



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Petra Švaco

Primjena halogenhidrin-dehalogenaza u nekonvencionalnim reakcijskim uvjetima

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND
TECHNOLOGY

Petra Švaco

**Application of halohydrin dehalogenases
under non-conventional reaction
conditions**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Petra Švaco

Primjena halogenhidrin-dehalogenaza u nekonvencionalnim reakcijskim uvjetima

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND
TECHNOLOGY

Petra Švaco

**Application of halohydrin dehalogenases
under non-conventional reaction
conditions**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2026.

SAŽETAK

Primjena halogenhidrin-dehalogenaza u nekonvencionalnim reakcijskim uvjetima

Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH) su enzimi koji kataliziraju reverzibilnu dehalogenaciju vicinalnih halogenhidrina te nukleofilno otvaranje epoksida uz različite anionske nukleofile, uključujući azid, cijanid i cijanat, pri čemu nastaju sintetski vrijedni kiralni spojevi. Unatoč njihovom značajnom biokatalitičkom potencijalu, šira primjena HHDH-enzima ograničena je slabom topljivošću hidrofobnih supstrata u vodi, hidrolitičkom nestabilnošću epoksida te inhibicijom enzima različitim komponentama reakcijske smjese.

U okviru ovog doktorskog rada istražena je primjena HHDH-enzima u nekonvencionalnim reakcijskim uvjetima s ciljem prevladavanja navedenih ograničenja, koristeći enzim HheC otkriven u bakteriji *Agrobacterium radiobacter* AD1 kao modelni enzim. Ispitana su dva nekonvencionalna reakcijska medija: micelarni sustav temeljen na površinski aktivnoj tvari TPGS-750-M i hidrofobna duboka eutektička otapala (HDES), koja su pokazala učinkovitu stabilizaciju hidrolitički nestabilnih epoksidnih supstrata uz očuvanje enzimске aktivnosti. Nekonvencionalne formulacije biokatalizatora istražene su primjenom različitih strategija imobilizacije enzima, uključujući fizikalnu adsorpciju, kovalentno vezanje na čvrste nosače, inkapsulaciju unutar metaloorganskih mreža ZIF-8 te uklapanje enzima i stanica u gelove i bakterijski biofilm. Rezultati pokazuju da nekonvencionalni reakcijski uvjeti i prilagođene formulacije biokatalizatora značajno proširuju primjenjivost HHDH-enzima u sintetski relevantnim uvjetima.

Ključne riječi: biokataliza, halogenhidrin-dehalogenaze, micelarni medij, eutektička otapala, imobilizacija enzima, imobilizacija cijelih stanica

ABSTRACT

Application of halohydrin dehalogenases under non-conventional reaction conditions

Halohydrin dehalogenases (HHDHs) are enzymes that catalyse the reversible dehalogenation of vicinal halohydrins and the nucleophilic ring-opening of epoxides with various anionic nucleophiles, including azide, cyanide and cyanate, yielding synthetically valuable chiral products. Despite their considerable biocatalytic potential, broader application of HHDHs is hindered by the poor aqueous solubility of hydrophobic substrates, hydrolytic instability of epoxides, and enzyme inhibition by reaction mixture components.

This doctoral thesis investigates the application of HHDH enzymes under non-conventional reaction conditions aimed at overcoming these limitations, using HheC from *Agrobacterium radiobacter* AD1 as the model enzyme. A micellar medium based on the surfactant TPGS-750-M and hydrophobic deep eutectic solvents (HDES) were examined as non-conventional reaction media; the latter demonstrated effective stabilisation of hydrolytically unstable epoxide substrates while preserving enzymatic activity. Non-conventional biocatalyst formulations were investigated through various enzyme immobilisation strategies, including physical adsorption, covalent binding to solid supports, encapsulation within ZIF-8 metal-organic frameworks, and enzyme and cell entrapment in gels and bacterial biofilm. The results demonstrate that non-conventional reaction conditions and tailored biocatalyst formulations substantially expand the applicability of HHDH enzymes under synthetically relevant conditions.

Keywords: biocatalysis, halohydrin dehalogenases, micellar medium, deep eutectic solvents, enzyme immobilization, whole-cell immobilization