGS-750-M, halogenhydrin-dehalogenases

10 Prilozi

- 1) MATLAB kod za procjenu kinetičkih parametara za supstrate

```
% [c1 c2 S.A.]
data = [0 0 0];

% [ Vm, Ki, Km1, Km2 ]
fitFlag = [ 1 1 1 0 ];
fixVal = [ NaN NaN NaN 1.6019 ];

c1 = data(:,1); c2 = data(:,2); r_obs = data(:,3);
X = [c1, c2];
model_raw = @(p,x) p(1).*x(:,1).*x(:,2) ./ ( (p(3)+x(:,1)+x(:,1).^2./p(2)) .*
(p(4)+x(:,2)) );

p0_def = [ max(r_obs) 50 5 20 ];
p_full = p0_def;
p_full(~fitFlag) = fixVal(~fitFlag);
freeIdx = find(fitFlag);
p0_free = p_full(freeIdx);

ratefun = @(q,x) model_raw( inject(q,p_full,freeIdx), x );
opts = statset('nlinfit'); opts.Display = 'off';
[q,resid,J,CovB] = nlinfit(X, r_obs, ratefun, p0_free, opts);

p_full(freeIdx) = q;
sd_full = zeros(1,4);
sd_full(freeIdx) = sqrt(diag(CovB));
Vm = p_full(1); Ki = p_full(2);
Km1 = p_full(3); Km2 = p_full(4);

r_pred = model_raw(p_full,X);
R2 = 1 - sum((r_obs-r_pred).^2) / sum((r_obs-mean(r_obs)).^2);

fprintf('\n=== Procijenjeni parametri ===\n');
names = {'Vm','Ki','Km1','Km2'};
for i = 1:4
    if fitFlag(i)
        fprintf(' %-4s = %9.4f ± %4.4f\n',names{i},p_full(i),sd_full(i));
    else
        fprintf(' %-4s = %9.4f (fixed)\n',names{i},p_full(i));
    end
end
fprintf('\nR² = %4.4f\n\n',R2);

figure; hold on
plot(c1,r_obs,'bo','MarkerSize',6,'LineWidth',1.2);
if std(c1) >= std(c2)
    sweep = linspace(min(c1),max(c1)*1.05,300)';
    plot(sweep,model_raw(p_full,[sweep mean(c2)*ones(size(sweep))]), ...
        'r','LineWidth',1.5);
    xlabel('c_1');
else
    sweep = linspace(min(c2),max(c2)*1.05,300)';
    plot(sweep,model_raw(p_full,[mean(c1)*ones(size(sweep)) sweep]), ...
        'r','LineWidth',1.5);
    xlabel('c_2');
end
ylabel('S.A. (U/mg)');
legend('data','fit','Location','Best'); grid on
hold off

function p = inject(q,tmpl,idx)
    p = tmpl;
    p(idx) = q;
end
```

2) MATLAB kod za procjenu kinetičkih parametara za produkt

```

cp_data = []; SA_data = []; c1_fixed = 10; c2_fixed = 10;
Km1 = 2.2586; Km2 = 1.6019; Ki_supstrat = 124.9981;

Vm0 = 8.1381; Kip0 = 120; fit_Vm = false; fit_Kip = true;

params0 = []; fit_mask = {};
if fit_Vm
    params0 = [params0, Vm0];
    fit_mask{end+1} = 'Vm';
end
if fit_Kip
    params0 = [params0, Kip0];
    fit_mask{end+1} = 'Kip';
end

model_fun = @(params, cp) product_model(params, cp, fit_mask, Vm0, Kip0, c1_fixed,
c2_fixed, Km1, Km2, Ki_supstrat);
residuals_fun = @(params) SA_data - model_fun(params, cp_data);
opts = optimoptions('lsqnonlin', 'Display', 'off', 'Algorithm', 'levenberg-
marquardt');
lower_bounds = 0.001 * ones(size(params0));
upper_bounds = 1000 * ones(size(params0));
[params_est, ~, residuals, ~, ~, ~, J] = lsqnonlin(residuals_fun, params0,
lower_bounds, upper_bounds, opts);

n = length(SA_data);
p = length(params_est);
sigma2 = sum(residuals.^2) / (n - p);
cov_matrix = sigma2 * pinv(J'*J);
standard_errors = sqrt(diag(cov_matrix));
CI = 1.96 * standard_errors;
for i = 1:length(fit_mask)
    fprintf(' %s = %.2f ± %.2f\n', fit_mask{i}, params_est(i), CI(i));
end

SA_pred = model_fun(params_est, cp_data);
SS_res = sum((SA_data - SA_pred).^2);
SS_tot = sum((SA_data - mean(SA_data)).^2);
R2 = 1 - SS_res/SS_tot;
fprintf('R² = %.4f\n', R2);

cp_fine = linspace(min(cp_data), max(cp_data), 100);
model_curve = model_fun(params_est, cp_fine);
figure;
scatter(cp_data, SA_data, 'k', 'filled'); hold on;
plot(cp_fine, model_curve, 'k-', 'LineWidth', 2);
xlabel('c_p (mM)');
ylabel('Specifična aktivnost (U/mg)');
ylim([0 9]);

function r = product_model(params, cp, fit_mask, Vm0, Kip0, c1, c2, Km1, Km2,
Ki_supstrat)
    idx = 1;
    if ismember('Vm', fit_mask)
        Vm = params(idx); idx = idx + 1;
    else
        Vm = Vm0;
    end
    if ismember('Kip', fit_mask)
        Kip = params(idx);
    else
        Kip = Kip0;
    end
    r = Vm .* c1 .* c2 ./ ( (Km1 .* (1 + cp./Kip) + c1 + (c1.^2)./Ki_supstrat) .*
(Km2 + c2) );
end

```