

Biokatalitička svojstva halogenhidrin-dehalogenaza skupine B u reakcijama nukleofilnog otvaranja epoksida

Mehić, Emina

Doctoral thesis / Doktorski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:333636>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Emina Mehić

**Biokatalitička svojstva halogenhidrin-
dehalogenaza grupe B u reakcijama
nukleofilnog otvaranja epoksida**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND
TECHNOLOGY

Emina Mehić

**Biocatalytic properties of group B
halohydrin dehalogenases in nucleophilic
ring-opening reactions of epoxides**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Emina Mehić

**Biokatalitička svojstva halogenhidrin-
dehalogenaza skupine B u reakcijama
nukleofilnog otvaranja epoksida**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Dr. sc. Maja Majerić Elenkov

Prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Emina Mehić

**Biocatalytic properties of group B
halohydrin dehalogenases in nucleophilic
ring-opening reactions of epoxides**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Dr. sc. Maja Majerić Elenkov

Prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Zagreb, 2023.

Bibliografska stranica:

- UDK: 577.15:544.47:547-311(043.3)
- Znanstveno područje: Prirodne znanosti
- Znanstveno polje: Kemija
- Znanstvena grana: Organska kemija
- Institucija: Institut Ruđer Bošković, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorij za stereoselektivnu sintezu i biokatalizu
- Voditelj rada: dr.sc. Maja Majerić Elenkov i prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević
- Broj stranica: 110
- Broj slika: 22
- Broj tablica: 21
- Broj priloga: 0
- Broj literaturnih referenci: 87

- Datum obrane: 24. veljače 2023.

- Sastav povjerenstva za obranu:
Doc. dr. sc. Martina Sudar
Prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić
Dr. sc. Srećko Kirin
- Rad je pohranjen u:
• Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb;
• Knjižnici Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Trg Marka Marulića 20.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, održanoj dana 20. prosinca 2021., te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu 19. srpnja 2022.

Informacije o mentorima

Dr. sc. Maja Majerić Elenkov

Maja Majerić Elenkov [REDACTED] Studirala je kemiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Doktorirala je 2003. godine pod mentorstvom prof. dr. sc. Vitomira Šunjića u području prirodnih znanosti s temom „Biokatalitički generirani kiralni ligandi za homogene katalizatore na osnovi 1, 4-benzodiazepina“. Nakon doktorata pridružila se grupi profesora Dicka B. Janssena (Sveučilište Groningen, Nizozemska) kao postdoktorandica, gdje je tijekom dvije godine inozemnog usavršavanja radila na stereoselektivnim transformacijama kataliziranim halogenhidrin-dehalogenazama. Trenutno je zaposlena kao viši znanstveni suradnik na institutu Ruđer Bošković u laboratoriju za Stereoselektivnu sintezu i biokatalizu, Zavoda za Organsku kemiju i biokemiju. Njezina znanstvena djelatnost usmjerena je na biokatalitička istraživanja, odnosno primjenu halogenhidrin-dehalogenaza u organskoj kemiji za pripremu sintetski vrijednih molekula. Autor i koautor je brojnih znanstvenih publikacija, neposredni voditelj nekoliko diplomskih i doktorskih radova, te voditelj brojnih projekata. Osim toga, u razdoblju od 2007. do 2015. godine bila je nositelj predmeta „Stereokemija lijekova i asimetrična sinteza“ i „Posebne metode u organskoj sintezi“ na doktorskom studiju Medicinskog fakulteta u Rijeci, a od 2011. godine nositelj je kolegija „Enzimski katalizirane stereoselektivne reakcije“ na doktorskom studiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu.

Prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Zvezdana Findrik Blažević [REDACTED] Diplomirala je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu 2002. godine. Nakon diplome zaposlila se kao asistent u Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu istog fakulteta. Doktorirala je 2006. godine u sklopu projekta „Biokataliza i biotransformacije“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Đurđe Vasić-Rački u polju tehničkih znanosti s temom „Studij reakcija kataliziranih oksidazama aminokiselina“. 2009. godine postaje docent, nakon čega 2012. godine izvanredni profesor te redoviti profesor 2018. godine. Tijekom svoje karijere znanje je usavršavala na nekoliko inozemnih institucija: Zavod za tehničku kemiju, Sveučilište Rostock (Njemačka), Institut za biotehnologiju istraživačkog centra Jülich (Njemačka), Institut za naprednu kemiju, CSIC (Španjolska). Dobitnica je brojnih nagrada poput: Rektorove nagrade (2002.), nagrade Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu (2005.), Godišnje državne nagrade za znanost za mlade istraživače u području biotehničkih znanosti (2006.) te Nagrade Akademije tehničkih znanosti Hrvatske mladim znanstvenicima „Vera Johanides“ (2009.). Njezina znanstvena djelatnost usmjerena je na primjenu biokatalize, optimizaciju biokatalitičkih procesa korištenjem inženjerskog pristupa te posebice na kompleksne kaskadne reakcijske sustave. Voditeljica je četiri projekta iz linije Obzor 2020. i Obzor Europa, te drugih projekata. Autor je i koautor brojnih znanstvenih publikacija, održala je pozvana predavanja na domaćim i stranim konferencijama te je bila voditelj velikog broja završnih, diplomskih i doktorskih radova. Aktivan je član Hrvatskog društva kemijskih inženjera, Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu te uredništva časopisa „Hungarian Journal of Industry and Chemistry“ i „Biocatalysis and Biotransformation“.



Europska unija
Zajedno do fondova EU

Ovaj istraživački rad rađen je u sklopu projekta „Inovativna rješenja u katalitičkim proizvodnim procesima za potrebe farmaceutske industrije“ (CATPHARMA) (KK.01.1.1.04.0013, voditelj dr. sc. Srećko Kirin). Projekt je financiran sredstvima Europske unije, operativnog programa „Konkurentnost i kohezija“ (2014. – 2020.).

Računalna analiza prikazana u radu odrađena je od strane dr. sc. Roberta Vianella i mag. pharm. Lucije Hok s Instituta Ruđer Bošković, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorija za računalni dizajn i sintezu funkcionalnih materijala.

Plazmidi korišteni za ekspresiju enzima pripremljeni su genetičkim inženjerstvom od strane prof. dr. sc. Lixie Tang i Qian Wanga sa Sveučilišta elektroničkih znanost i tehnologije u Chengdu, Kina.

ZAHVALE

- ∞ Hvala mentoricama Maji i Zvezdani na pomoći i savjetima tijekom cijelog doktorskog studija, a posebno Maji na stručnom vodstvu, podršci, nesebičnom dijeljenju znanja i iskustva, te ukazanoj prilici da budem dio CAT-PHARMA tima.
- ∞ Hvala ekipi računalaca, Robertu i Luciji, na prekrasnoj suradnji i izvandrednim rezultatima.
- ∞ Hvala Neveni na strpljenju i znanju koje je dijelila samnom, posebice u prvim koracima ovog doktorskog putovanja.
- ∞ Hvala cijeloj CAT-BIO ekipi, zahvaljujući vama tri godine su proletile, bilo mi je neopisivo lijepo i falit ćete mi svi.
- ∞ Hvala najdražoj kolegici Petri što mi je pravila društvo u labosu. Bez tebe bi sve ovo bilo puno teže i zato ti hvala na svakom savjetu, na svemu što si me naučila o enzimima, na svim materijalima za stipendiju, na svakom brainstormingu, zajedničkom ručku i jutarnjem čaju.
- ∞ Hvala Tinu koji je uvijek tu kad zatreba. Hvala ti što si me pratio na svim putovanjima, što si podržao sve moje lude ideje i što si trošio vrijeme na ispravlje mojih tipfelera.
- ∞ I na kraju, hvala cijeloj obitelji na podršci, a posebno mami i tati koji su me svojim primjerom vodili kroz život. Hvala vam što ste mi najveći oslonac i što vjerujete u mene.

SAŽETAK

Biokatalitička svojstva halogenhidrin-dehalogenaza skupine B u reakcijama nukleofilnog otvaranja epoksida

Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH) su enzimi koji imaju sposobnost uvođenja novih funkcionalnih skupina u molekulu, kataliziranjem reakcije otvaranja epoksida s različitim nukleofilima. Aktivno mjesto enzima može primiti više različitih neprirodnih nukleofila poput azida, cijanida i nitrita, zbog čega su enzimi privukli pažnju sintetske organske kemije. Njihova enantioselektivnost ovisi o strukturi supstrata, te često nije dovoljno visoka za sintetsku primjenu. Enzim HheB2 iz grupe B u prethodnim istraživanjima testiran je na relativno malom broju supstrata gdje je pokazao nisku enantioselektivnost, te je dugi niz godina ostao zanemaren u biokatalitičkim istraživanjima. U okviru ovog rada provedeno je opsežno ispitivanje dva divlja tipa HHDH iz skupine B: HheB iz *Croynebacterium* sp. soj N-1074 i HheB2 iz *Mycobacterium* sp. soj GP1 na nizu supstrata i nukleofila. Otkriveno je nekoliko visoko enantioselektivnih reakcija ($E > 200$), gdje je HheB pokazao bolju enantioselektivnost i aktivnost prema većem broju strukturno različitih supstrata u usporedbi s HheB2. Ova dva enzima dijele visoku homologiju sekvence i razlikuju se u samo četiri aminokiseline (F36I, T120A, C124Y, H125Q). Ispitivanjem mutanata HheB2 s modificiranim pojedinačnim aminokiselinama utvrđene su aminokiseline ključne za veću enantioselektivnost HheB u odnosu na HheB2. Eksperimentalni rezultati potvrđeni su i dodatno pojašnjeni računalnim analizama. Zbog izuzetne selektivnosti i aktivnosti B grupa HHDH nameće se kao odličan katalizator za sintezu velikih tercijarnih alkohola. Ispitivanjem različitih nukleofila prikazana je mogućnost sinteze enantiomerno čistih azido-alkohola i oksazolidinona, a kinetičkim mjerenjima određen je stupanj inhibicije enzima prihvaćenim nukleofilima.

Ključne riječi: biokataliza, enantioselektivnost, epoksidi, HHDH, kinetička mjerenja, kinetička rezolucija, nukleofili

ABSTRACT

Biocatalytic properties of group B halohydrin dehalogenases in nucleophilic ring-opening reactions of epoxides

Halohydrin dehalogenases (HHDH) have the ability to introduce new functionalities into the molecule through the ring-opening reactions of epoxides with different nucleophiles. These enzymes draw the attention of synthetic chemistry due to their ability to accept unnatural nucleophiles such as azide, cyanide and nitrite ions. The enantioselectivity of HHDHs is substrate-dependent and not always sufficient for synthetic applications. HheB2 from B group of HHDHs has been neglected in the biocatalytic research due to the low enantioselectivity observed on a relatively small number of tested substrates. In this work, extensive screening of substrates and nucleophiles was carried out on two B wild-type HHDHs: HheB2 from *Mycobacterium* sp. GP1 and HheB from *Corynebacterium* sp. N-1074. Several highly enantioselective reactions were discovered ($E > 200$), with HheB showing higher enantioselectivity and activity towards larger panel of substrates compared to HheB2. These two enzymes share high sequence homology and differ by only four amino acids (F36I, T120A, C124Y, H125Q). HheB2 mutants with individual amino acids replacement are examined to determine key residues. Experimental results were confirmed and further clarified by computer analysis. Due to remarkable activity and enantioselectivity, B-group HHDHs emerged as a catalyst of choice for the synthesis of bulky tertiary alcohols. Nucleophile screening showed possibility for the synthesis of enantiomerically pure azido alcohols and oxazolidinones. Kinetic measurements were used to determine enzyme inhibition by accepted nucleophiles.

Keywords: biocatalysis, enantioselectivity, epoxides, HHDH, kinetic measurements, kinetic resolution, nucleophiles

Sadržaj

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Biokataliza u organskoj sintezi	4
2.1.1. Michaelis-Menteničina kinetika	6
2.1.2. Enzimska kinetička i dinamička kinetička rezolucija	9
2.2. Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH, EC 4.5.1.X)	11
2.2.1. Podjela HHDH	12
2.2.2. Struktura, mehanizam i kinetička istraživanja	14
2.3. HHDH: Grupa B	17
2.4. Reakcije katalizirane HHDH enzimima	20
2.4.1. Priprava azido- i cijano-alkohola	23
2.4.2. Priprava oksazolidinona	26
2.4.3. Sintaza epoksida	27
2.4.4. Dinamička kinetička rezolucija (DKR)	29
2.4.5. Industrijska primjena HHDH	31
2.5. Proteinsko inženjerstvo HHDH	34
3. REZULTATI I RASPRAVA	36
3.1. Cilj rada	36
3.2. Priprava enzima	38
3.3. Sintaza supstrata i standardnih spojeva	40
3.4. Određivanje enantioselektivnosti enzimskih reakcija	41
3.5. Ispitivanje supstrata i utvrđivanje ključnih aminokiselina odgovornih za enantioselektivnost enzima	41
3.6. Molekularno modeliranje	50
3.7. Ispitivanje nukleofila	54
3.8. Kinetička ispitivanja	56
3.9. Enzimske reakcije na preparativnoj skali	58
4. EKSPERIMENTALNI DIO	60
4.1. Metode	60
4.2. Materijali	60
4.3. Priprava i karakterizacija enzima	61
4.3.1. Priprava enzima	61
4.3.2. Karakterizacija enzima	64
4.3.2.1. SDS-PAGE elektorforeza	64

4.3.2.2. Mjerenje koncentracije metodom po Bradfordu.....	66
4.3.2.3. Mjerenje aktivnosti PNSHH testom	67
4.4. Priprava epoksida	68
4.4.1. Opći postupak pripreme racemičnih epoksida 1.10, 1.11, 1.13, 1.21, 1.23, 1.24	69
4.4.2. Priprava racemičnog 2-benzil-2-metiloksirana (1.22).....	71
4.4.3. Priprava racemičnog 2-cikloheksiloksirana (1.8).....	72
4.4.4. Opći postupak pripreme enantiomerno obogaćenih epoksida (<i>R</i>)-1.21 – (<i>R</i>)-1.24	73
4.5. Priprava β -supstituiranih alkohola i oksazolidinona	74
4.5.1. Opći postupak pripreme azido-alkohola 2.1, 2.11, 2.20 – 2.24 i 3.1, 3.20, 3.23	76
4.5.2. Priprava 3-hidroksi-4-fenilbutanitrila (4.1)	79
4.5.3. Priprava 4-klor-3-hidroksibutironitrila (4.5)	79
4.5.4. Opći postupak pripreme oksazolidinona 5.1 i 5.22.....	80
4.5.5. Priprava 1-fenil-3-tiocijanatopropan-2-ola (6.1) i 2-benzil-tirana (9.1).....	81
4.5.6. Priprava 1-nitro-3-fenil-propan-2-ol (7.1).....	82
4.5.7. Priprava 3-fenil-propan-1,2-diola (8.1).....	83
4.5.8. Priprava 2-brom-1-(4-nitrofenil)etan-1-ola (12).....	84
4.6. Razvoj analitičkih metoda	85
4.6.1. Kromatografske metode za praćenje reakcija.....	85
4.6.2. Kromatografske metode za određivanje enantiomerne čistoće	86
4.7. Biokatalitičke transformacije	89
4.7.1. Ispitivanje supstrata.....	89
4.7.2. Ispitivanje nukleofila.....	90
4.8. Biokatalitičke transformacije na preparativnoj skali	91
4.8.1. Opća procedura pripreme azido-alkohola (<i>R</i>)-2.22 – (<i>R</i>)-2.24.....	91
4.8.2. Priprava (<i>R</i>)-5-benzil-5-metiloksazolidin-2-ona ((<i>R</i>)-5.22)	92
4.9. Kinetička mjerenja	93
5. ZAKLJUČAK.....	95
6. LITERATURA	97
7. POPIS KRATICA	106
8. ŽIVOTOPIS.....	108

1. UVOD

Enzimi različitih formulacija danas se koriste u brojnim industrijama poput papirne, kožne, tekstilne i industrije detergenata. Procesi u kojima proteini djeluju kao katalizatori nazivaju se biokatalitičkim procesima, te je za njih karakteristično korištenje vodenog medija i blagih reakcijskih uvjeta. Otkrivanjem mogućnosti korištenja enzimskih katalizatora za sintezu kompleksnih molekula poput farmaceutika dolazi do naglog razvoja biokatalize. Reakcije pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku zahtjevaju manji utrošak energije te snižavaju faktor emisije CO₂. Osim bolje energetske učinkovitosti i korištenja sigurnijih otapala, ovakva vrsta katalize daje mogućnost spajanja reakcija u „one-pot“ kaskadne reakcije čime se smanjuju ukupni troškovi obrade, ubrzava sinteza i povećava iskorištenje reakcije.¹ Biokataliza zadovoljava devet od dvanaest principa zelene kemije (označeni zelenom bojom u Tablici 1) zbog čega se ulažu sve veći naponi za njen razvoj.²

Enzimi su biorazgradivi i imaju sposobnost selektivnog kataliziranja reakcija, što osim ekološke prihvatljivosti nudi bolju atomsku ekonomiju i smanjuje broj sintetskih koraka. Proizvode se iz lako dostupnih i obnovljivih izvora čime se smanjuju ukupni troškovi procesa i omogućuje njihovo lakše predviđanje. Upravo je predviđanje troškova jedan od glavnih kriterija farmaceutske industrije za odabir konačnog sintetskog puta. Nakon što je 1995. godine sekvencioniran prvi bakterijski genom³ došlo je do naglog razvoja molekularne biologije, bioinformatike te proteinskog inženjerstva, što je ubrzalo i snizilo cijenu pronalaska novih specifičnih enzima. Sve veći broj publikacija na temu biokatalize, te sve veći broj farmaceutskih kompanija koje ulažu u razvoj i pronalazak novih enzima ukazuje na to da se trenutno nalazimo u „zlatnom dobu“ biokatalize.

U zadnjih nekoliko desetaka godina postalo je popularno povezivanje klasične organske sinteze s biokatalizom u takozvane kaskadne reakcije, zbog čega enzimi postaju važan alat organske kemije. Danas se postupcima „bio-retrosinteze“ lako dizajniraju enzimske kaskade gdje se kao katalizatori, za dobivanje željene molekule, koriste isključivo enzimi. Jedan takav primjer je sinteza HIV inhibitora Islatravira. Nakon dizajna sintetskog puta odabiru se odgovarajući enzimi za svaki korak.⁴ Kako bi se olakšao izbor enzima, potrebno je ubrzati otkrivanje novih enzima, proširiti katalitičko djelovanje poznatih enzima te poboljšati njihova svojstva dizajnom efikasnijih varijanti.

Tablica 1. 12 principa zelene kemije²

12 principa zelene kemije	
1.	Sprječavanje nastanka otpada
2.	Atomska ekonomija
3.	Korištenje manje toksičnih sinteza
4.	Dizajn manje toksičnih kemikalija
5.	Korištenje sigurnijih otapala i katalizatora
6.	Energetska učinkovitost
7.	Korištenje obnovljivih sirovina
8.	Smanjenje broja sintetskih koraka
9.	Korištenje reagensa u katalitičkoj količini
10.	Dizajn razgradnje svih kemijskih produkata
11.	Razvoj <i>real-time</i> analiza
12.	Smanjivanje nesreća

Halogenhidrin-dehalogenaze kataliziraju velik broj neprirodnih reakcija, pokazuju visoku regioselektivnost zbog čega se u industriji koriste za sintezu različitih molekula. Kiralni epiklorhidrin, dobiven u reakciji kataliziranoj halogenhidrin-dehalogenazama, glavni je intermedijer u proizvodnji sintetske gume, epoksidnih smola, adheziva, premaza, insekticida itd.⁵ Osim toga, navedeni enzimi našli su primjenu u farmaceutskoj industriji za sintezu kiralnih gradivnih blokova u proizvodnji atorvastatina i (*R*)-karnitina.⁵ Najveće ograničenje u njihovoj primjeni je zapravo mali broj poznatih enzima koji mogu biti visoko selektivni, zbog čega je potrebno uložiti dodatne napore kako bi se proširilo njihovo katalitičko djelovanje.

Cilj ovog doktorskog rada bio je ispitati biokatalitička svojstva enzima halogenhidrin-dehalogenaza skupine B, te mogućnost njihove primjene kao katalizatora u reakcijama enantioselektivnog otvaranja epoksida s različitim nukleofilima. U literaturi postoji nekoliko primjera ovog tipa reakcija kataliziranih poznatim enzimom HheB2 iz *Mycobacterium* sp. soj GP1, koje međutim rezultiraju racemičnim produktima. S druge strane, postoji samo jedan primjer biokatalize drugim poznatim enzimom iz iste skupine, HheB iz *Corynebacterium* sp. soj N-1074, kojom je pripremljen produkt visoke enantiomerne čistoće. U okviru ovog rada provedeno je opsežno ispitivanje katalitičke aktivnosti i enantioselektivnosti oba divlja tipa enzima na većem broju različitih supstrata i nukleofila. Enzimi HheB i HheB2 razlikuju se u samo četiri aminokiseline. Kako bi se utvrdilo koji od ogranaka je ključan za različita biokatalitička svojstva ova dva enzima, u istraživanje su dodatno uključene četiri genetski modificirane varijante enzima HheB2 s pojedinačno zamjenjenim aminokiselinama (HheB2-

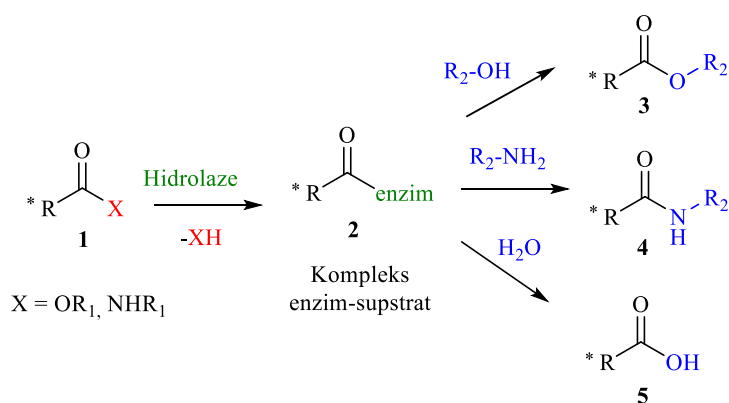
F36I, HheB2-T120A, HheB2-C124Y i HheB2-H125Q). Klasičnim metodama organske sinteze pripremljeni su svi supstrati koji nisu komercijalno dostupni, te očekivani produkti enzimskih reakcija u racemičnom obliku. Korištenjem navedenih spojeva razrađene su analitičke metode (GC/HPLC) nužne za praćenje tijeka enzimskih reakcija te određivanje enantiomerne čistoće dobivenih produkata. Biokatalitička ispitivanja provedena su s ukupno šest enzima, na 24 strukturno različita epoksida i sedam nukleofila. Eksperimentalna analiza nadopunjena je računalnim simulacijama koje su pokazale način vezanja supstrata u aktivno mjesto enzima te detaljan reakcijski mehanizam prevođenja epoksida do konačnih produkata.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Biokataliza u organskoj sintezi

Louis Pasteur otkrio je optičke izomere tartrane kiseline još 1848. godine,⁶ međutim utjecaj stereoizometrije na biološku aktivnost počinje se istraživati tek nakon zabrane upotrebe talidomida.⁷ Navedeni lijek koristio se u svrhu ublažavanja jutarnjih mučnina kod trudnica. Korišteni talidomid bio je smjesa optičkih izomera gdje je (*R*)-enantiomer ublažavao mučnine dok je (*S*)-enantiomer imao teratogeno djelovanje. Nakon ovog tragičnog događaja sinteza molekula u optički čistom obliku postaje jedan od glavnih prioriteta farmaceutске industrije.

Danas je velik dio sintetske organske kemije usmjeren upravo na sintezu molekula u enantiomerno čistom obliku. Enzimi poput hidrolaza kataliziraju reakcije hidrolize, transesterifikacije, formiranja estera **3** i amida **4**, te se često koriste za razdvajanje enantiomera putem kinetičke rezolucije (Shema 1). Glavni nedostatak ovih reakcija je iskorištenje željenog enantiomera u maksimalnom iznosu od 50 %. Pažljivim odabirom sintetskog puta moguće je istovremeno racemizirati slabije reaktivan enantiomer, te sav supstrat prevesti u jedan enantiomer i povećati iskorištenje produkta do 100 %, tzv. metoda dinamičke kinetičke rezolucije (DKR).⁸

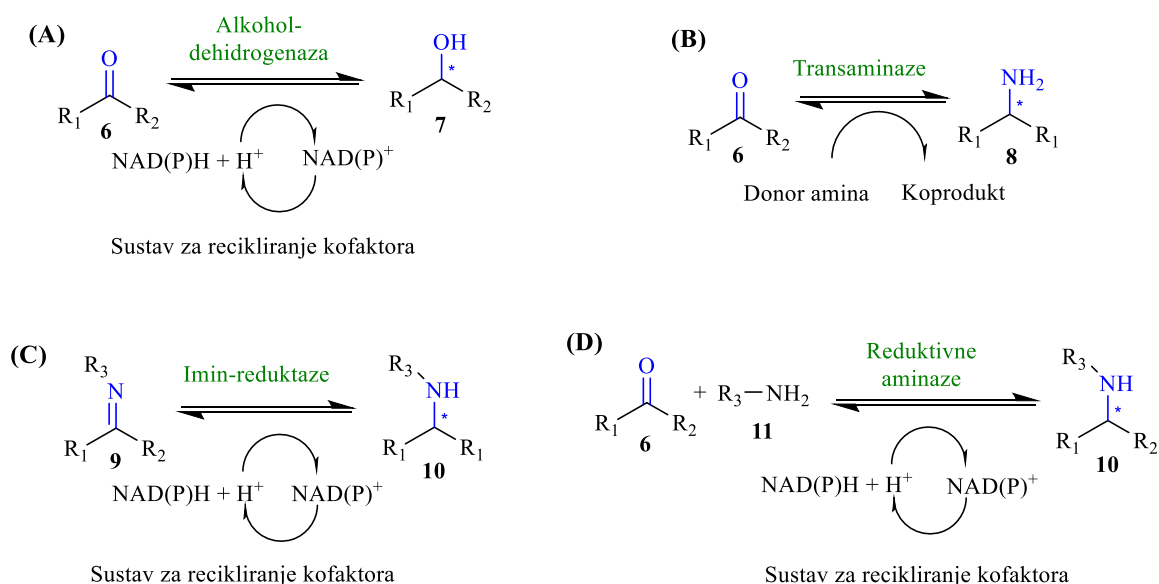


Shema 1. Kinetička rezolucija katalizirana hidrolazama⁹

Efikasniji pristup sintezi optički čistih molekula je asimetrična sinteza iz prokiralnih supstrata. Alkohol-dehidrogenaze kataliziraju sintezu alkohola **7** redukcijom ketona **6** (Shema 2 (A)).^{10,11} Kofaktor nikotinamid adenin dinukleotid, koji služi za prijenos vodika, koristi se u katalitičkim

količinama, a za njegovo recikliranje mogu se koristiti jeftini proton donori poput glukoze i 2-propanola.

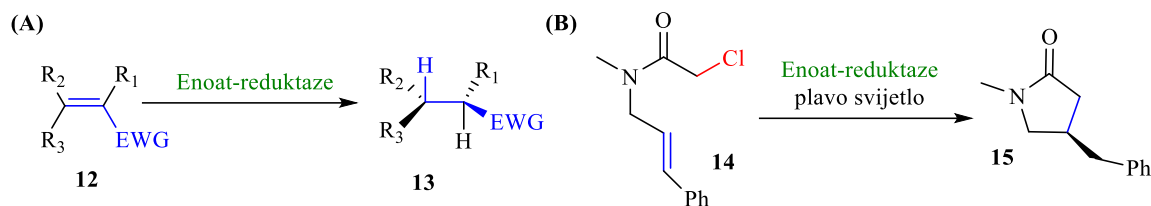
Transaminaze, imin-reduktaze i reduktivne aminaze mogu se koristiti za pripremu optički čistih amina **8** i **10**, kao što je prikazano na Shemi 2 (B-D).⁹ Optički čisti amini spadaju u klasu važnih biološki aktivnih molekula. Transaminaze kataliziraju pretvorbu aldehida i ketona u odgovarajuće amine **8** uz pomoć amin donora (Shema 2 (B)). Koriste se u sintezi ključnog intermedijera za pripremu Sitagliptina, odnosno aktivne farmaceutske komponente za antidijabetički lijek naziva Januvia.¹² Imin-reduktaze kataliziraju asimetričnu redukciju imina **9** (Shema 2 (C)), dok reduktivne aminaze kataliziraju asimetričnu reduktivnu aminaciju ketona **6** (Shema 2 (D)).



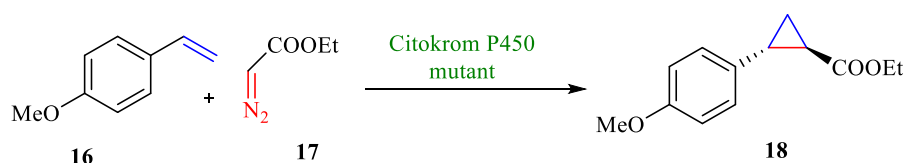
Shema 2. Primjeri enzimski katalizirane asimetrične sinteze⁹

Jedna od najvećih zabluda u biokatalizi glasi: Enzimaska aktivnost ograničena je samo na prirodne supstrate i prirodne reakcije.^{13, 14} Izlaganje enzima različitim reakcijskim uvjetima može rezultirati različitim transformacijama. Prirodna reakcija flavin ovisnih enoat-reduktaza je asimetrična redukcija aktiviranih alkena **12** (Shema 3 (A)).^{15, 16} Međutim, izlaganjem ovih enzima plavoj svjetlost dolazi do radikalne dehalogenacije koja je popraćena nastankom nove C-C veze (Shema 3 (B)).¹⁷ Prirodni enzimi često pokazuju niske aktivnosti prema neprirodnim supstratima, što se danas uspješno rješava proteinskim inženjerstvom. Enzimi citokrom P450 imaju široku reakcijsku primjenu, a najčešće se koriste za regioselektivnu oksidaciju C-H veza.^{18, 19} Usmjerenom evolucijom ovog enzima dobiven je mutant koji katalizira

diastereoselektivnu i enantioselektivnu ciklopropanaciju uz diazoestere **17** kao prekursore (Shema 4).^{20, 21}



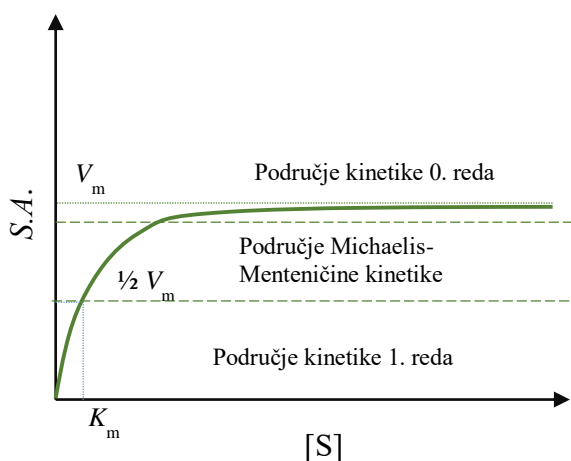
Shema 3. Prirodna (A) i neprirodna (B) transformacija katalizirana enoat-reduktazama⁹



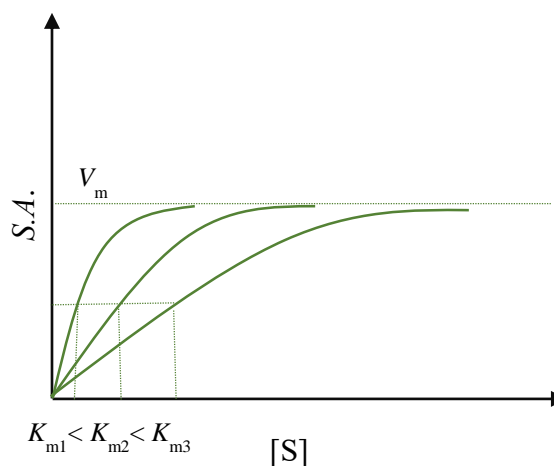
Shema 4. Kataliza neprirodne reakcije ciklopropanacije mutantom citokrom P450⁹

2.1.1. Michaelis-Menteničina kinetika

Enzimske reakcije obično slijede Michaelis-Menteničinu (MM) kinetiku koja je opisana grafičkim prikazom na Slici 1 i jednažbom (8). V_m predstavlja maksimalnu brzinu reakcije, a K_m Michaelisovu konstantu.



Slika 1. Grafički prikaz MM kinetike



Slika 2. Grafički prikaz MM krivulje za različite vrijednosti K_m

Karakteristična krivulja može se podijeliti na tri područja (Slika 1):

- Područje kinetike prvog reda gdje je brzina reakcije proporcionalna koncentraciji supstrata, $[S] \ll K_m$

- Područje Michaelis-Menteničine kinetike koje se nalazi između područja kinetike prvog i nultog reda
- Područje kinetike 0. reda gdje je brzina reakcije maksimalna ($v_0 = V_m$) i neovisna o koncentraciji supstrata, $[S] \gg K_m$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] \quad (1)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = -k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (2)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (4)$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad (5)$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (6)$$

$$[E] = [E_0] + [ES] \quad (7)$$

$$S. A. = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \quad (8)$$

$$V_m = k_2[E_0] \quad (9)$$

U prvom koraku enzimski katalizirane reakcije interakcijom enzima (E) i supstrata (S) nastaje kompleks enzim – supstrat (ES) koji se zatim raspada na produkt (P) i enzim (E) (Shema 5). Brzine svih reakcija dane su izrazima (1 – 4).

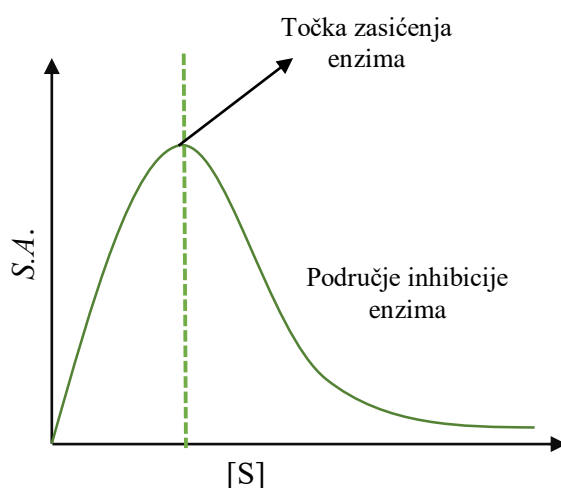


Shema 5. Mehanizam enzimski katalizirane reakcije²²

Pod pretpostavkom da je $d[ES]/dt = 0$, koncentracija nastalog kompleksa može se opisati jednadžbom (5), iz koje slijedi puni izraz za K_m (6). K_m vrijednost numerički izražava afinitet enzima prema supstratu i jednaka je koncentraciji supstrata pri kojoj brzina reakcije iznosi polovicu maksimalne brzine (Slika 1). Što je navedena vrijednost niža to je afinitet enzima prema supstratu veći, i reakcija će puno prije doseći maksimalnu brzinu (Slika 2). Koncentracija enzima u reakciji jednaka je zbroju početne koncentracije $[E_0]$ i koncentracije

nastalog kompleksa [ES], izraz (7). Uvrštavanjem izraza (7) u izraz (5) dobiva se jednažba specifične aktivnosti ($S.A.$) enzima (8), koja opisuje njegovu aktivnost po jedinici mase.²²

Jedan od glavnih problema u biokatalizi je inhibicija enzima uzrokovana različitim molekulama prisutnim u reakcijskoj smjesi. Ukoliko u reakciji dolazi do inhibicije enzima supstratom nakon točke zasićenja brzina reakcije naglo opada (Slika 3).



Slika 3. Grafički prikaz MM krivulje pri inhibiciji enzima određenom koncentracijom supstrata

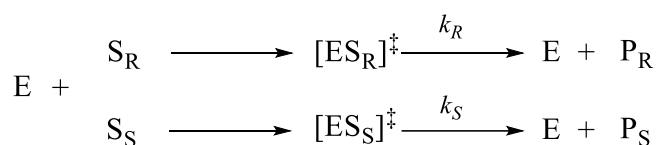
Inhibicija enzima može biti reverzibilna i ireverzibilna. Kod ireverzibilne inhibicije molekula koja djeluje kao inhibitor posjeduje reaktivne funkcionalne skupine pomoću kojih tvori kovalentne veze s aminokiselinskim ostacima proteina. U tom slučaju enzimska aktivnost je nepovratno izgubljena. Kod reverzibilne inhibicije molekula inhibitora veže se vodikovim, ionskim ili hidrofobnim vezama, te se enzimska aktivnost može vratiti uklanjanjem inhibitora. Ovdje se razlikuju četiri tipa inhibicije:²³

- **Kompetitivna** – inhibitor je sličan supstratu te se natječe s njim u aktivnom mjestu za vezanje. Za ovu vrstu inhibicije karakteristično je da se graf MM kinetike pomiče u desno, odnosno povećava se K_m vrijednost i potrebna je veća koncentracija supstrata da bi se postigla polovica maksimalne brzine. V_m vrijednost ostaje nepromijenjena.
- **Nekompetitivna** – inhibitor se veže na mjesto različito od aktivnog mjesta pri čemu može promijeniti strukturu enzima i pritom mu smanjiti aktivnost. U ovom slučaju K_m vrijednost ostaje nepromijenjena dok se V_m vrijednost smanjuje.
- **Antikompetitivna** – inhibitor se veže na već nastali kompleks ES pri čemu se K_m i V_m smanjuju.

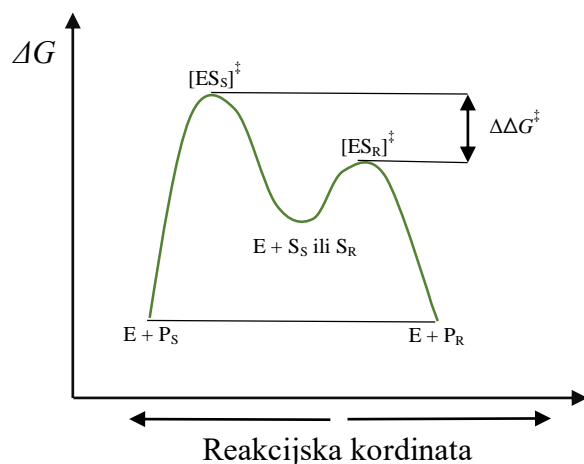
- **Miješana** – inhibitor se može vezati na sam enzim ili već nastali kompleks ES.

2.1.2. Enzimaska kinetička i dinamička kinetička rezolucija

Kao i svi katalizatori, tako i enzimi ubrzavaju kemijsku reakciju na način da snižavaju energiju aktivacije reakcije. Za sintetsku kemiju najvažnije svojstvo enzima je njihova sposobnost razlikovanja enantiomera. To svojstvo proizlazi iz strukture aktivnog mjesta. Zbog kiralnog okruženja u aktivnom mjestu nastali kompleksi enzima i supstrata pojedinih enantiomera imaju različite energije prijelaznog stanja ($[ES_R]^\ddagger$ i $[ES_S]^\ddagger$) (Slika 4). Razlika u energiji aktivacije dvaju prijelaznih stanja ($[ES_R]^\ddagger < [ES_S]^\ddagger$) uzrok je bržeg reagiranja jednog enantiomera u odnosu na drugi. Upravo su različite reakcijske brzine ($k_R \gg k_S$) reakcija s pojedinim enantiomerima glavni preduvjet za uspješnu kinetičku rezoluciju (Shema 6). Veličina razlike u energiji aktivacija ($\Delta\Delta G^\ddagger$) direktna je mjera za enantioselektivnost reakcije.¹⁴



Shema 6. Enzimski katalizirana kinetička rezolucija



Slika 4. Dijagram energije enzimski katalizirane enantioselektivne reakcije¹⁴

Efikasnost kinetičke rezolucije (KR) izražava se enantiomernim omjerom (E) koji je definiran omjerom specifičnih konstanti brže ($V_m(S_R)$, $K_m(S_R)$) i sporije ($V_m(S_S)$, $K_m(S_S)$) reagirajućeg enantiomera supstrata (izraz (10), Shema 6). Ako se pretpostavi da je reakcija ireverzibilna te da nema inhibicije produktom, E vrijednost može se izračunati iz eksperimentalno procijenjenih parametara, kao što su konverzija supstrata u produkt (c) i enantiomerni višak

produkta ($e.v.p$) odnosno supstrata ($e.v.s$), (izraz (11)). Enatiomerni višak ($e.v.$) definira se kao kvocijent razlike i sume pojedinih enantiomera (izrazi (13) i (14)).²⁴

$$E = \frac{\ln(S_R/S_{R0})}{\ln(S_S/S_{S0})} = \frac{V_m(S_R)/K_m(S_R)}{V_m(S_S)/K_m(S_S)} \quad (10)$$

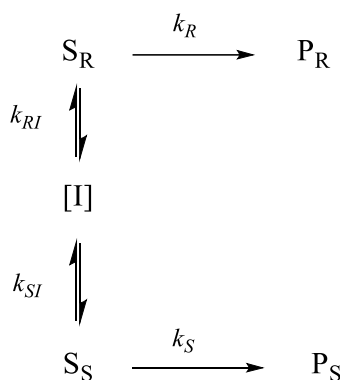
$$E = \frac{\ln[1-c(1+ev_p)]}{\ln[1-c(1-ev_p)]} = \frac{\ln[(1-c)(1-ev_s)]}{\ln[(1-c)(1+ev_s)]} \quad (11)$$

$$c = 1 - \frac{S_R+S_S}{S_{R0}+S_{S0}} \quad (12)$$

$$e.v.p = \frac{|P_R|-|P_S|}{|P_R|+|P_S|} \quad (13)$$

$$e.v.s = \frac{|S_S|-|S_R|}{|S_S|+|S_R|} \quad (14)$$

Glavni nedostatak kinetičke rezolucije je maksimalno moguće iskorištenje od 50 %. Metoda dinamičke kinetičke rezolucije (DKR) kombinira kinetičku rezoluciju s *in situ* racemizacijom polaznog supstrata i time omogućava transformaciju oba enantiomera supstrata u jedan enantiomer produkta u teorijskom iskorištenju od 100 % (Shema 7).²⁵

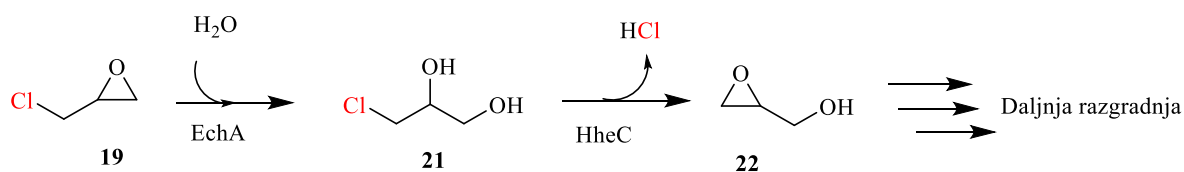


Shema 7. Enzimski katalizirana DKR²⁵

Preduvjet za uspješnu DKR je da je enantioselektivnost reakcije $E > 20$, te da je brzina racemizacije veća ili barem jednaka brzini enzimske reakcije. Jednako je važno da su racemizacija i kinetička rezolucija kompatibilne i da se mogu provoditi u istim reakcijskim uvjetima, kao i da katalizator koji se koristi za racemizaciju ne reagira s produktom reakcije. Racemizacija se može postići kemijskim katalizatorima, biokatalizatorima, ili se može odvijati spontano.

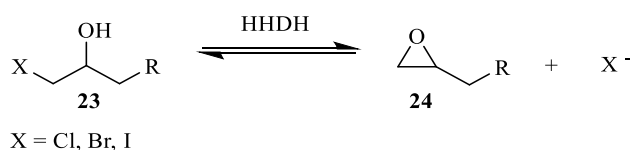
2.2. Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH, EC 4.5.1.X)

Halogenhidrin-dehalogenaze spadaju u skupinu enzima koje kataliziraju reakciju formiranja epoksida uklanjanjem halogenidnog iona i protona iz vicinalnih halogenhidrina. Navedeni enzimi otkriveni su u svega nekoliko bakterijskih sojeva, u kojima su zaduženi za biorazgradnju ksenobiotika poput epiklorhidrina (**19**), 1,3-diklor-2-propanola (**20**) i 1,2-dibromoetana. Halogenirani organski spojevi imaju široku primjenu u proizvodnji insekticida, fungicida, herbicida i intermedijera za farmaceutike. Kemijskom industrijom uvode se u prirodu i time onečišćuju okoliš.^{26, 27} Toksični su i vrlo stabilni zbog čega se ne raspadaju spontano u okolišu i predstavljaju prijetnju za ljudsko zdravlje. HHDH sudjeluju u njihovoj razgradnji cijepanjem veze ugljik-halogen.²⁸ Na Shemi 8 prikazana je razgradnja **19** u dvije slijedne reakcije katalizirane s dva različita enzima. U prvom koraku **19** se hidrolizira pomoću epoksid-hidrolaze (EchA) pri čemu nastaje 3-klor-1,2-propandiol (**21**). HHDH iz *Agrobacterium radiobacter* soj AD1 (HheC) zatim katalizira dehalogenaciju i intramolekularno zatvaranje prstena pri čemu nastaje glicidol (**22**).²⁹



Shema 8. Biokatalitička razgradnja epiklorhidrina (**19**)²⁹

Pojavu enzimske dehalogenacije prvi su opisali Castro i Bartnicki 1968. godine. Proučavajući bakterijski soj *Flavobacterium*, izoliran iz uzorka zemlje, uočili su razgradnju 2,3-dibromo-1-propanola.³⁰ Pročišćeni enzim uklanjao je bromidne i kloridne ione iz vicinalnih halogenhidrina **23** formirajući pritom odgovarajuće epoksidge **24** (Shema 9). Primjećeno je da se reakcije zatvaranja odvijaju specifičnom *trans*-eliminacijom protona i halogenidnog iona. Enzim katalizira i obrnutu reakciju, odnosno reakciju otvaranja epoksidnog prstena terminalnim napadom bromidnog ili kloridnog iona.³¹ Nedugo nakon toga otkriveni su novi bakterijski sojevi s HHDH enzimima.^{32,33}



Shema 9. Prirodne reakcije katalizirane HHDH enzimima

2.2.1. Podjela HHDH

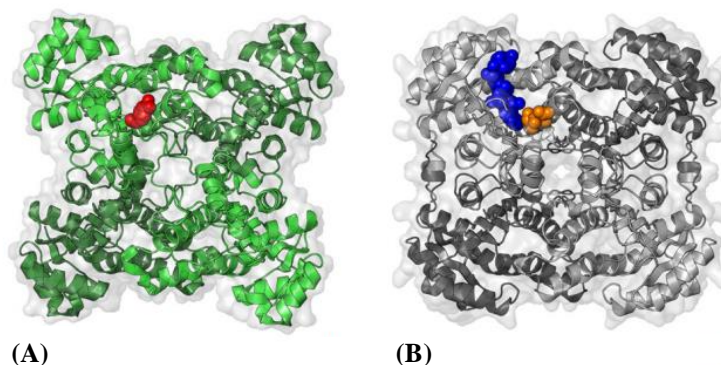
Sve do početka 21. stoljeća bio je poznat mali broj HHDH, koje su na temelju sličnosti aminokiselinske sekvence i profila aktivnosti bile podjeljene u tri grupe (A, B i C).²⁹ Podudarnost sekvenci enzima u istoj grupi iznosi 88 – 98 %, dok je sličnost među grupama 19 – 33 %. Dva enzima pronađena u grupi A (HheA2 iz *Arthobacter* sp. soj AD2²⁹ i HheA iz *Corynebacterium* sp. soj N-1074³⁴) preferiraju duge alifatske lance (C4-C5) i aromatske halogenhidrine pokazujući pritom visoku regioselektivnost i nisku enantioselektivnost.³⁵ Enzimi grupe B (HheB iz *Corynebacterium* sp. soj N-1074³⁴ i HheB2 iz *Mycobacterium* sp. soj GP1²⁹) pokazuju nižu aktivnost od enzima iz grupe A i osrednju enantioselektivnost. C grupa sastoji se od dvije identične HheC sekvence iz *Agrobacterium radiobacter* AD1²⁹ i *Rhizobium* sp. soj NHG3³⁶. U usporedbi s ostalim enzimima, HheC iz *Agrobacterium radiobacter* AD1 pokazuje visoku aktivnost i stereoselektivnost prema aromatskim supstratima. Od 2014. godine do danas otkriven je velik broj novih enzima čime se klasifikacija HHDH proširila za četiri dodatne skupine (D, E, F i G), a broj poznatih HHDH višestruko se povećao (Tablica 2).³⁷

Tablica 2. Popis danas poznatih HHDH³⁷

HHDH	Izvor
HheA	<i>Corynebacterium</i> sp.
HheA2	<i>Arthrobacter</i> sp. soj AD2
HheA3	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1
HheA4	<i>Arthrobacter</i> sp. soj JBH1
HheA5	<i>Tistrella mobilis</i> KA081020-065
HheB	<i>Corynebacterium</i> sp.
HheB2	<i>Mycobacterium</i> sp. soj GP1
HheB3	Morski metagenom (<i>Ralstonia</i>)
HheB4	Morski metagenom (<i>Shewanwlla</i>)
HheB5	Morski metagenom (<i>Burkholderia</i>)
HheB6	Morski metagenom (<i>Sorangium</i>)
HheB7	Morski metagenom (<i>Bradyrhuiobium</i>)
HheC	<i>Agrobacterium radiobacter</i> AD1
HheD	<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB
HheD2	Gamaproteobacterium soj HTCC2207
HheD3	<i>Methylibium petroleiphilium</i> PM1
HheD4	Morski metagenom (<i>Haliangium</i>)
HheD5	<i>Thaurea</i> sp. Strain MZ1T
HheE	Morski metagenom (<i>Acaryochloris</i>)
HheE2	Morski metagenom (<i>Sorangium</i>)
HheE3	Morski metagenom (<i>Burkholderia</i>)
HheE4	Morski metagenom (<i>Catenulispora</i>)
HheE5	<i>Gamaproteobacterium</i> soj IMCC3088
HheF	Nekultivirana bakterija
HheG	<i>Ilumatobacter coccineus</i> YM16-304

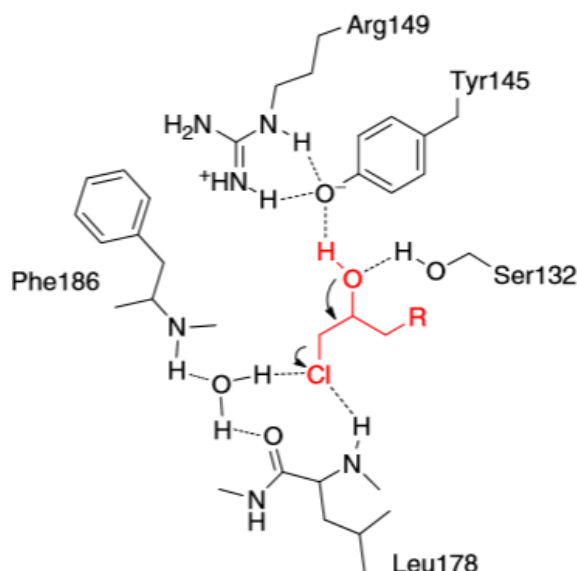
2.2.2. Struktura, mehanizam i kinetička istraživanja

Enzim HheC iz *Agrobacterium radiobacter* AD1 korišten je kao model za brojna kinetička³⁸, mutagenetska^{29, 39} i strukturna^{39, 40} istraživanja čiji je glavni cilj bio razumijevanje reakcijskog mehanizma i podrijetla HHDH. Na temelju strukturne i sekvencionalne sličnosti zaključeno je da HHDH spadaju u obitelj kratko-lančanih dehidrogenaza/reduktaza (SDR). Homoteramerne su građe koju čine dva para dimera, molekulske mase između 20 – 35 kDa (Slika 5 (A)). Za razliku od SDR enzima, HHDH ne kataliziraju reakcije redukcije i ne vežu nikotinamid kao kofaktor (označen plavom bojom na Slici 5 (B)). Mjesto za vezanje kofaktora zamijenjeno je anionskim džepom koji služi za stabilizaciju ili aktivaciju nukleofila.



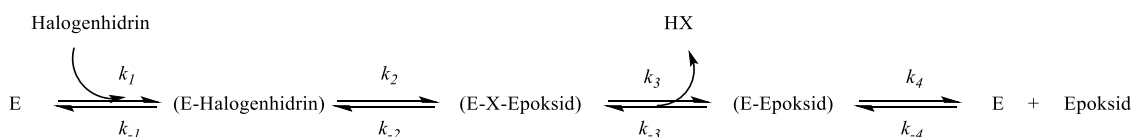
Slika 5. Strukture SDR i HHDH enzima: (A) HheC iz *Agrobacterium radiobacter* AD1 (PBD 1ZMT)⁴⁰, (*R*)-*p*-nitrostiren oksid (crveno) i (B) glukonat 5-hidrogenaza iz *Streptococcus suis* (PBD 3CXT)⁴¹, *D*-glukonat (narančasto), NADP⁺ (plavo)

Glavna sličnost ovih enzima vidi se u strukturi aktivnog mjesta koje se sastoji od katalitičke trijade odnosno tri glavne aminokiseline: Ser/Tyr/Arg (kod SDR enzima umjesto Arg je Lys). HHDH ima četiri aktivna mjesta, u svakoj podjedinici jedno. Slika 6 prikazuje reakcijski mehanizam na primjeru HheC. Serin i tirozin stvaraju vodikove veze s hidroksilnom skupinom supstrata, dok arginin snižava pKa vrijednost tirozinu koji deprotonira hidroksilnu skupinu. Oslobođeni proton zatim se prenosi u otapalo pomoću mreže vodikovih veza koja je načinjena od bočnih lanaca i molekula vode. Serin stabilizira negativni naboj nastalog oksoaniona, što dovodi do nukleofilnog napada na susjedni ugljikov atom i intramolekularne S_N2 reakcije. Posljedično dolazi do cijepanja veze ugljik – halogen pri čemu se oslobođeni halogenidni ion stabilizira u anionskom džepu. Točnost reakcijskog mehanizma potvrđena je i kvantno-mehaničkim izračunima.⁴²



Slika 6. Aktivno mjesto i reakcijski mehanizam HHDH enzima: Katalitička trijada HhcC iz *Agrobacterium radiobacter* AD1: Ser132/Tyr145/Arg149 (PBD 1PXO)³⁹

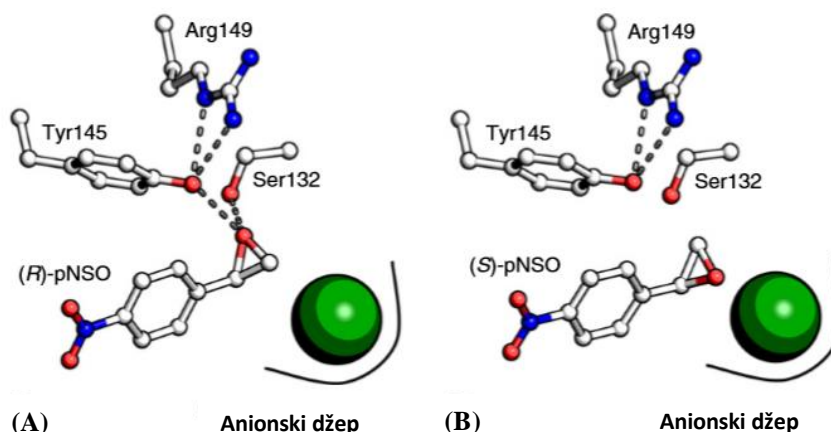
Ukupni reakcijski mehanizam enzimski katalizirane reakcije može se prikazati kao na Shemi 10. U prvom koraku reakcije dolazi do formiranja kompleksa enzim – halogenhidrin (k_1), nakon čega slijedi nastajanje kompleksa enzim – halogen – epoksid (k_2). Nastali kompleks se polaganim otpuštanjem halogena raspada na kompleks enzim – epoksid (k_3), te u zadnjem koraku dolazi do oslobađanja epoksida (k_4).⁴³ Kinetička ispitivanja pokazala su da je upravo korak otpuštanja halogenidnog iona (k_3) limitirajući korak reakcije.³⁸ S obzirom da ravnotežnim reakcijama poput ove upravlja termodinamika⁴⁴ ravnotežu je moguće pomaknuti u korist produkta dodavanjem jednog od reaktanta u suvišku, mijenjanjem reakcijskih uvjeta ili uklanjanjem jednog od produkata iz reakcijske smjese. Iz tog razloga enzimске reakcije se često spajaju u „one-pot“ kaskadne reakcije, gdje produkt jedne reakcije služi kao supstrat druge reakcije uklanjajući se tako iz reakcijske smjese, što u konačnici dovodi do promjene u ravnoteži.



Shema 10. Mehanizam nastanka epoksidnog prstena³⁸

Mehanizam otvaranja epoksida je obrnut. U ovom slučaju nukleofilni napad halogenidnog iona u kombinaciji s protoniranjem kisika dovodi do formiranja veze ugljik – halogen i hidroksilne grupe. Proton se uvodi iz otapala, te nastaje hidroksilna skupina koja je sada stabilizirana pomoću Ser132. Anionski džep može aktivirati različite nukleofile za napad na terminalnu poziciju epoksidnog prstena, uključujući azid i cijanid.³⁹

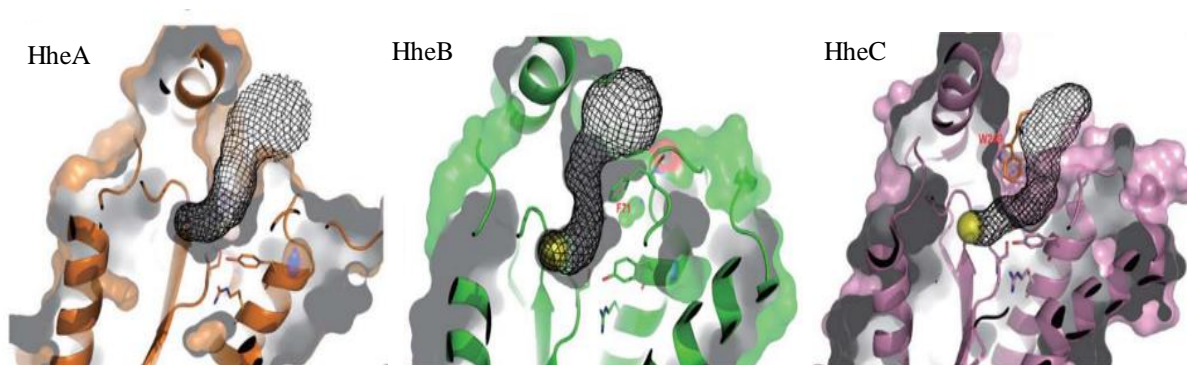
Od svih do sada poznatih HHDH, HheC je enzim koji pokazuje visoku (*R*)-enantioselektivnost prema supstratima, zbog čega je i najviše korišten u sintezi.⁴⁵ Kristalne strukture HheC određene s oba enantiomera *p*-nitrostiren oksida pokazale su da je nepovoljan način vezanja (*S*)-epoksida razlog visoke (*R*)-enantioselektivnosti ovog enzima.⁴⁰ Iz Slike 7 koja pokazuje vezanje (*R*)- i (*S*)-enantiomera jasno se vidi jednak položaj aromatskog prstena oba enantiomera supstrata u aktivnom mjestu, te različita orijentacija epoksidnog prstena. Kisik epoksidnog prstena (*R*)-enantiomera orijentiran je prema Tyr145 i Ser132 što omogućava interakcije ključne za katalizu, dok je kisik (*S*)-epoksida orijentiran prema halogenidnom džepu što onemogućava produktivno vezanje.



Slika 7. Produktivan i neproduktivan položaj vezanja *p*-nitrostiren oksida u aktivnom mjestu HheC: (A) produktivno vezanje (*R*)-*p*-nitrostiren oksida, (B) neproduktivno vezanje (*S*)-*p*-nitrostiren oksida³⁹

Usporedba struktura HheC³⁹, HheA2⁴⁶, HheA⁴⁷ i HheB⁴⁷ pokazala je da svi enzimi imaju jednaku homotetramernu građu i slično aktivno mjesto. HheC pokazuje vrlo visoku enantioselektivnost prema aromatskim supstratima, dok HheB i HheA2 pokazuju znatno slabije enantioselektivnosti. 2015. godine Watanabe i suradnici analizirali su veličinu ulaznog tunela sva tri enzima.⁴⁷ Rezultati analize (Slika 8) pokazali su da HheA ima najveći unutarnji

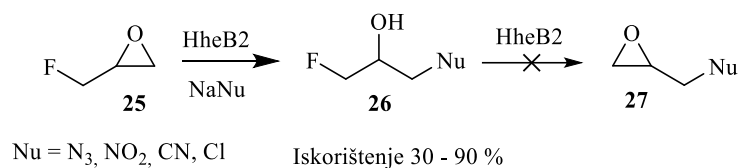
polumjer ulaznog tunela što bi moglo objasniti njegovu nisku enantioselektivnost. Veličine ulaznih tunela HheB i HheC imaju približno jednake vrijednosti.



Slika 8. Prikaz veličine ulaznih tunela HheA, HheB, HheC⁴⁷

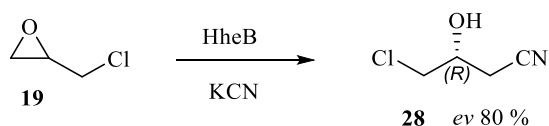
2.3. HDDH: Grupa B

HheB iz *Corynebacterium* sp. soj N-1074 i HheB2 iz *Mycobacterium* sp. soj GP1 prvi su enzimi otkriveni u B grupi HDDH. HheB2 izoliran je i biokemijski okarakteriziran još 1999. godine,⁴⁸ međutim njegov biokatalitički potencijal nakon toga nije dalje istražen. Razlog tome je niska enantioselektivnost koju je pokazao na manjem broju ispitanih supstrata.^{49, 50} Enzim katalizira konverziju *para*-nitro-2-bromo-1-feniletanola u odgovarajući epoksid s malom prednošću prema (*S*)-enantiomeru ($E < 3$).⁵¹ Nekoliko godina kasnije isti enzim ispitan je u reakcijama cijanolize strukturno različitih epoksida gdje je pokazao nisku do srednju enantioselektivnost ($E = 1 - 10$), ali visoku regioselektivnost prema alifatskim supstratima.⁴⁹ 2018. godine ispitan je u reakcijama otvaranja epifluorhidrina (**25**) s različitim nukleofilima (Shema 11).⁵² Reakcije su pokazale očekivano nisku enantioselektivnosti zbog čega je istraživanje usmjereno na sintezu racemičnih alkohola **26**. β -supstituirani alkoholi **26** pripremljeni su s visokom regioselektivnošću u iskorištenju od 30 do 90 %. Također, uočeno je da enzim ne može katalizirati reakciju zatvaranja epoksidnog prstena uklanjajući fluoridni ion (Shema 11). Na temelju malog broja navedenih istraživanja HheB2 je okarakteriziran kao enzim visoke regioselektivnosti, ali niske enantioselektivnosti.^{49, 50, 52, 53}



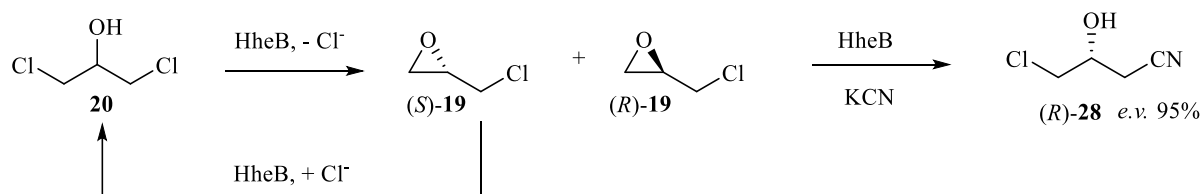
Shema 11. Reakcije **25** katalizirane HheB2 iz *Mycobacterium* sp. soj GP1⁵²

1994. godine Nakamura i suradnici pokazali su da HheB iz *Corynebacterium* sp. soj N-1074 katalizira enantioselektivnu transformaciju **19** u (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitril (**28**) (Shema 12).³³



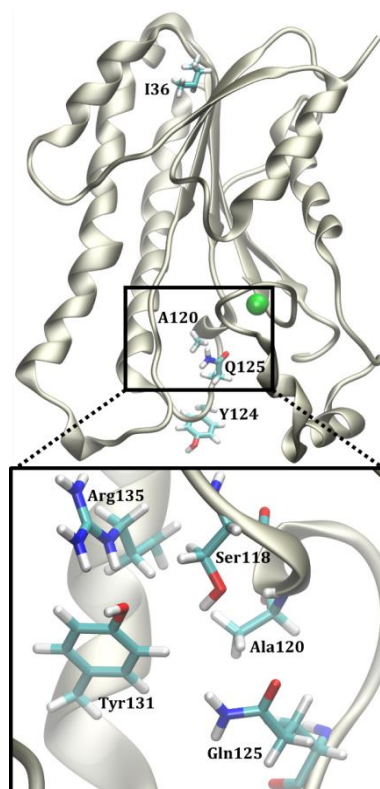
Shema 12. HheB katalizirana konverzija **19** u (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitril (**28**)^{33,54}

HHDH imaju sposobnost kataliziranja reakcija zatvaranja halogenhidrina u epoksid i otvaranja epoksidnog prstena. Povezivanjem navedenih reakcija, odnosno desimetrizacijom alkohola **20** dobiven je (*R*)-**28** u višem iskorištenju i enantiomernom suvišku (Shema 13). Radi se o prvim istraživanjima enantioselektivnog otvaranja epoksida kataliziranih HHDH-enzimima. U prvom koraku dolazi do selektivnog zatvaranja alkohola u epoksid pri čemu nastaje pretežito (*R*)-**19**. Enantiomerno obogaćeni (*R*)-**19** zatim se prevodi u produkt (*R*)-**28** (>99 % *e.v.*). Kloridni ioni koji se otpuštaju zatvaranjem epoksidnog prstena djeluju katalitički, te omogućuju racemizaciju nezireagirano (*S*)-**19** u početni alkohol **20**. U konačnici se dobiva produkt (*R*)-**28** više enantiomerne čistoće i iskorištenja, nego kod reakcije koja kreće iz racemičnog supstrata **19**.



Shema 13. Desimetrizacija **20** katalizirana HheB⁵⁴

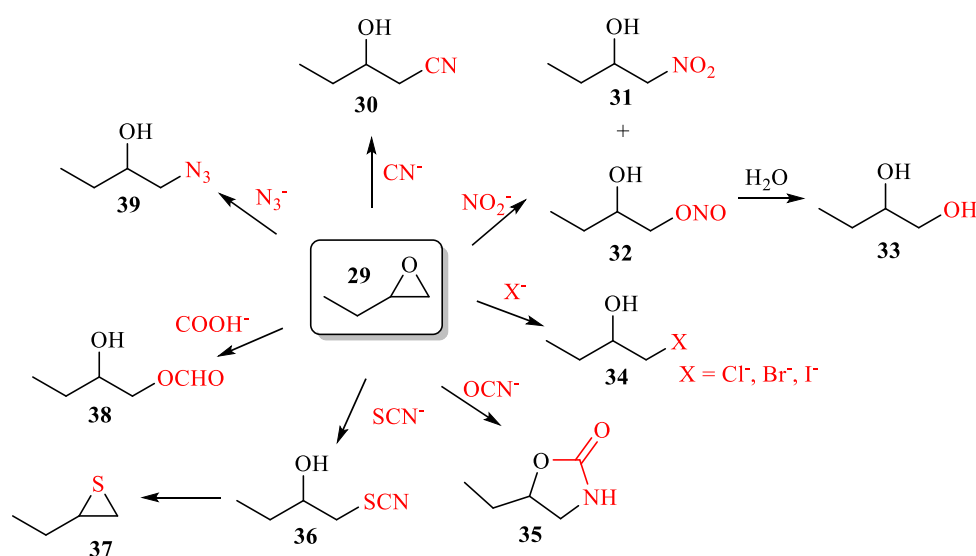
Korištenjem različitih metoda mutagenaze konstruirani su HheB mutanati s povećanom enantioselektivnosti u reakciji natrij cijanida s 1,3-diklor-2-propanolom **20**.⁵⁵ Određivanjem aminokiselinske sekvence oba enzima zapažena je visoka homologija između HheB i HheB2. Podudarnost njihovih sekvenci iznosi 95 %; enzimi se razlikuju u samo četiri aminokiseline HheB/HheB2: Ile36/Phe36, Ala120/Thr120, Tyr124/Cys124, Gln125/His125.⁴⁷ Tri aminokiselinska ogranka (120, 124 i 125) nalaze se u blizini katalitičke trijade, dok se jedan ogranak (36) nalazi na površini enzima (Slika 9).



Slika 9. Prikaz aktivnog mjesta HheB s označenim katalitičkim aminokiselinama (Ser118, Tyr131, Arg135) i ograncima (Ile36, Ala120, Tyr124, Gln125) koji se razlikuju u dva enzima

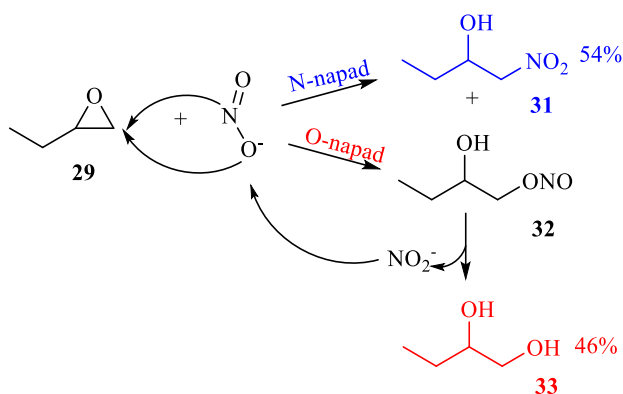
2.4. Reakcije katalizirane HHDH enzimima

Za razliku od reakcija zatvaranja halogenhidrina, reakcije otvaranja epoksida sintetski su znatno zanimljivije. Regioselektivnim i enantioselektivnim otvaranjem epoksida nastaju različiti 1,2-difunkcionalizirani spojevi **30** – **39** (Shema 14). Bitno svojstvo HHDH je sposobnost stvaranja novih C-C, C-N, C-O, C-S veza otvaranjem epoksida uz širok spektar nukleofila (azida, nitrita, cijanida, cijanata, tiocijanata, formijata te halogenidnih iona (Shema 14)).⁵⁶

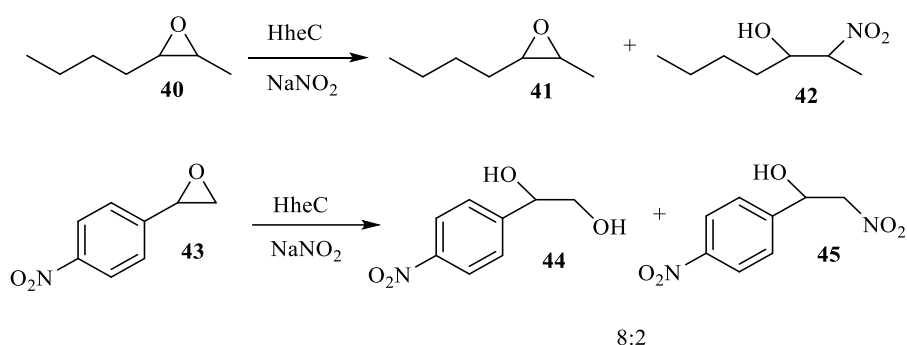


Shema 14. Pregled katalitičkog djelovanja HHDH u reakcijama otvaranja 1,2-epoksibutana (**29**)⁵⁶

U reakcijama s azidnim ionom nastaju isključivo sekundarni azido-alkoholi koji se postupcima klasične organske sinteze lako prevode u odgovarajuće amino-alkohole i triazolne jezgre. Korištenjem cijanidnog iona dolazi do nastanka nove C-C veze i sekundarnih cijano-alkohola. Reakcije s nitritnim ionom mogu se odvijati napadom dušikovog ili kisikovog atoma pri čemu nastaje smjesa produkata. Napadom preko dušika nastaju β -supstituirani nitro-alkoholi **31**, dok napadom preko kisika nastaju nestabilni nitratni esteri **32** koji brzo hidroliziraju u odgovarajuće diole **33** (Shema 15). O tome do kojeg će napada doći najčešće ovisi o strukturi samog epoksida. U reakciji epoksida **40** kao većinski produkt nastaje nitroalkohol **42**, dok je diol **44** glavni produkt u reakcijama s aromatskim epoksidima **43** (Shema 16).^{56, 57}

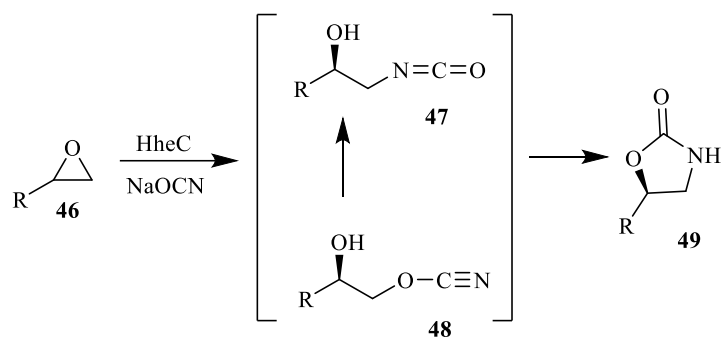


Shema 15. Mehanizam reakcije **29** s nitritnim ionom



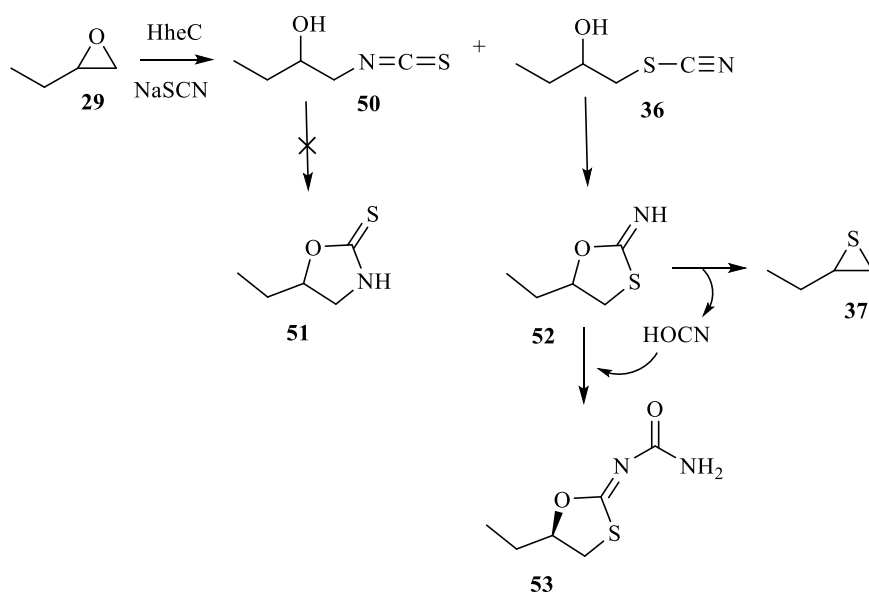
Shema 16. Prikaz nastalih produkata u reakciji strukturno različitih epoksida s nitritnim ionom^{56, 57}

Reakcije s cijanatnim ionom također se mogu odvijati na dva načina, napadom preko dušikovog ili kisikovog atoma. Napadom dušika nastaju nestabilni β -hidroksi-izocijanati **47**, dok napadom kisikovog atoma nastaju β -hidroksicijanati **48** koji izomeriziraju u odgovarajuće β -hidroksi-izocijanate **47**. Nastali β -hidroksi-izocijanati **47** vrlo brzo cikliziraju u oksazolidinone **49** (Shema 17). S obzirom na nestabilnost međuprodukata i nemogućnost njihove izolacije točan mehanizam ovih reakcija nije poznat.



Shema 17. Mehanizam reakcija s cijanatnim ionom⁸

Slično reakcijama s nitritom i cijanatom, reakcije s tiocijanatnim ionom mogu se odvijati na dva načina: napadom dušikovim ili sumporovim atomom. Istraživanja su pokazala da se ova reakcija odvija isključivo preko napada sumporovim atomom pri čemu nastaju tiocijanat-alkoholi **36**.⁵⁶ Zbog visoke nestabilnosti nastali tiocijanati spontano cikliziraju, a kao konačni i većinski produkt nastaje tiiran **37** (Shema 18). Tiirani imaju široku primjenu u industriji aroma.⁵⁸



Shema 18. Mehanizam reakcije **29** s tiocijanatnim ionom

2.4.1. Priprava azido- i cijano-alkohola

HHDH mogu cijepati i stvarati različite veze, što otvara mogućnost provođenja velikog broja reakcija i sinteze niza različitih produkata. Reakcije otvaranja epoksida s azidnim ionom kao nukleofilom dovode do stvaranja vicinalnih azido-alkohola, koji su bitni prekursori za sintezu 1,2-amino-alkohola i hidrositriazola. Nekatalizirane reakcije prati niska regioselektivnost, pogotovo u slučaju aril-supstituiranih epoksida, što u sintezi dovodi do nastanka smjese regioizomera. Regioselektivnost azidolize derivata stiren oksida određuju elektronski faktori. Fenilna grupa stabilizira formiranje pozitivnog naboja na benzilnom ugljikovom atomu ($C\alpha$) u prijelaznom stanju, zbog čega je favoriziran napad na $C\alpha$ umjesto na terminalni ugljikov atom ($C\beta$). Kemijskom reakcijom između stiren oksida i natrijevog azida na sobnoj temperaturi i neutralnom pH, bez prisutnosti enzima nastaje smjesa azido-alkohola u omjeru $C\alpha:C\beta = 98:2$.⁵⁹ U reakciji kataliziranoj s enzimom HheC omjer produkata je obrnut ($C\alpha:C\beta = 2:98$). Spontana kemijska reakcija dolazi do izražaja ako se enzim koristi u niskim katalitičkim količinama, pri čemu raste udio α -regioizomera. Na preparativnoj skali kemijska reakcija može se usporiti laganim dodavanjem natrijevog azida.⁶⁰

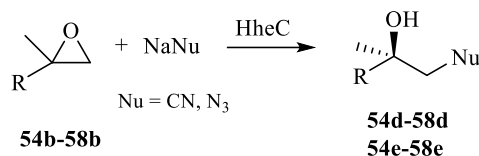
U klasičnoj sintezi, regioselektivnost reakcije obično se postiže korištenjem Lewisovih kiselina ili niskog pH, što dovodi do stvaranja eksplozivnih metal-azida ili eksplozivne dušikovodične kiseline. Za postizanje prihvatljivog industrijskog iskorištenja koriste se veliki suvišci azidnih soli, a njihova korozivna priroda zahtjeva posebne reaktore od nehrđajućeg čelika obložene staklom. Korištenje azida u kemijskoj industriji predstavlja izazov radi toksičnosti i rizika od eksplozija. Sve navedeno znatno poskupljuje proces proizvodnje spojeva funkcionaliziranih azidnom skupinom. S druge strane, enzimske reakcije otvaranja epoksida nude ekološki prihvatljivu alternativu metal-kataliziranim reakcijama. One se provode u vodi pri neutralnom pH uz natrijev azid u malom suvišku od samo 10 %. Nastali produkt može se lako izolirati ili *in situ* prevoditi u triazole⁶¹ i amino-alkohole. Optički čisti β -amino-alkoholi koriste se u asimetričnoj sintezi β -blokatora.⁶²

U usporedbi sa sintezom primarnih i sekundarnih alkohola, postoji manji broj metoda koje se mogu koristiti za pripravu tercijarnih alkohola.⁶³ Biokatalitička metoda rezolucije racemičnih alkohola često se provodi s lipazama,⁶⁴ međutim većina lipaza ne prihvaća tercijarne alkohole kao supstrate. Otvaranje 2,2-disupstituiranih epoksida **54b** – **58b** uz HheC i cijanid ili azid kao nukleofil mogu se pripraviti β -supstituirani tercijarni alkoholi **54d** – **58d** i **54e** – **58e**. U usporedbi s monosupstituiranim epoksidima **54a** – **58a**, reakcije disupstituiranih epoksida **54b** – **48b** znatno su enantioselektivnije ($E > 200$) (Tablica 3). Serija metil-supstituiranih derivata **54b** – **58b** prevedena je u tercijarne cijano- **54d** – **58d** i azido-alkohole **54e** – **58e** s enantiomernim suviškom većim od 99 % (Tablica 4).⁶⁵

Tablica 3. Kinetička rezolucija mono- **54a** – **58a** i disupstituiranih epoksida **54b** – **58b** katalizirana HheC⁶⁵

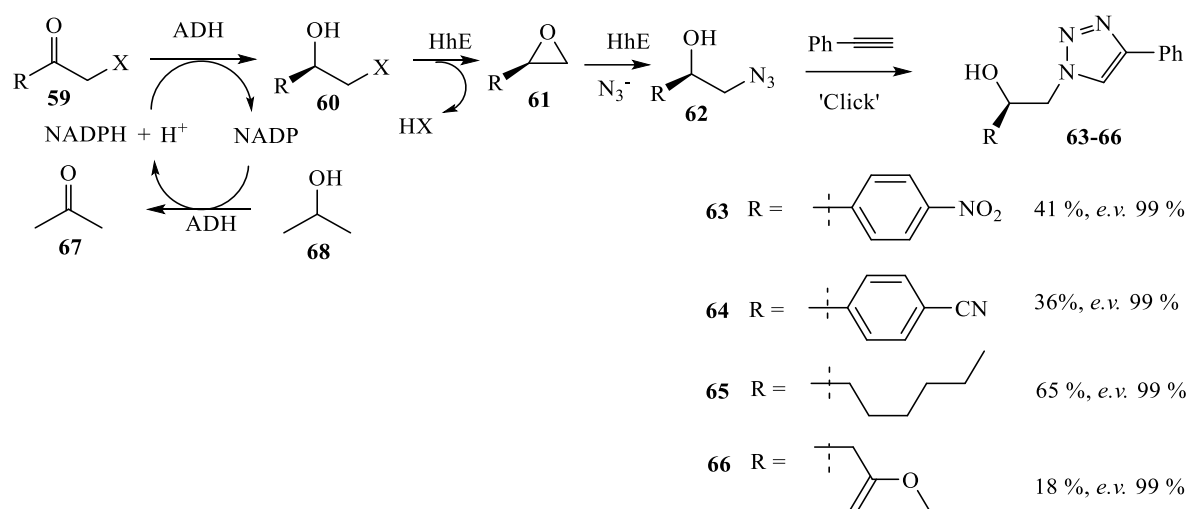
$$\begin{array}{ccc} \begin{array}{c} \text{R}^2 \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{O} \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{R}^1 \end{array} + \text{NaCN} & \xrightarrow{\text{HheC}} & \begin{array}{c} \text{OH} \\ | \\ \text{R}^2 \\ | \\ \text{C} \\ | \\ \text{R}^1 \\ | \\ \text{CN} \end{array} \\ \text{54a-58a} & & \text{54c-58c} \\ \text{54b-58b} & & \text{54d-58d} \end{array}$$

Supstrat	R ¹	R ²	<i>E</i>	Konfiguracija
54a (49)	Et	H	29	<i>R</i>
54b (49)	Et	Me	>200	<i>R</i>
55a (49)	<i>c</i> -Hex	H	106	<i>R</i>
55b	<i>c</i> -Hex	Me	>200	<i>R</i>
56a	CH ₂ Ph	H	2	<i>R</i>
56b	CH ₂ Ph	Me	>200	<i>R</i>
57a	CO ₂ Me	H	n.d.	-
57b	CO ₂ Me	Me	>200	<i>S</i>
58a	CH ₂ CO ₂ Me	H	15	<i>R</i>
58b	CH ₂ CO ₂ Me	Me	>200	<i>R</i>

Tablica 4. Kinetička rezolucija metil-supstituiranih epoksida **54b** – **58b** katalizirana HheC⁶⁵

Supstrat	Nu	Produkt	<i>t</i> (h)	<i>X</i> (%)	<i>e.v.s</i> (%)	<i>e.v.p</i> (%)
54b	CN	45d	5	34	51	99
54b	N ₃	45e	0.5	50	>99	>99
55b	CN	46d	5	47	88	>99
55b	N ₃	46e	1.5	45	82	>99
56b	CN	47d	5	30	42	99
56b	N ₃	47e	2	47	89	>99
57b	CN	48d	5	21	26	>99
57b	N ₃	48e	5	29	40	90
58b	CN	49d	3	47	87	>99
58b	N ₃	49e	0.5	47	89	>99

HHDH mogu katalizirati nekoliko uzastopnih reakcija, tzv. kaskadne reakcije, kombinacijom zatvaranja halogenhidrina u epoksid te nukleofilnog otvaranja epoksida do alkohola.⁶⁶ Također, moguće su i reakcije u kombinaciji s kompatibilnim enzimima poput alkohol-dehalogenaza i epoksid-hidrolaza.⁶⁷ Glavna prednost ovakvih reakcija je to što ne zahtijevaju obradu i izolaciju brojnih međuprodukata čime se znatno smanjuju troškovi procesa. Na Shemi 19 prikazana je enzimski katalizirana kaskadna reakcija u kombinaciji s klik reakcijom za dobivanje optički čistih triazola **63** – **66**. Prvi korak uključuje stereoselektivno uvođenje kiralnog centra enantioselektivnom redukcijom prokiralnog α -klorketona **59** alkohol-dehidrogenazom (ADH) u odgovarajući enantiomerno čisti halogenhidrin **60**. U drugom koraku HHDH konvertira halogenhidrin **60** u epoksid **61** koji se zatim u prisutnosti azidnog iona prevodi u β -azido-alkohol **62**. Za dobivanje željenog enantiomera potrebno je izabrati odgovarajuću (*S*)- ili (*R*)-selektivnu ADH. U ovom primjeru reakcija je katalizirana dizajniranim stanicama koje u sebi sadrže oba enzima, ADH i HHDH. Dobiveni β -azido-alkoholi **62** reagiraju s terminalnim acetenima u Huisgenovoj reakciji 1,3-dipolarne cikloadicije formirajući β -hidroksitriazole **63** – **66**.⁶¹

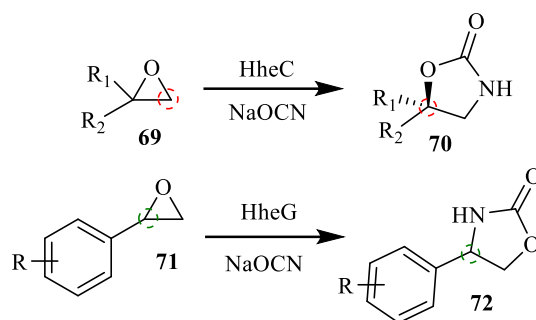


Shema 19. Sinteza optički čistih triazolnih jezgri **63** – **66** kombinacijom enzimski katalizirane kaskadne reakcije i “klik” reakcije⁶¹

2.4.2. Priprava oksazolidinona

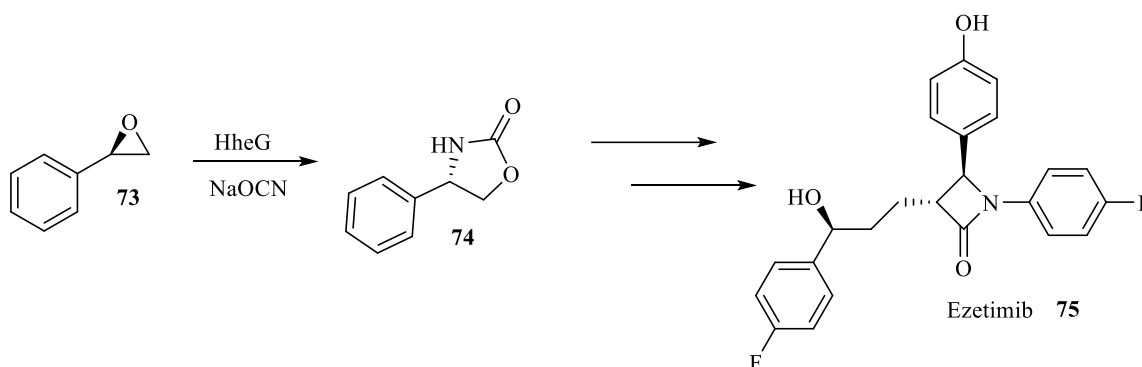
Sinteza enantiomerno čistih oksazolidinona privlači pažnju zbog antibiotskog djelovanja na gram-pozitivne bakterije koje su otporne na većinu lijekova.⁶⁸ Za razliku od kemijske sinteze oksazolidinona koja zahtijeva visoke temperature, dugo reakcijsko vrijeme ili korištenje skupih katalizatora u više sintetskih koraka, biokataliza nudi ekološki prihvatljiv sintetski put uz blage reakcijske uvjete.

Janssen i suradnici opisali su pripravu 5-supstituiranih oksazolidinona **70** korištenjem HhE i natrij cijanata kao nukleofila. Cijanat napada epoksid **69** na β -poziciji pri čemu nastaju β -supstituirani izocijanati koji dalje spontanom ciklizacijom prelaze u 5-supstituirane oksazolidinone **70** (Shema 20).⁶⁹ Nedavno je otkriveno kako HhE iz *Ilumatobacter coccineus* pokazuje visoku α -regioselektivnost u reakcijama pri čemu nastaju 4-supstituirani oksazolidinoni **72** (Shema 20).⁷⁰ 4-Aril i 4-hidroksimetil-supstituirani oksazolidinoni su važni tipovi oksazolidinonskih derivata.



Shema 20. Sinteza 5- i 4-supstituiranih oksazolidinona

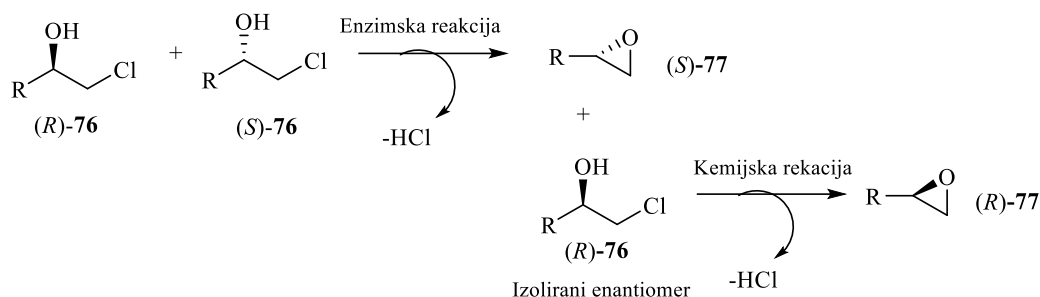
(*S*)-4-feniloksazolidin-2-on (**74**) je glavni intermedijer za sintezu Ezetimiba (**75**) koji se koristi u liječenju visoke razine kolesterola u krvi smanjujući njegovu apsorpciju u crijevima. Sinteza enantiomerno čistog oksazolidinona provedena je iz (*R*)-2-feniloksirana (**73**) koristeći HheG, enzim niske enantioselektivnosti (Shema 21).⁷⁰



Shema 21. Sinteza **74** katalizirana HheG⁷⁰

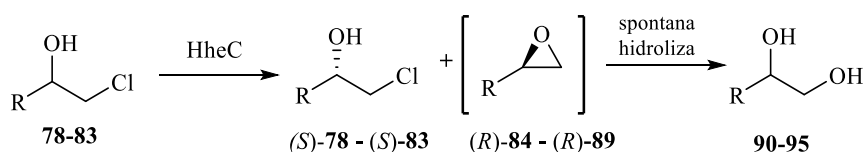
2.4.3. Sinteza epoksida

Optički čisti epoksidi mogu se pripraviti HDDH-kataliziranom kinetičkom rezolucijom epoksida⁷¹ ili halogenhidrina. Na Shemi 22 prikazan je sintetski put za pripravu oba enantiomera epoksida (*R*)-**77** i (*S*)-**77** koristeći kombinaciju enzimski katalizirane reakcije i klasične organske sinteze. Ukoliko se enzimska reakcija zaustavi nakon što je reaktivniji enantiomer halogenhidrina (*S*)-**76** u potpunosti izreagirao, zaostali enantiomer (*R*)-**76** može se izolirati, te klasičnim kemijskim putem prevesti u drugi enantiomer epoksida (*R*)-**77**.



Shema 22. Sinteza oba enantiomera epoksida (R) -75 i (S) -75⁶⁰

Glavni nedostatak ovih reakcija je reverzibilnost, zbog koje se ne može postići potpuna konverzija. Pomicanje ravnoteže može se postići uklanjanjem epoksida iz reakcijske smjese. Jedan primjer je spontana hidroliza epoksida (R) -84 – (R) -89 koji nastaju kinetičkom rezolucijom klorhidrina **78** – **83** (Shema 23, Tablica 5).⁷² Napad vode moguć je na oba ugljikova atoma epoksidnog prstena zbog čega su dobiveni dioli **90** – **95** gotovo u potpunosti racemični. Generirani epoksidi mogu se iz reakcijske smjese uklanjati i vezanjem u kaskadne reakcije uz različite nukleofile.^{54, 56}



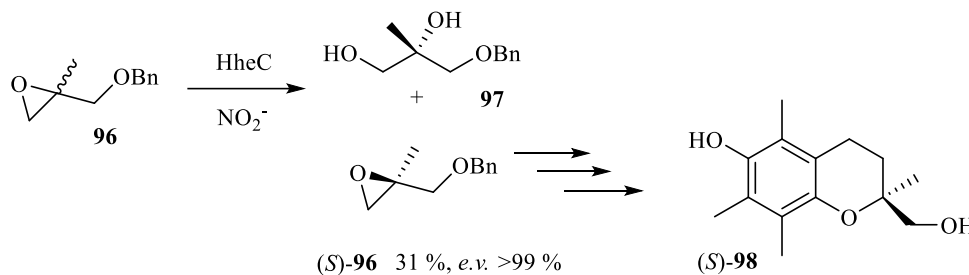
Shema 23. Kinetička rezolucija klorhidrina **78** – **83** katalizirana HheC⁷²

Tablica 5. Rezultati kinetičke rezolucije klorhidrina **78** – **83**⁷²

Supstrat	R	Iskorištenje (%)	<i>e.v.s</i> (%)	<i>E</i>
78	(E) -CH=CHMe	40	>99	>200
79	(E) -CH=CHBu	31	>99	177
80	(E,E) -CH=CHCH=CHEt	29	>99	>200
81	(E) -CH=CHPh	47	>99	102
82	2-furil	42	98,5	>200
83	2-tienil	47	>99	>200

Reakcije s nitritnim ionom najčešće daju smjesu produkata (diola i nitroalkohola), zbog čega se u pravilu koriste u sintezi optički čistih epoksida. Na Shemi 24 prikazana je hidroliza (rac) -2-benziloksimetil-2-metiloksirana (**96**) uz natrij nitrit, gdje kao produkt nastaje enantiomerno

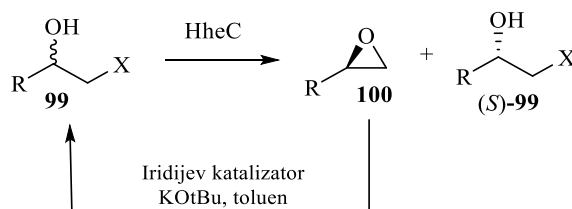
čisti (*S*)-2-benzioksimetil-2-metiloksiran ((*S*)-**96**). Dobiveni epoksid glavni je intermedijer za dobivanje (*S*)-kromanmetanola ((*S*)-**98**) koji služi za pripremu vitamina E.⁷³



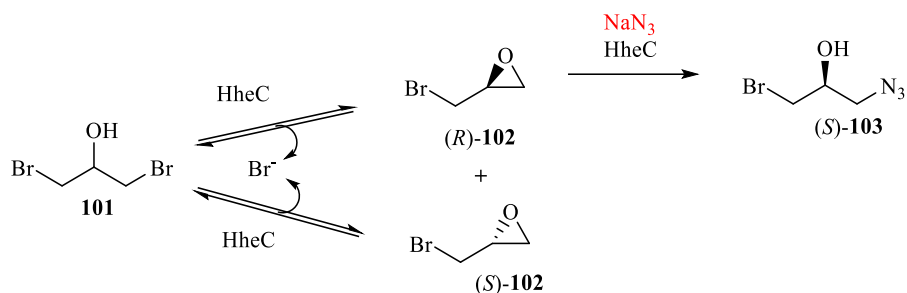
Shema 24. Priprava intermedijera za sintezu vitamin E⁷³

2.4.4. Dinamička kinetička rezolucija (DKR)

U poglavlju 2.1.2. opisan je mehanizam i prednosti DKR. Glavni preduvjet za uspješnu DKR je da se racemizacija neizreagiranog supstrata odvija puno brže od kinetičke rezolucije. Ona može biti kemijski⁷⁴ (Shema 25) ili enzimski⁷⁵ katalizirana (Shema 26). Enzimski katalizirana racemizacija odvija se pri sobnoj temperaturi, atmosferskom tlaku i neutralnom pH. Ovakve reakcije obično su ekološki prihvatljive i vrlo kemoselektivne sprječavajući time racemizaciju produkta. HDDH imaju mogućnost istovremene racemizacije i kinetičke rezolucije supstrata poput epiklorhidrina (**19**) i epibromhidrina (**102**). Navedeni supstrati mogu racemizirati u prisutnosti tragova halogenidnog iona. Shema 26 prikazuje DKR 1,3-dibromopropan-2-ola (**101**) kojom se dobiva (*S*)-1-azido-3-bromopropan-2-ol ((*S*)-**103**) u iskorištenju od 77 % i enantiomernom suvišku >99 %. (*S*)-**102** koji zaostaje, uz bromidne ione se otvara u prokiralni intermedijer **101**, koji je supstrat istom enzimu.⁷⁵

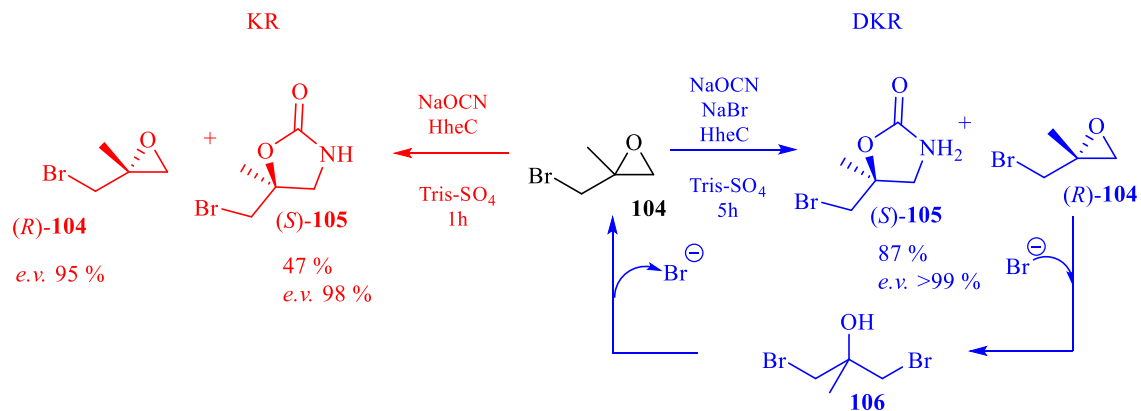


Shema 25. DKR s kemijski kataliziranom racemizacijom⁷⁴



Shema 26. HheC katalizirana DKR **101**⁷⁵

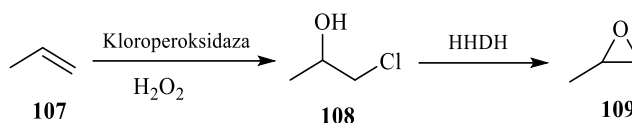
DKR se može koristiti za dobivanje oksazolidinona (*S*)-**105** visoke enantiomerne čistoće i iskorištenja (Shema 27).⁸ Ako se u reakciji koristi jedan ekvivalent natrij cijanata i HheC kao katalizator dobiva se (*S*)-**105** u iskorištenju od 47 % i enantiomernom suvišku od 98 %. Reakcija je vrlo brza, međutim nakon 50 % konverzije naglo usporava što ukazuje na karakter kinetičke rezolucije. Dodatkom samo male količine bromidnih iona reakcija dobiva karakter DKR, pri čemu se iskorištenje produkta povećava na 87 %, a enantiomerna čistoća na *e.v.* = 99 %. Bromidni ioni kataliziraju racemizaciju neizreagirano (*R*)-epoksida (*R*)-**104** preko prokiralnog intermedijera **106** koji se zatim prevodi u racemični 2-(brommetil)-2-metiloksiran (**104**).⁸



Shema 27. DKR 2-(brommetil)-2-metiloksirana (**104**)⁸

2.4.5. Industrijska primjena HHDH

Krajem 70-ih godina prošlog stoljeća HHDH iz *Flavobacterium* sp. koristila se u industrijskom procesu dobivanja propilen oksida (**109**) iz propilena (**107**), (Shema 28).⁷⁶ Takozvani "Cetus Process" poznat je kao prvi process biokonverzije koji se koristio u petrokemijskoj industriji.⁷⁷ Proces je razvijen kao alternativa za kemijske procese direktne oksidacije koji su koristili skupe i toksične katalizatore. U prvom koraku **107** se prevodi u odgovarajući halogenhidrin **108** pomoću klorperoksidaze iz *Caldariomyces fumago*, a dobiveni 1-klor-2-propanol (**108**) se zatim pomoću HHDH iz *Flavobacterium* sp. prevodi u **109**.⁷⁸

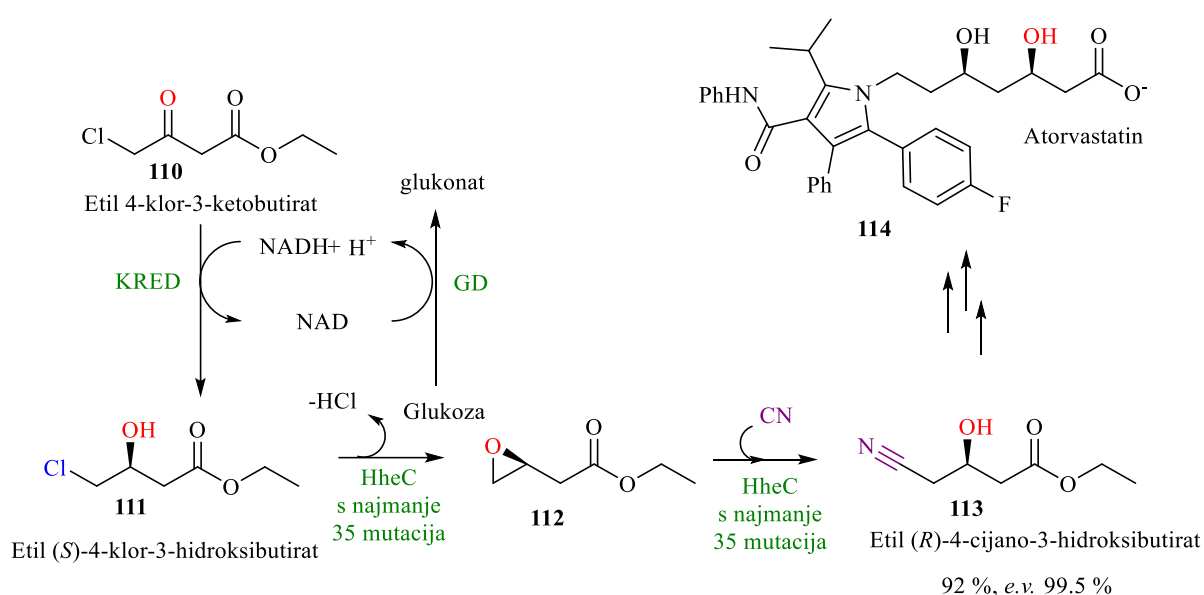


Shema 28. "Cetus Proces"

HHDH koristi se u prehrambenoj, polimernoj industriji te industriji papira za uklanjanje toksičnih halogenalkohola i organohalogenih produkata iz kontaminiranih otpada. Papirna industrija koristi kationske poliaminopoliamid-epoksidne smole u svrhu poboljšanja vlažne čvrstoće papira. Nusprodukti ovog procesa su najčešće epiklorhidrin (**19**), 1,3-diklor-2-propanol (**20**) i 3-klor-1,2-propandiol koji se uklanjaju korištenjem cijelih stanica s aktivnom HHDH.⁷⁹ U prehrambenoj industriji za vrijeme kisele hidrolize proteina i deodorizacije biljnog ulja mogu nastati toksični mono- i diklorirani propanoli te određeni esteri viših masnih kiselina koji dovode u pitanje sigurnost hrane. Korištenjem cijelih stanica s HHDH u kombinaciji s drugim lipazama⁸⁰ ili korištenjem pročišćenog enzima u kaskadnim reakcijama u kombinaciji s *Candida antractica* lipazom A i epoksid hidrolazom iz *A. radiobacter* AD1⁸¹, moguće je sintetizirati netoksični glicerol koji je pogodan za korištenje u prehrambenoj industriji.

HHDH se koriste i u sintezi vrijednih kiralnih prekursora za farmaceutsku industriju. Najznačajniji primjer je sinteza hidroksibutiratnog prekursora **113** za pripremu Atorvastatina (**114**). Atorvastatin **114** je statinski lijek, komercijalnog naziva Lipitor, koji služi za snižavanje razine kolesterola. Molekula API-ja posjeduje dva kiralna centra, a za njezinu primjenu u lijekovima potrebne su izrazito visoke enantiomerne čistoće. Za sintezu navedenog kiralnog gradivnog bloka razvijeni su brojni klasični kemijski sintetski putevi, kojima je zajedničko uvođenje cijano skupine u molekulu. Iskorištenja tih reakcija znatno ovise o temperaturi, pa se tako na sobnoj temperaturi preko noći dobiva produkt u iskorištenju od samo 50 %. Povećanjem temperature raste iskorištenje, međutim željeni prekursor je vrlo nestabilan pri

temperaturama iznad 60 °C. Također, jedan od glavnih nedostataka klasične organske sinteze je nastanak velikog broja nusprodukata koji otežavaju proces separacije i čišćenja. Američka tvrtka Codexis Inc. (Redwood City, CA, USA)⁸² razvila je zeleni proces sinteze hidroksibutirata **113**, koji je prikazan na Shemi 29. U prvom koraku ove kaskadne reakcije ADH iz *Candida magnolie* reducira prokiralni 4-klor-3-ketobutirat (**110**) u (*S*)-4-klor-3-hidroksibutirat (**111**). Zatim se pomoću modificirane HheC iz *Agrobacterium radiobacter* u dvije slijedne reakcije halogenhidrin **111** prevodi u odgovarajući (*S*)-epoksid **112**, koji se u prisutnosti cijanida prevodi u (*R*)-**113**. U usporedbi s klasičnim kemijskim procesima ovaj proces je ekološki prihvatljiv.



Shema 29. Biokatalitička sinteza kiralnog gradivnog bloka za sintezu Atorvastatina **114**

Glavni izazov biokatalize je povećanje koncentracije produkta s ciljem zadovoljavanja kriterija industrijske proizvodnje. Većina organskih molekula je slabo topljiva ili netopljiva u vodi, koja je potrebna za aktivnost enzima. Zbog toga biokatalitičke reakcije često zahtijevaju različita inovativna rješenja poput korištenja dvofaznih sustava ili naprednih reaktorskih izvedbi. Visoke koncentracije supstrata i korištenje organskih otapala mogu inhibirati enzim. Metodama proteinskog inženjerstva danas se sve uspješnije konstruiraju novi enzimi prilagođeni željenim reakcijskim uvjetima.

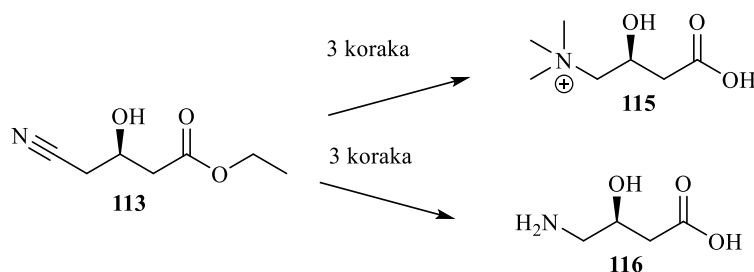
Korištenjem mutanta HheC, dobivenog usmjerenom evolucijom, u ovom se procesu uspješno povećala koncentracija supstrata i iskorištenje u sintezi kiralnog prekursora **113**. Osim toga

skraćeno je reakcijsko vrijeme i smanjena količina utrošenog katalizatora dok je kemijska i enantiomerna čistoća produkta ostala nepromijenjena (Tablica 6).

Tablica 6. Usporedba divljeg tipa HheC i mutanta u procesu sinteze **113**⁸²

Parametar	Divlji tip	Mutant
Supstrat (g/L)	20	140
Enzim (g/L)	30	1,2
STY (g/L po danu)	7	672
Iskorištenje (%)	67	92
Čistoća (%)	>98	>98
<i>e.v.</i> (%)	>99,5	>99,5
Vrijeme reakcije (h)	72	5

Osim za pripremu Atorvastatina **114**, ovako pripravljen hidroksibutirat **113** može se koristiti za sintezu *L*-karnitina (**115**) bitnog za β -oksidaciju masnih kiselina kod sisavaca i 4-amino-3-hidroksibutanske kiseline (**116**), koja se koristi kao antikonvulzivni lijek za liječenje epilepsije (Shema 30).



Shema 30. (*R*)-4-cijano-3-hidroksibutirat (**113**) kao polazni spoj za pripremu *L*-karnitina (**115**) i 4-amino-3-hidroksibutanske kiseline (**116**)

Nedavno su Fungyun i suradnici pokazali kako se kombinacijom elektrokemije i biokemije može povećati koncentracija (*R*)-**113**. U navedenom primjeru ADH i HHDH korištene su u dvofaznom sustavu s bioelektrodom. Vodena faza potrebna je za odvijanje biokatalitičke reakcije, dok organska faza služi kao spremnik supstrata. Dvofazni sustav omogućava korištenje većih koncentracija supstrata, smanjuje mogućnost inhibicije enzima, te služi za istovremenu ekstrakciju nastalih produkata. Bioelektroda služi za regeneraciju kofaktora koji je potreban za rad ADH. Koncentracija dobivenog produkta u dvofaznom sustavu nakon osam

sati iznosi 25 mM, dok je maksimalna dobivena koncentracija produkta u jednofaznom sustavu manja od 5 mM.⁸³

2.5. Proteinsko inženjerstvo HHDH

Idealni katalizator za industrijsku primjenu bio bi katalitički efikasan, stabilan i lako pripravljiv. S obzirom da divlji tip enzima često nema sve potrebne karakteristike, proteinskim inženjerstvom njegova se svojstva mogu poboljšati, čime se značajno smanjuju troškovi procesa kao što je prikazano na primjeru sinteze prekursora za Atorvastatin **114**. Studije Janssen i suradnika pokazale su da aktivnost homotetramerne HheC iz *Agrobacterium radiobacter* AD1 opada u oksidacijskim uvjetima zbog formiranja intramolekularnih disulfidnih veza oksidacijom cisteinskih ostataka.⁸⁴ Zamjenom tri cisteina (C30, C153 i C229) s alaninom ili serinom, koji u svojoj strukturi ne posjeduju sumpor, spriječen je nastanak disulfidnih veza te je povećana stabilnost enzima.

Ista grupa znanstvenika, zamjenom četiri triptofana HheC s fenilalaninom identificirala je ključna mjesta za stereoselektivnost enzima: W139 i W249.³⁸ Mutacija W139F dovela je do potpunog gubitka enantioselektivnosti za *p*-nitrofenil-2-bromoetanol, dok je mutacijom W249F povećana enantioselektivnosti prema (*R*)-enantiomeru. HheC-W249F je zbog visoke enantioselektivnosti korišten u brojnim istraživanjima.^{57, 66, 74}

Mutacija Y187F, koja se nalazi u blizini anionskog džepa, narušava stabilnost vodikovih veza što omogućuje lakše otpuštanje aniona. S obzirom da je otpuštanje halogenidnog iona limitirajući korak u reakcijama zatvaranja epoksidnog prstena, njegovo lakše otpuštanje dovodi do povećanja enzimске aktivnosti.⁴³

Tang je zajedno sa suradnicima identificirala značajne aminokiseline ključne za (*S*)-selektivnost HheA iz *Arthrobacter* sp. soj AD2.⁸⁵ V136, L141 i N178 nalaze se u blizini aktivnog mjesta i ekvivalentne su aminokiselinama W139, T134 i N176 u HheC za koje je prethodno utvrđeno da su bitne za stereoselektivnost enzima.^{45, 65} Dvostruki mutant HheA-V136Y/L141G pokazao je (*R*)-enantioselektivnost u reakcijama s 2-klor-1-feniletanolom, dok je jednostruki mutant HheA-N178A pokazao znatno veću aktivnost i (*S*)-enantioselektivnost (*E* >200) od divljeg tipa. Ovim istraživanjem dokazano je da navedene aminokiseline imaju ključnu ulogu u kontroli stereoselektivnosti HheA.

Aminokiseline A120 i Q125 enzima HheB ekvivalentne su aminokiselinama V136 i L141 u enzimu HheA. Watanabe je 2015. uspoređujući strukture HheB i HheA pretpostavio da su upravo one bitne za stereoselektivnost enzima HheB.⁴⁷ To je i dokazao pripravom (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila (**28**) u enantiomernom suvišku od 98,5 % koristeći mutant HheB-D199H/F71W/Q125T.⁵⁵ Zamjenom fenilalanina triptofanom na poziciji 71 sužava se prostor za ulazak supstrata u tunel, međutim zamjenom glutamina treoninom na poziciji 125 otvara se novi tunel za ulazak supstrata u aktivno mjesto koji uz dodatne konformacijske promjene tijekom reakcije dovodi do povećane enantioselektivnosti i konačnog iskorištenja.

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Cilj rada

Reakcije biokatalize intenzivno se istražuju posljednjih godina zbog svoje ekološke prihvatljivosti i visoke selektivnosti. HDDH kataliziraju selektivno zatvaranje epoksida uklanjanjem halogenidnih iona iz vicinalnih halogenhidrina. Osim toga enzimi kataliziraju regioselektivno i enantioselektivno otvaranje epoksida uz širok spektar anionskih nukleofila čime omogućuju sintezu različitih sekundarnih alkohola.⁵⁶ Najveći nedostatak je mali broj poznatih enzima koji mogu katalizirati enantioselektivno otvaranje epoksida u alkoholima.

HheB2 izoliran je u Nizozemskoj gdje prva biokatalitička ispitivanja, na svega desetak molekula, nisu dala dobre rezultate.^{48, 49, 50} HheB izoliran je nekoliko godina ranije u Japanu, te je pokazao veću selektivnost u reakciji prevođenja epiklorhidina u (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitril.^{33, 54} Strukture dva enzima razlikuju se u svega četiri aminokiselinska ogranka.⁴⁷ Zbog svega navedenog nameću se pitanja: ako je HheB dobar katalizator u jednoj reakciji postoje li i druge reakcije u kojima bi enzim mogao naći primjenu, te ukoliko se ova dva enzima zaista razlikuju u katalitičkim svojstvima koja od četiri aminokiseline je odgovorna za to?

Cilj ovog doktorskog rada je proširiti katalitičko djelovanje HDDH skupine B ispitivanjem biokatalitičkih svojstava i pronalaskom supstrata koji su prihvaćeni u aktivnom mjestu te se mogu selektivno prevoditi u produkte visoke enantiomerne čistoće. Također, pronalaskom nukleofila prihvaćenih u aktivnom mjestu cilj je povećati broj produkata koji se mogu sintetizirati korištenjem HDDH kao katalizatora. U svrhu određivanja aminokiselinskih ogranka koji su zaslužni za veću enantioselektivnost HheB u odnosu na HheB2 u istraživanje su uključena četiri mutanta HheB2 s pojedinačnim mutacijama (HheB2-F36I, HheB2-T120A, HheB2-C124Y i HheB2-H125Q) i jedan četverostruki mutant (HheB2-F36I/T120A/C124Y/H125Q) čija je aminokiselinska sekvenca identična enzimu HheB. Računalnim simulacijama cilj je objasniti dobivene enantioselektivnosti i reakcijski mehanizam prevođenja epoksida u azido-alkohole. Određivanje ključnih aminokiselinskih ogranka i računalna analiza pridonijet će boljem razumijevanju samog aktivnog mjesta enzima, što je izrazito bitno za dizajn novih poboljšanih varijanti. Konačni cilj rada je pokazati

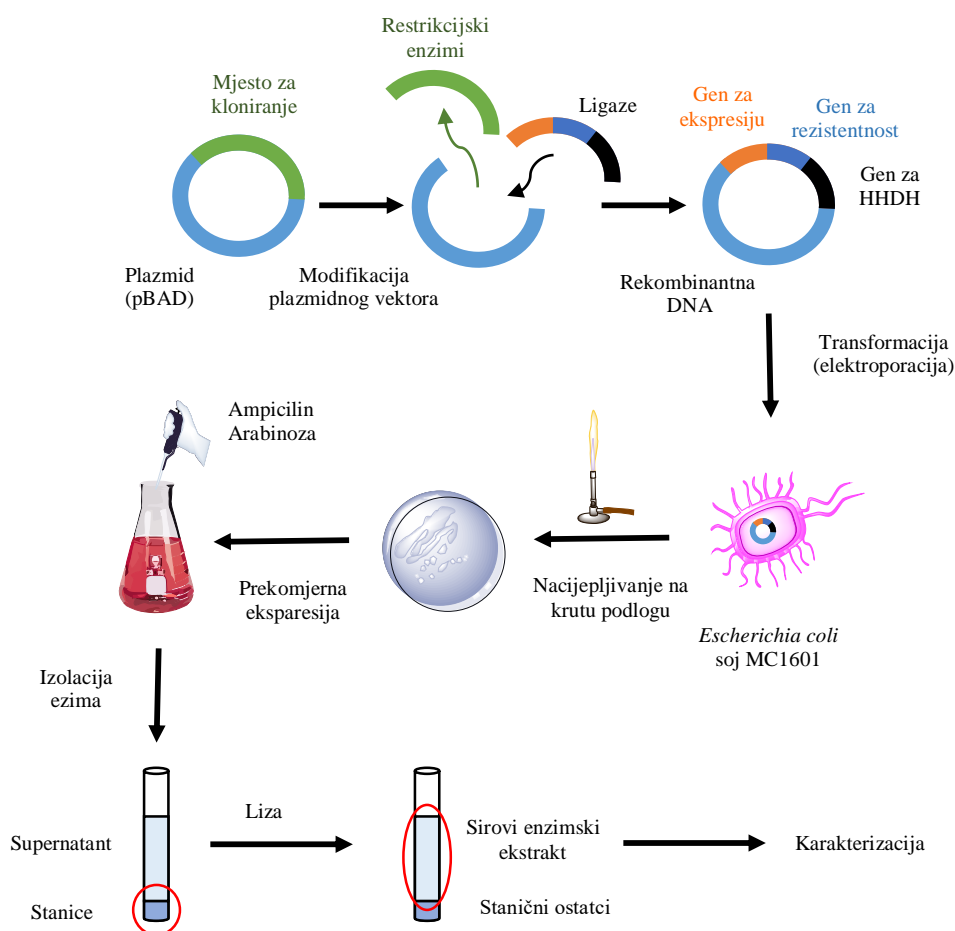
katalitičku vrijednost HHDH skupine B kao katalizatora za sintezu kiralnih gradivnih blokova, uvećanjem visoko selektivnih reakcija.

3.2. Priprava enzima

Za potrebe istraživanja pripravljeno je šest enzima:

1. Divlji tip HheB2
2. Jednostruki mutant HheB2-F26I
3. Jednostruki mutant HheB2-T120A
4. Jednostruki mutant HheB2-C124Y
5. Jednostruki mutant HheB2H-125Q
6. Četverostruki mutant HheB2-F36I/T120A/C124Y/H125Q, čija struktura odgovara strukturi divljeg tipa HheB

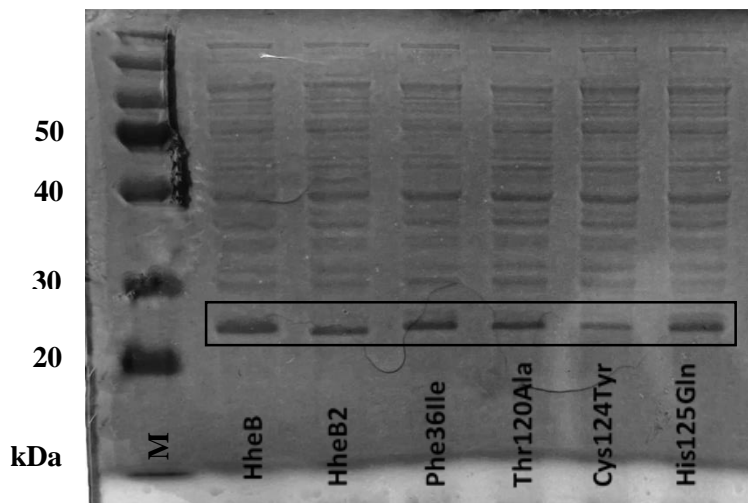
Enzimi su pripremljeni metodom prekomjerne ekspresije u stanicama *E. Coli*, soj MC1601 (Slika 10). Rekombinantna DNA koja na sebi nosi gen za ekspresiju određenog enzima dobivena je modifikacijom plazmida (pBAD) u suradnji sa Sveučilištem elektroničkih znanosti i tehnologije, (Chengdu, Kina).



Slika 10. Priprava sirovog enzimskog ekstrakta

pBAD posjeduje mjesto za kloniranje koje se uklanja restrikcijским enzimima, te se na njega pomoću ligaza vežu geni potrebni za ekspresiju željenih proteina, kao i ostali geni potrebni za učinkovitu ekspresiju. Gen za rezistentnost na ampicilin omogućuje bakterijama da prežive u selektivnom mediju za rast, odnosno mediju koji u sebi sadrži ampicilin kao selektor. Promotorski gen (gen za arabinozu) potiče ekspresiju željenih proteina. Nakon pripreve, rekombinantna DNA ubačena je u stanice *E. coli* soj MC1601 metodom elektroporacije. U navedenoj metodi primjenom električnog polja povećava se propusnost stanične membrane što omogućuje ubacivanje plazmida u stanice. Transformirane stanice zatim su nacijepljene na krutu hranjivu podlogu s ampicilinom za selektivan rast. Nakon inkubacije nekoliko bakterijskih kultura preneseno je u tekuću hranjivu podlogu gdje slijedi prekomjerna ekspresija. Stanice su potom odvojene od supernatanta centrifugiranjem i razbijene primjenom ultrazvučne energije. Ponovnim centrifugiranjem sirovi enzimski ekstrakt odvojen je od staničnih ostataka.

Enzimski ekstrakti svih pripremljenih enzima okarakterizirani su SDS-PAGE elektroforezom, mjerenjem koncentracije i aktivnosti. Na Slici 11 prikazani su rezultati SDS-PAGE elektroforeze gdje se vidi dobra ekspresija HHDH proteina ukupne molekulske mase između 20 i 30 kDa. Određene volumne i specifične aktivnosti te koncentracije prikazane su u Tablici 7, i kreću se u rasponu 4 – 53 U/mL i 1 – 18 U/mg, odnosno 2 – 3 mg/mL.



Slika 11. Rezultati SDS-PAGE elektroforeze

Tablica 7. Aktivnost i koncentracija pripremljenih enzima.

Enzim	Koncentracija (mg/mL)	V.A. (U/mL)	S.A. (U/mg)
HheB2	2,8	22	7,8
HheB2-F36I/T120A/C124Y/H125Q	3	53	17,7
HheB2-F36I	2,5	15	6,0
HheB2-T120A	2,3	28	12,2
HheB2-C124Y	3	4	1,3
HheB2-H125Q	2,6	16	6,1

3.3. Sinteza supstrata i standardnih spojeva

Supstrati, odnosno komercijalno nedostupni racemični epoksidi potrebni za ispitivanje biokatalitičkih svojstava HHDH pripremljeni su dvjema metodama u rasponu iskorištenja od 17 – 95 %:

1. Epoksidacijom alkena peroksi-kiselinama
2. Corey-Chaykovski epoksidacijom odgovarajućih aldehida i ketona

Nakon pripreme epoksida sintetizirani su svi racemični produkti biokatalitičkih transformacija koji su korišteni kao standardi za razvoj analitičkih metoda. Racemični β -supstituirani alkoholi pripremljeni su klasičnim S_N2 reakcijama otvaranja epoksidnog prstena uz odgovarajući nukleofil u bazičnim uvjetima u iskorištenjima od 15 do 69 %, dok su racemični oksazolidinoni pripremljeni u dva koraka iz odgovarajućih azido-alkohola u iskorištenjima od 48 do 67%. Postupci pripreme svih spojeva opisani su u poglavljima 4.4. i 4.5. eksperimentalnog dijela. Enantiomerno obogaćeni epoksidi poznate apsolutne konfiguracije sintetizirani su reakcijama asimetričnog otvaranja racemičnih epoksida uz Jacobsenov katalizator, te su korišteni za određivanje apsolutne konfiguracije produkata enzimskih reakcija.

Pripremljeni supstrati i standardi korišteni su za razvijanje analitičkih metoda (GC/HPLC) kojima je praćena konverzija i enantiomerna čistoća produkata enzimskih reakcija. Sve razvijene metode prikazane su u poglavlju 4.6. eksperimentalnog dijela.

3.4. Određivanje enantioselektivnosti enzimskih reakcija

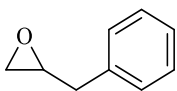
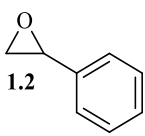
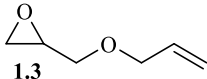
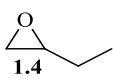
Enantiomerna čistoća produkata enzimskih reakcija, izražena kao enantiomerni višak (*e.v.*), određena je GC ili HPLC analizom na kolanama s kiralnom stacionarnom fazom, prema razrađenim metodama. Uvjeti separacije enantiomera prikazani su u Tablicama 20 – 21. Enantiomerni višak produkta i neizreagirano supstrata računati su prema izrazima 13 i 14. *E* vrijednost, odnosno parametar kojim se kvantificira i uspoređuje enantioselektivnost enzimске reakcije, računata je iz *e.v._s* i *e.v._p* prema izrazu 15.⁸⁶

$$E = \ln[(1 - e.v._s)/(1 + e.v._s/e.v._p)] / \ln[(1 + e.v._s)/(1 + e.v._s/e.v._p)]^{86} \quad (15)$$

3.5. Ispitivanje supstrata i utvrđivanje ključnih aminokiselina odgovornih za enantioselektivnost enzima

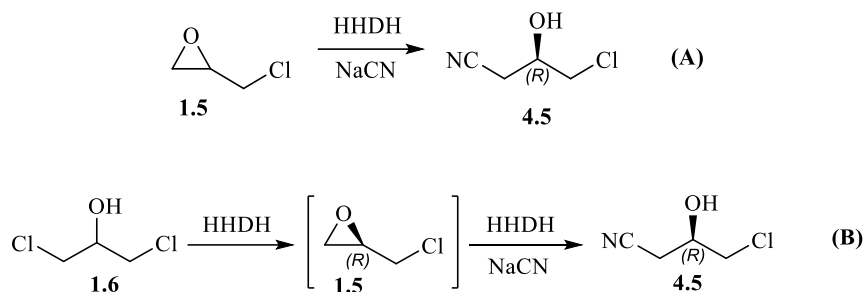
Istraživanja su započeta ispitivanjem aktivnosti i enantioselektivnosti enzima HheB2 na četiri komercijalno dostupna epoksida **1.1** – **1.4** u prisutnosti azida kao nukleofila (Tablica 8). Niska enantioselektivnost (*E* = 1 – 5) potvrđena je kod svih supstrata, što je u skladu s do sada objavljenim rezultatima katalize monosupstituiranih epoksida ovim enzimom.^{49,50,52,53}

Tablica 8. Kinetička rezolucija epoksida **1.1** – **1.4** katalizirana HheB2

Epoksid	<i>t</i> (h)	<i>X</i> (%) ^a	<i>e.v._s</i> (%) ^b	<i>ev._p</i> (%) ^b	<i>E</i>	Konfig. ^c
 1.1	0,25	33,5	5	9	1	<i>R</i>
 1.2	3	50,5	24	28	2	<i>S</i>
 1.3	4	51	29	37	3	<i>R</i>
 1.4	4	79	50	52	5	<i>S</i>

^a konverzija određena GC metodom, ^b izračunato prema izrazima (14) i (15), ^c apsolutna konfiguracija reaktivnijeg enantiomera epoksida

Po uzoru na prve u literaturi opisane reakcije s HheB, svi pripremljeni enzimi ispitani su u sintezi (*R*)-klor-3-hidroksibutironitrila (**4.5**) iz epiklorhidrina (**1.5**) (Shema 31 (A)) i diklor-2-propanola (**1.6**) s NaCN kao nukleofilom.



Shema 31. HHDH katalizirana sinteza **4.5** iz epiklorhidrina (**1.5**) (A), sinteza **4.5** iz 1,3-diklor-2-propanola (**1.6**) (B)

Tablica 9. Sinteza (*R*)-klor-3-hidroksibutironitrila (**4.5**) iz **1.5**

Enzim	<i>X</i> (%) ^b	<i>e.v.p.</i> (%) ^c
HheB2	18	76
F36I	20	78
T120A	27	90
C124Y	15	78
H125Q	20	76
HheB ^a	36	95

Tablica 10. Sinteza (*R*)-klor-3-hidroksibutironitrila (**4.5**) iz **1.6**

Enzim	<i>X</i> (%) ^b	<i>e.v.p.</i> (%) ^c
HheB2	80	99
F36I	90	99
T120A	75	99
C124Y	77	99
H125Q	81	99
HheB ^a	91	99

^a četverostruki mutant F36I/T120A/C124Y/H125Q jednak divljem tipu HheB, ^b konverzija nakon 4 h određena GC metodom, ^c izračunato prema izrazima (14) i (15).

U reakciji **1.5** s NaCN najviša konverzija i enantiomerni suvišak produkta **4.5** dobiveni su s enzimom HheB (36 %, *e.v.p.* = 95 %), dok su s divljim tipom HheB2 i mutanatima F36I, C124Y i H125Q dobivene nešto niže vrijednosti (*e.v.p.* = 76 – 78 %) (Shema 31 (A), Tablica 9). Enantioselektivnost mutanta T120A (*e.v.p.* = 90 %) najbližnja je HheB, iz čega se može zaključiti da zamjena treonina alaninom na položaju 120 ima najveći utjecaj na selektivnost enzima u ovoj reakciji.

Reakcija iz prokiralnog 1,3-diklorpropan-2-ola (**1.6**) daje produkt **4.5** u enantiomernom suvišku većem od 99 % sa svim enzimima (Tablica 10). Enzim ovdje katalizira dvije uzastopne reakcije. U prvom koraku reakcije dolazi do selektivnog zatvaranja epoksidnog prstena pri čemu nastaje pretežito (*R*)-**1.5**. Enantiomerno obogaćeni (*R*)-**1.5** zatim se prevodi u (*R*)-**4.5** (*e.v.*

>99 %, Shema 31 (B)), što u konačnici dovodi do produkta (*R*)-**4.5** više enantiomerne čistoće i iskorištenja nego kod reakcije koja kreće iz racemičnog **1.5**. Ovi rezultati osim što su potvrdili reproducibilnost istraživanja Nakamure i suradnika, bili su ohrabrujući i dali naznaku da bi enzimi iz skupine B mogli enantioselektivno katalizirati reakcije i drugih supstrata.

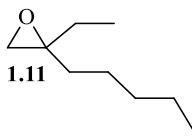
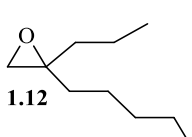
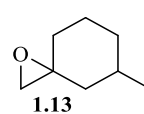
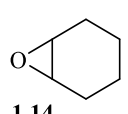
Istraživanja su nastavljena ispitivanjem svih šest enzima na setu alifatskih epoksida gdje su uključeni supstrati s različitim brojem i veličinom supstituenata na kiralnom centru **1.4**, **1.7** – **1.13**, te jedan biciklički epoksid **1.14** kao predstavnik 2,3-disupstituiranih epoksida. Od devet testiranih supstrata enzimi nisu pokazali aktivnost prema dva (Tablica 11). Zaključeno je da HHDH iz grupe B ne prihvaćaju supstrate s dva duga alifatska lanca na kiralnom centru **1.12** i neterminalne epoksidge poput **1.14**. Dobiveni rezultati u skladu su s prethodnim istraživanjima gdje je pokazano da HheB2 ne katalizira reakciju **1.14** s cijanidnim ionom.⁴⁹ Reakcije monosupstituiranih epoksida **1.4** – **1.9** odvijaju se velikom brzinom, uz visoku β -regioselektivnost te nisku do srednju enantioselektivnost ($E = 1 - 52$). E vrijednosti dobivene korištenjem HheB i mutanta T120A veće su u odnosu na vrijednosti dobivene s ostalim enzimima, što još jednom ukazuje na doprinos ogranka 120 u selektivnosti enzima. Mutacije na ograncima 36, 124 i 125 nisu pokazale značajan utjecaj na enantioselektivnost enzima prema ispitanim alifatskim supstratima **1.4**, **1.7** – **1.14**.

Uvođenje metilne skupine kao drugog supstituenta na kiralni centar (epoksid **1.10**) dovodi do značajnog povećanja enantioselektivnosti za sve enzime, osim za T120A gdje je primijećen neočekivani pad. Utjecaj dodatne metilne skupine na enantioselektivnosti prethodno je primijećen i kod enzima HheC, koji je dobar katalizator upravo za rezoluciju 2-metil-disupstituiranih epoksida.⁶⁵ Za razliku od HheC, enzimi grupe B prihvaćaju 2-etil-disupstituirani epoksid **1.11** (Slika 12). Kinetička rezolucija **1.11** katalizirana s HheB i HheB2-T120A je visoko enantioselektivna ($E > 200$), što otvara mogućnosti pripreve optički čistih tercijskih alkohola koji na kiralnom centru imaju supstituent veći od metila (Tablica 11). Ostali enzimi s navedenim supstratom **1.11** daju samo tragove produkta. Divlji tip HheB2 u reakciji sa spiroepoksidom **1.13** pokazuje enantioselektivnost ($E = 38$) usporedivu s enantioselektivnošću HheC ($E = 34$)⁸⁷, dok je u slučaju HheB ona znatno viša ($E > 120$), zbog čega se enzim istaknuo kao potencijalni katalizator za rezoluciju spiroepoksida.

Tablica 11. Kinetička rezolucija alifatskih epoksida **1.4**, **1.7** – **1.14** katalizirana HHDH

$$\text{Epoxid} + \text{NaN}_3 \xrightarrow[\text{pufer}]{\text{HHDH}} \text{N}_3\text{-CH}_2\text{-CH(OH)-R}_1\text{-R}_2$$

Epoksid	Enzim	<i>t</i> (h)	<i>X</i> (%) ^a	<i>e.v.s</i> (%) ^b	<i>e.v.p</i> (%) ^b	<i>E</i>	Konf. ^c
 1.4	HheB2	1	49	50	52	5	<i>S</i>
	F36I	1	63	72	43	5	
	T120A	1	61	99	54,5	16	
	C124Y	1	40	38,5	60	6	
	H125Q	1	64	71	40	5	
	HheB ^d	1	63	99	55,5	17	
	 1.7	HheB2	0,5	70	68,5	26,5	
F36I		0,5	78,5	79	21	3	
T120A		0,5	57,5	>99	65	33	
C124Y		0,5	59	65,5	45	5	
H125Q		0,5	76	73	22	3	
HheB ^d		0,5	62	>99	54	22	
 1.8		HheB2	2	12	11	79,5	10
	F36I	2	21	20	80,5	11	
	T120A	2	66	48	24,5	3	
	C124Y	2	19	18	71	7	
	H125Q	2	19	15,5	72	7	
	HheB ^d	2	52	7,5	6,5	1	
	 1.9	HheB2	3	21	12,5	88	18
F36I		3	17	10	87,5	17	
T120A		3	55,5	99	84	59	
C124Y		3	17	13,5	95,5	40	
H125Q		3	18	11	86	15	
HheB ^d		3	56,5	96,5	84,5	48	
 1.10		HheB2	1	43,5	63,5	97,5	152
	F36I	1	51,5	71	97,5	169	
	T120A	1	41	36	73	9	
	C124Y	3	44,5	58	94,5	64	
	H125Q	1	49,5	44	98	153	
	HheB ^d	1	51,5	66	97,5	157	

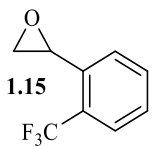
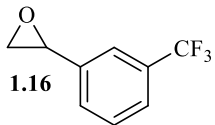
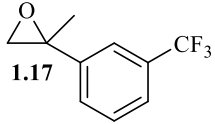
 1.11	HheB2	-	-	-	-	-	
	F36I	-	-	-	-	-	
	T120A	4	30,5	21	99	>200	<i>R</i>
	C12Y	-	-	-	-	-	
	H125Q	-	-	-	-	-	
	HheB ^d	4	48	74,5	99	>200	
 1.12	HheB2	-	-	-	-	-	
	F36I	-	-	-	-	-	
	T120A	-	-	-	-	-	/
	C124Y	-	-	-	-	-	
	H125Q	-	-	-	-	-	
	HheB ^d	-	-	-	-	-	
 1.13	HheB2	4	34	45,5	92	38	
	F36I	4	46,5	80	90	47	
	T120A	4	46	80,5	92,5	64	<i>3R,5R</i>
	C124Y	4	46,5	83	94	84	
	H125Q	4	49	93	93	92	
	HheB ^d	4	45	79,5	96	120	
 1.14	HheB2	-	-	-	-	-	
	F36I	-	-	-	-	-	
	T120A	-	-	-	-	-	/
	C124Y	-	-	-	-	-	
	H125Q	-	-	-	-	-	
	HheB ^d	-	-	-	-	-	

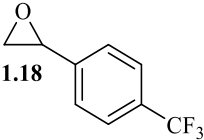
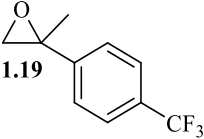
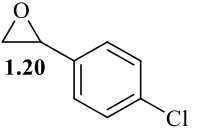
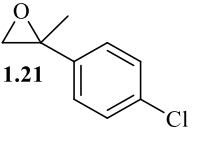
^a konverzija određena GC metodom, ^b izračunato prema izrazima (13) i (14), ^c apsolutna konfiguracija brže reagirajućeg epoksida, ^d četverostruki mutant F36I/T120A/C124Y/H125Q jednak je divljem tipu HheB

Nakon alifatskih epoksida za ispitivanje je odabran set aromatskih supstrata **1.15** – **1.21** (Tablica 12). Iz dobivenih rezultata zaključeno je da enzimi ne prihvaćaju epoksidge s *orto*-susptituiranim aromatskim prstenom **1.15**, što se može objasniti otežanim ulaskom i smještanjem sterički zahtjevne strukture u aktivno mjesto. Usporedbom monosupstituiranih (**1.16**, **1.18**, **1.20**) i disupstituiranih (**1.17**, **1.19**, **1.21**) analoga ponovno je primijećen porast enantioselektivnosti uzrokovan dodatnom metilnom skupinom na kiralnom centru. Slične *E* vrijednosti za većinu ispitanih supstrata dobivene su s enzimima HheB2 i HheB2-F36I (Tablica 11 – 12) iz čega se može zaključiti da aminokiselina na poziciji 36 nema utjecaja na selektivnost

enzima. Navedena mutacija nalazi se na samoj površini proteina pa je i njezin utjecaj na selektivnost očekivano manji u odnosu na druge mutacije koje se nalaze unutar aktivnog mjesta (Slika 9). Ogranci 120 i 125 pokazali su najveći utjecaj na enantioselektivnost (Tablica 11 – 12). Tako dobiveni rezultati potvrđuju pretpostavku Watanabe i suradnika⁴⁷ da su A120 i Q125, čiji se bočni lanci nalaze u blizini katalitičkih aminokiselina, odgovorni za veću enantioselektivnost HheB u odnosu na HheB2. Iz Tablice 11 vidljivo je da divlji tip HheB i mutant HheB2-T120A pokazuju sličnu selektivnost prema alifatskim epoksidima **1.4** – **1.9** i **1.11**, dok u slučaju aromatskih supstrata **1.16** – **1.21** najbližnju enantioselektivnost HheB pokazuje mutant HheB2-H125Q (Tablica 12). Stereopreferencija enzima ovisi o samoj strukturi supstrata zbog čega ne može biti jednoznačno određena. HDDH grupe B uglavnom su (*R*)-selektivni (Tablice 11 – 13), dok je (*S*)-selektivnost primijećena samo na tri monosupstituirana alifatska epoksida **1.4**, **1.7**, **1.9** (Tablica 11) i jednom monosupstituiranom aromatskom epoksidu **1.16** (Tablica 12).

Tablica 12. Kinetička rezolucija aromatskih epoksida **1.15** – **1.21** katalizirana HDDH

Epoksid	Enzim	<i>t</i> (h)	<i>X</i> (%) ^a	<i>e.v.s</i> (%) ^b	<i>e.v.p</i> (%) ^b	<i>E</i>	Konf. ^c
 1.15 F ₃ C	HheB2	-	-	-	-	-	
	F36I	-	-	-	-	-	
	T120A	-	-	-	-	-	
	C124Y	-	-	-	-	-	/
	H125Q	-	-	-	-	-	
	HheB ^d	-	-	-	-	-	
	HheB2	2	68	73	81	21	
F36I	2	65	92,5	65	15		
 1.16 CF ₃	T120A	2	64,5	82	55,5	9	<i>S</i>
	C124Y	2	50	45	70	9	
	H125Q	2	59	96	71	22	
	HheB ^d	2	63	84,5	71	15	
	HheB2	-	-	-	-	-	-
 1.17 CF ₃	F36I	-	-	-	-	-	<i>R</i>
	T120A	-	-	-	-	-	

	C124Y	-	-	-	-	-	
	H125Q	3	60	14,5	98	114	
	HheB ^d	3	53	12	98	111	
	HheB2	2	56,5	69	94	67	
	F36I	2	61,5	85	87	39	
 1.18	T120A	3	61	75,5	93,5	68	R
	C124Y	3	45	16	80,5	11	
	H125Q	1	58,5	95	87	53	
	HheB ^d	2	53	93	79	29	
	HheB2	3	46	13	99	>200	
	F36I	3	50,5	28	99	>200	
 1.19	T120A	3	52	29	99	>200	R
	C124Y	3	42	5,5	>99	>200	
	H125Q	3	53	33,5	99	>200	
	HheB ^d	3	62	64,5	99	>200	
	HheB2	2	53,5	28	63,5	6	
	F36I	2	71	47,5	48,5	5	
 1.20	T120A	3	61	66,5	63	9	R
	C124Y	3	56	1	39,5	2	
	H125Q	1	73	75	52	7	
	HheB ^d	2	67,5	59,5	39	4	
	HheB2	3	28	14,5	>99	>200	
	F36I	3	24	29	>99	>200	
 1.21	T120A	3	38	37,5	>99	>200	R
	C124Y	3	12	7	>99	>200	
	H125Q	3	40	33	>99	>200	
	HheB ^d	3	41	49,5	>99	>200	

^a konverzija određena GC metodom, ^b izračunato prema izrazima (13) i (14), ^c apsolutna konfiguracija brže reagirajućeg enantiomera epoksida, ^d četverostruki mutant F36I/T120A/C124Y/H125Q jednak je divljem tipu HheB

U posljednjoj seriji supstrata uključeni su derivati 2-benziloksirana (**1.1**) s različitim veličinom drugog supstituenta (Tablica 13). Dok se monosupstituirani epoksid **1.1** prevodi u racemični produkt s gotovo svim enzimima, uvođenje metilne ili etilne skupine u supstratima **1.22** i **1.23** dovodi do značajnog povećanja enantioselektivnosti ($E > 200$) (Tablica 13).

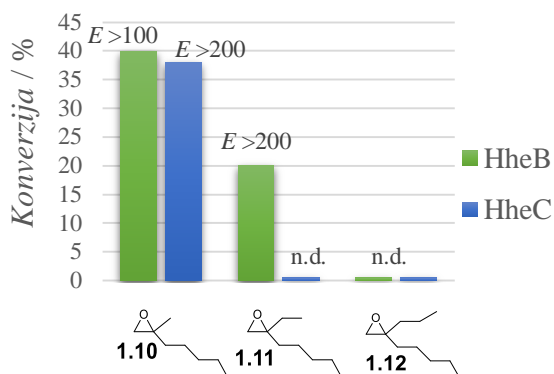
Tablica 13. Kinetička rezolucija derivata benziloksirana **1.1**, **1.22** – **1.24** katalizirana HDDH

Epoksid	Enzim	<i>t</i> (h)	<i>X</i> (%) ^a	<i>e.v.s</i> (%) ^b	<i>e.v.p</i> (%) ^b	<i>E</i>	Konf. ^c
 1.1	HheB2	0,25	33,5	5	9	1	<i>R</i>
	F36I	0,25	60,5	11	7	1	
	T120A	0,25	67	98	45,5	11	
	C124Y	0,25	33	7,5	17	2	
	H125Q	0,25	46	5	6	1	
	HheB ^d	0,25	55	81	66,5	12	
	 1.22	HheB2	1	47	80,5	99	
F36I		1	51	98	99	>200	
T120A		1	45	49	70	9	
C124Y		1	42	65	99	>200	
H125Q		1	51	95,5	99	>200	
HheB ^d		0,25	35	55	99	>200	
 1.23		HheB2	2	29	27,5	>99	>200
	F36I	2	39	50	>99	>200	
	T120A	2	59	90	>99	>200	
	C124Y	2	43	60	>99	>200	
	H125Q	2	55	91	>99	>200	
	HheB ^d	1	60	85,5	>99	>200	
	 1.24	HheB2	1	52	99	99	>200
F36I		0,25	49	93,5	96,5	196	
T120A		0,25	47	85	96	133	
C124Y		1	49	92	98,5	>200	
H125Q		0,25	46	83	97	172	
HheB ^d		0,25	45	81	94	103	

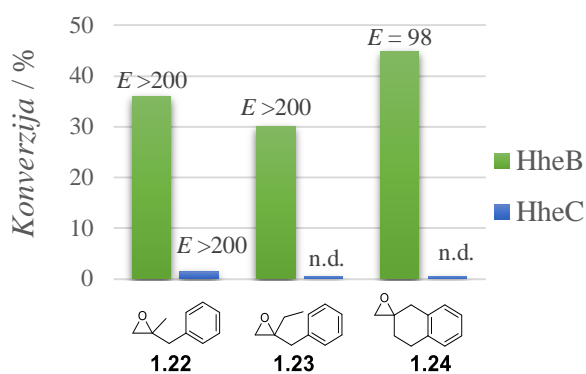
^a konverzija određena GC metodom, ^b izračunato prema izrazima (14) i (15), ^c apsolutna konfiguracija brže reagirajućeg enantiomera epoksida, ^d četverostruki mutant F36I/T120A/C124Y/H125Q jednak je divljem tipu HheB

Biciklička spiro struktura **1.24** prihvaćena je u aktivnom mjestu enzima B grupe, što nije slučaj kod HheC. Zbog relativno uskog aktivnog mjesta HheC može prihvatiti samo 2-metil-disupstituirane epoksidge poput **1.10**, dok rezolucija epoksidge s većim supstituentima **1.11** – **1.12**, **1.22** – **1.23** nije moguća (Slika 12 – 13).

Slično kao u reakcijama metil-supstituiranog alifatskog epoksida **1.10** s mutantom T120A (Tablica 11) i ovdje je primijećen neočekivani pad enantioselektivnosti za reakciju s metil-supstituiranim benziloksiranom **1.22** (Tablica 13). Rezultati dobiveni na derivatima benziloksirana **1.22** – **1.24** pokazuju pravu vrijednosti enzima B grupe HHDH i efikasnost u rezoluciji epoksida koji na kiralnom centru imaju veće supstituente, čime omogućavaju sintezu većih tercijarnih alkohola.

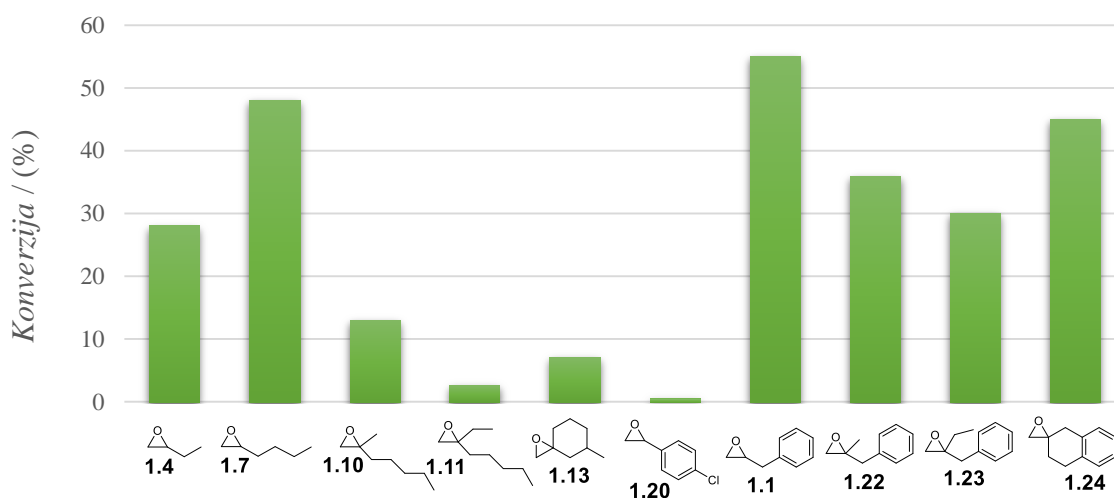


Slika 12. Kinetička rezolucija **1.10** – **1.12** katalizirana s HheB i HheC



Slika 13. Kinetička rezolucija **1.22** – **1.24** katalizirana s HheB i HheC

Među testiranim enzimima HheB ima najvišu enantioselektivnost, prihvaća veći broj supstrata (**1.11** i **1.17**) u odnosu na druge ispitane enzime, te pokazuje vrlo visoku aktivnost prema derivatima benziloksirana **1.22** – **1.24**. Iz Slike 14 može se vidjeti da je aktivnost HheB prema **1.1** i njegovim derivatima usporediva s aktivnosti enzima prema malim alifatskim epoksidima **1.4** i **1.7**.



Slika 14. Aktivnost HheB prema odabranim epoksidima

3.6. Molekulsko modeliranje

Eksperimentalna analiza nadopunjena je računalnim simulacijama pomoću kojih je identificiran precizan način vezanja molekula u aktivno mjesto enzima. Također, dan je detaljan reakcijski mehanizam prevođenja molekula epoksida do konačnih alkoholnih produkata. Analiza je provedena na enzimu HheB (PDB 4ZU3), te sintetski najzanimljivijim supstratima **1.22** – **1.24** uključujući i monosupstituirani analog **1.1**.

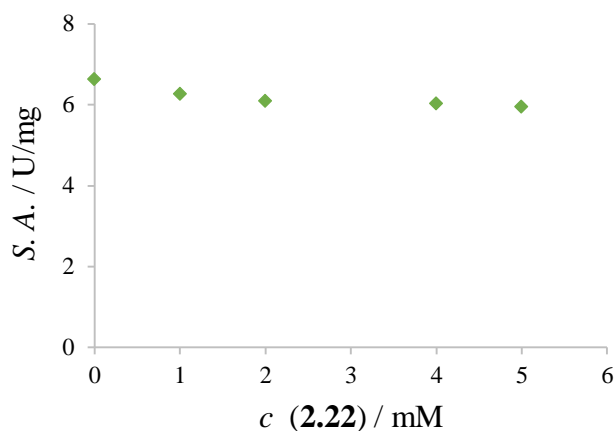
Glavni preduvjet enzimske reakcije je vezanje molekule supstrata u aktivno mjesto, te stvaranje kompleksa enzim-supstrat. Energije vezanja (ΔG_{BIND}) oba enantiomera supstrata (S) i produkta (P), prikazane su u Tablici 14. Slične vrijednosti dobivene za oba enantiomera svih supstrata ((R) i (S)-**1.1**, (R) i (S)-**1.22**, (R) i (S)-**1.23** i (R) i (S)-**1.24**) upućuju na povoljno vezanje svih reaktanata, međutim, ne pokazuju trend kojim bi se mogle interpretirati eksperimentalno dobivene *E*-vrijednosti. Rezolucija **1.22** – **1.24** izrazito je selektivna ($E > 200$), dok se u reakciji s **1.1** dobiva racemični produkt (Tablica 13).

Tablica 14. Energije aktivacije (ΔG^\ddagger), slobodna energija (ΔG_{R}) i energija vezanja oba enantiomera epoksida **1.1**, **1.22** – **1.24** ($\Delta G_{\text{BIND-S}}$) i azido-alkohola **2.1**, **2.22** – **2.24** ($\Delta G_{\text{BIND-P}}$) u aktivnom mjestu HheB

Supstrat	ΔG_{BIND}		ΔG^\ddagger	ΔG_{R}
	S	P		
(R)- 1.1	-11,4	-16,1	14,4	-28,1
(S)- 1.1	-11,1	-13,2	14,4	-21,1
(R)- 1.22	-11,5	-11,6	10,3	-34,5
(S)- 1.22	-11,2	-12,0	19,1	-24,1
(R)- 1.23	-11,3	-13,7	8,4	-20,9
(S)- 1.23	-11,8	-12,0	21,9	-14,4
(R)- 1.24	-12,3	-16,6	15,6	-22,0
(S)- 1.24	-11,0	-17,2	19,6	-19,6

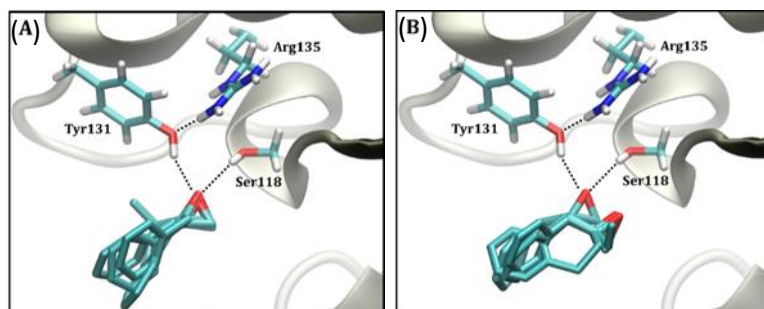
Primijećen je veći afinitet vezanja produkata u odnosu na afinitet vezanja reaktanta ($\Delta G_{\text{BIND-P}} > \Delta G_{\text{BIND-S}}$) iz čega bi se dalo zaključiti da produkti teže izlaze iz aktivnog mjesta, odnosno da dolazi do inhibicije enzima. Međutim, inhibicija enzima produktom **2.1** u rasponu koncentracija od 0 do 7 mM nije potvrđena eksperimentalno (Slika 15). Veći afiniteti vezanja azido-alkohola ($\Delta G_{\text{BIND-P}} > \Delta G_{\text{BIND-S}}$) mogu se objasniti otvaranjem rigidne strukture epoksida u fleksibilniju strukturu azido-alkohola koja se bolje smješta u aktivnom mjestu. Slobodne energije reakcije (ΔG_{R}) kreću se u rasponu od -14,4 do -34,5 kcal/mol i dovoljno su

egzergone da kompenziraju energiju vezanja produkata te njihovo otpuštanje iz aktivnog mjesta.



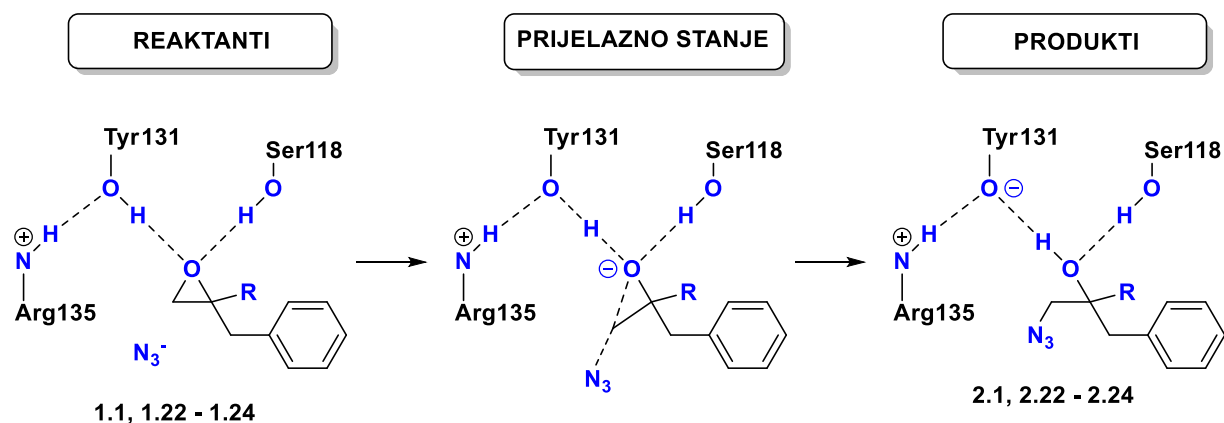
Slika 15. Grafički prikaz ovisnost specifične aktivnosti HheB2 o koncentraciji **2.22**

Da bi došlo do enzimske reakcije, osim vezanja u aktivno mjesto supstrat mora biti smješten u orijentaciji koja je optimalna za reakciju, što u slučaju većine bimolekularnih reakcija znači da dva supstrata moraju postići povoljnu međusobnu orijentaciju da bi došlo do prijelaznog stanja. Molekulsko uklapanje (engl. docking) oba enantiomera supstrata u aktivno mjesto HheB prikazano je na Slici 16. Svi (*R*)-enantiomeri smješteni su na način koji omogućava stvaranje vodikove veze između kisika epoksida i katalitičkih ogranaka Y131 i S118 (Shema 16A). Produktivno vezanje (*S*)-enantiomera primijećeno je samo kod (*S*)-**1.1** (Shema 16B). Dobiveni rezultati u skladu su s eksperimentalnim rezultatima (Tablica 13) gdje reakcije s **1.22** – **1.24** pokazuju visoku (*R*)-selektivnost, dok se u reakciji s **1.1** dobiva racemični produkt zbog mogućeg povoljnog vezanja oba enantiomera epoksida u aktivnom mjestu enzima (Slika 16).



Slika 16. Vezanje supstrata u aktivnom mjestu HheB. (A) Povoljno vezanje (*R*)-**1.1**, (*R*)-**1.22** – (*R*)-**1.24**, (B) Nepovoljno vezanje (*S*)-**1.22** – (*S*)-**1.24** i povoljno vezanje (*S*)-**1.1**

Mehanizam reakcije otvaranja epoksidnog prstena u aktivnom mjestu HheB uz NaN_3 kao nukleofil prikazan je na Shemi 32. U prvom koraku OH skupine bočnih lanaca tirozina 131 i serina 118 tvore vodikove veze s kisikom epoksida te dolazi do njegovog smještanja u aktivno mjesto enzima. U prijelaznom stanju azidni ion se približava $\text{C}(\beta)$ atomu epoksida pri čemu dolazi do izduživanja $\text{C}(\beta)\text{-O}$ veze. Arginin 135 koji se nalazi u blizini tirozina 131 stabilizira nastali fenoksid preko vodikove veze $\text{N-H}\cdots\text{O}$. Donacijom protona na kisik nastaje neutralna molekula azido-alkohola.



Shema 32. Predloženi mehanizam reakcije otvaranja epoksida uz azidni ion kao nukleofil u aktivnom mjestu HheB

Energije aktivacija (ΔG^\ddagger) znatno se razlikuju za (*R*)- i (*S*)-enantiomer u svim reakcijama, osim za reakciju s **1.1** gdje je i eksperimentalno dokazano dobivanje gotovo racemičnog produkta (Tablica 14). Energije aktivacija za oba enantiomera **1.1** iznose 14,4 kcal/mol što je u skladu s njihovim produktivnim vezanjem u aktivnom mjestu (Slika 16). Vrijednost od 14,4 kcal/mol ujedno je i najniža energija aktivacije izračunata za (*S*)-enantiomer (Tablica 14). Energija aktivacije u reakciji s **1.24** razlikuje se za 4 kcal/mol u korist (*R*)-enantiomera, dok je za supstrate **1.22** i **1.23** razlika među enantiomerima veća, 8,8 kcal/mol i 13,5 kcal/mol. Što je veća razlika u energiji aktivacije među enantiomerima to je enantioselektivnost HheB veća: *E* vrijednost **1.22** \approx **1.23** > **1.24** > **1.1** (Tablica 13). Smanjenjem razlike u energiji aktivacije između enantiomera smanjuje se i enantioselektivnost enzima, što je primijećeno kod reakcija metil-supstituiranih epoksida **1.11** i **1.22** kataliziranim s HheB2-T120A (Tablice 11 i 13). Kod kinetičke rezolucije **1.22** primijećen je porast aktivacijske energije za (*R*)-**1.22** s 10,3 kcal/mol (HheB) na 16,2 kcal/mol (HheB2-T120A), dok je aktivacijska energija za (*S*)-**1.22** ostala nepromijenjena (19,1 kcal/mol).

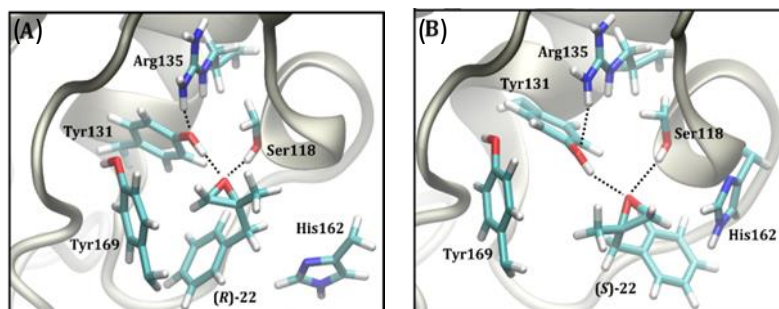
Tablica 15. Ukupne energije vezanja (*R*)-1.1 i (*R*)-1.22 – 1.24 (ΔG_{BIND} (R) / kcal/mol) podijeljene na doprinose pojedinih aminokiselina HheB

(R)-1.1		(R)-1.22		(R)-1.23		(R)-1.24	
H162	-1.79	Y169	-1.78	Y169	-2.05	Y131	-2.40
G161	-1.79	S118	-1.73	S118	-1.41	S118	-1.76
Y169	-1.49	Y131	-1.42	Y131	-1.36	Y169	-1.69
T164	-1.33	H162	-0.95	H162	-1.19	H162	-1.00
Y131	-0.83	A120	-0.65	G125	-0.72	R135	-0.89

Tablica 16. Ukupne energije vezanja (*S*)-1.1 i (*S*)-1.22 – 1.24 (ΔG_{BIND} (R) / kcal/mol) podijeljene na doprinose pojedinih aminokiselina HheB

(S)-1.1		(S)-1.22		(S)-1.23		(S)-1.24	
G161	-2.33	H162	-1.82	Y131	-1.84	Y131	-1.91
H162	-1.35	T164	-1.76	H162	-1.75	Y169	-1.47
Y169	-1.13	Y169	-1.55	Y169	-1.69	S118	-1.35
T164	-1.04	G161	-1.22	G125	-1.13	G125	-0.92
Y131	-0.97	W163	-0.72	F170	-0.69	H162	-0.79

Ukupne energije vezanja podijeljene su na doprinose pojedinačnih aminokiselina HheB kako bi se odredilo koja od njih najviše doprinosi selektivnosti. Osim za katalitičku trijadu (S118, Y131 i R135) uočen je bitan doprinos tirozina na poziciji 169 i histidina na poziciji 162 (Tablica 15). $-\text{CH}_2-$ skupina epoksida tvori odgovarajuće C-H $\cdots\pi$ interakcije s fenilnim bočnim lancem Y169, pri čemu alkilne skupine poput metila i etila doprinose navedenim interakcijama. Iz Tablice 15 je vidljivo da Y169 ima veći doprinos za vezanje (*R*)-1.22 i (*R*)-1.23 koji posjeduju dodatnu metilnu i etilnu skupinu (-1,78 i -2,05 kcal/mol) u odnosu na znatno manji doprinos za vezanje (*R*)-1.1 i nefleksibilne cikličke strukture kod (*R*)-1.24 (-1,39 i -1,53 kcal/mol). Histidin na poziciji 162 znatno doprinosi vezanju (*S*)-1.22 i (*S*)-1.23 (Tablica 16). Na Slici 17. (A) i (B) prikazan je položaj i konformacijske promjene Y169 i H162 prilikom vezanja (*R*)-1.22 i (*S*)-1.22.



Slika 17. (A) Prikaz važnosti položaja Y169 za vezanje (R)-**1.22**, (B) Prikaz važnosti položaja H162 za vezanje (S)-**1.22**

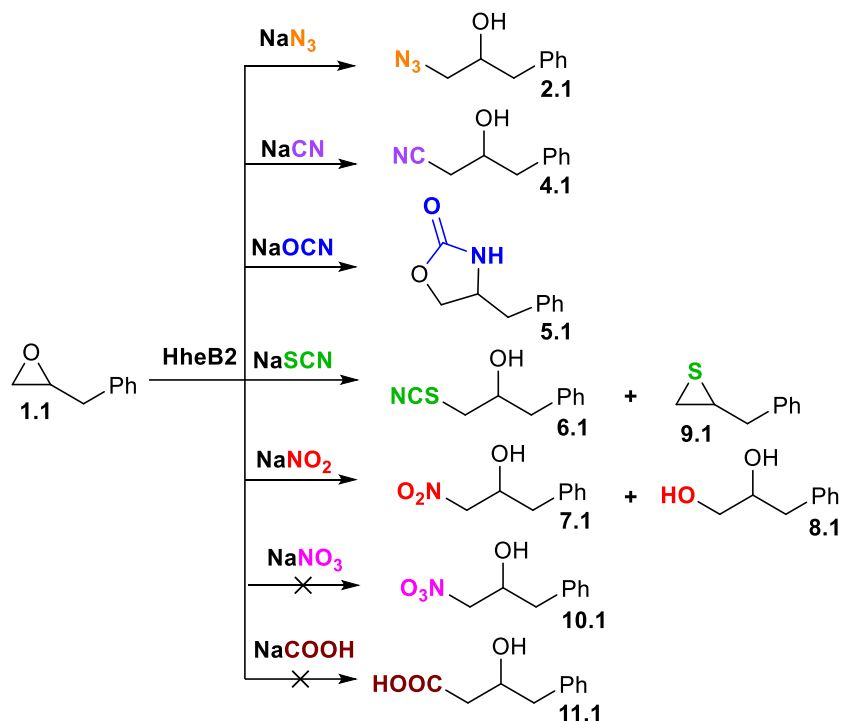
Računalna analiza pokazala je da ne postoji korelacija između afiniteta vezanja epoksida, azido-alkohola i enantioselektivnosti enzimske reakcije. S druge strane, izračunati kinetički i termodinamički parametri reakcije koja se odvija unutar aktivnog mjesta, jasno objašnjavaju povećanu enantioselektivnost HheB prema disupstituiranim epoksidima **1.22** – **1.24** u odnosu na njihov nesupstituirani analog **1.1**.

3.7. Ispitivanje nukleofila

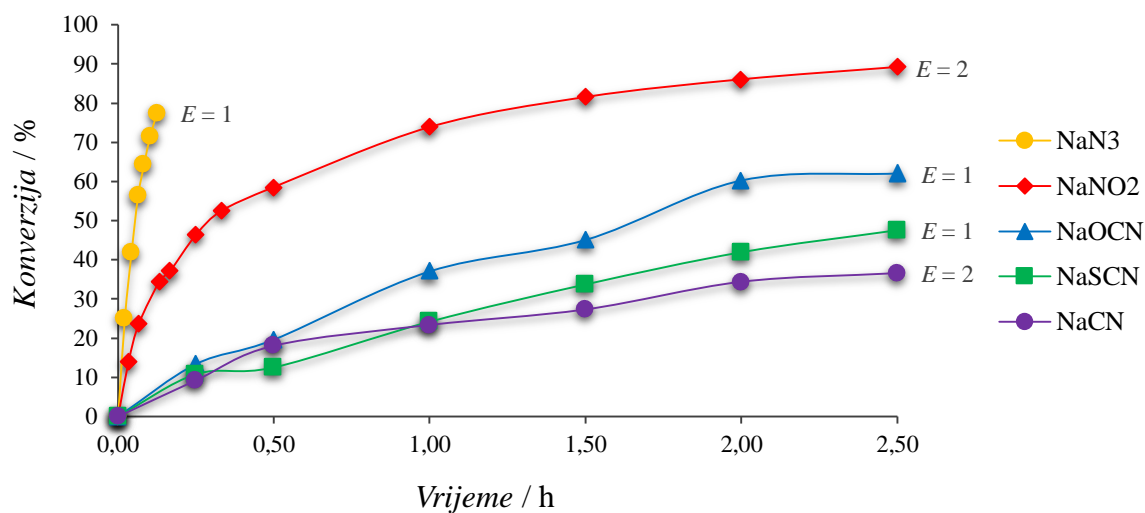
Aktivno mjesto HHDH osim mjesta za vezanje supstrata posjeduje i džep za vezanje nukleofila. Strukture veznog mjesta nukleofila enzima HheB i HheC vrlo su slične. Od ranije je poznato da enzim HheC ima mogućnost prihvatanja neprirodnih nukleofila poput azida, cijanida, cijanat, tiocijanata, nitrita i formijata.⁵⁶ Do danas je za HheB poznato da prihvaća samo azidni i cijanidni ion kao nukleofile. S ciljem proširivanja katalitičkog djelovanja B grupe HHDH ispitano je sedam različitih nukleofila (NaN_3 , NaNO_2 , NaCN , NaOCN , NaSCN , NaNO_3 , NaCOOH) u reakcijama kataliziranim HheB2. Reakcija otvaranja epoksida **1.1** odabrana je kao modelna reakcija za ispitivanje nukleofila, zbog visoke kemijske stabilnosti **1.1**, te visoke aktivnosti koju je HheB2 pokazao u azidolizi **1.1** (Shema 33). Od sedam testiranih nukleofila, HheB2 prihvaća pet: NaN_3 , NaNO_2 , NaCN , NaOCN , NaSCN , dok u reakcijama s NaNO_3 i NaCOOH nije primijećen nastanak produkata. U reakcijama kinetičke rezolucije s nitritnim ionom uz nitro-alkohol **7.1** kao produkt nastaje i odgovarajući diol **8.1** napadom kisika na epoksidni prsten. Reakcije s cijanidom i cijanatom daju odgovarajući cijano-alkohol **4.1**, odnosno oksazolidinon **5.1**, dok u reakciji s NaSCN nastaje nestabilni β -hidroksi tiocijanat **6.1** koji spontano prelazi u odgovarajući tiiran **9.1**.

Unatoč niskoj enantioselektivnosti ($E = 1 - 2$) enzim u svim reakcijama preferira (R)-enantiomer iz čega se može zaključiti da je smjer stereoselektivnosti neovisan o nukleofilu. S

druge strane, enzimaska aktivnost ovisna je o nukleofilu (Slika 18). Reakcije su najbrže uz azidni ion, a najsporije uz cijanidni ion. Enzim je u svim reakcijama pokazao izrazito visoku β -regioselektivnost.



Shema 33. Ispitani nukleofili i produkti nastali u reakciji **1.1** kataliziranoj enzimom HheB2

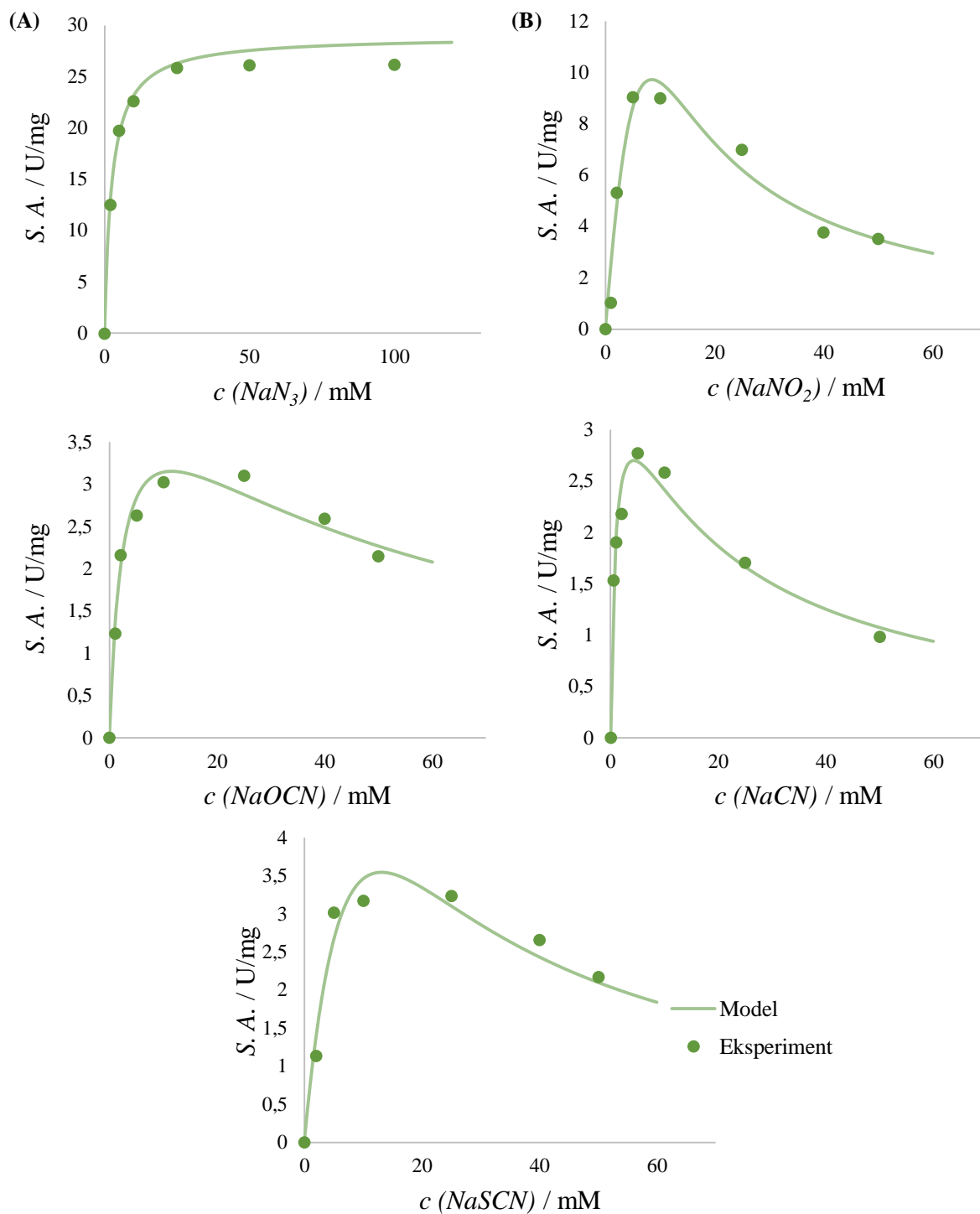


Slika 18. Krivulje tijeka reakcije otvaranja **1.1** s različitim nukleofilima

3.8. Kinetička ispitivanja

U svrhu određivanja afinitet HheB2 prema nukleofilima, metodom početnih reakcijskih brzina procijenjeni su parametri MM kinetike (V_m , K_m i K_i) na modelnoj reakciji otvaranja epoksida **1.1** (Shema 33). Na Slici 19 prikazana je ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentraciji nukleofila. Točke na grafovima prikazuju eksperimentalno dobivene rezultate, a linija rezultate dobivene modelom. Valjanost odabranog MM modela potvrđena je dobrim slaganjem eksperimentalnih rezultata i dobivene simulacije. Iz grafičkih prikaza ovisnosti specifične aktivnosti HheB2 o koncentraciji nukleofila vidljivo je da azidni ion ne uzrokuje inhibiciju enzima pri koncentracijama do 100 mM (Slika 19 (A)), dok ostali ioni uzrokuju inhibiciju pri koncentracijama većim od 10 mM (Slika 19 (B-E)).

Procijenjeni parametri MM kinetike prikazani su u Tablici 17. Konstanta inhibicije (K_i) za azidni nukleofil nije procijenjena jer nema inhibicije, dok se za ostale nukleofile kreće se u rasponu od 2 do 52 mM. Najmanja K_m vrijednost dobivena je za cijanid (0,98 mM), što znači da enzim ima najveći afinitet prema navedenom nukleofilu. Afinitet HheB2 prema ostalim nukleofilima smanjuje se redom: azid (2,51 mM), cijanat (2,54 mM), tiocijanat (13,23 mM) i nitrit (32,75 mM). Najveća maksimalna brzina reakcije (V_m) procijenjena je za nitrit, a najniža je za cijanid. Prema procijenjenim konstantama inhibicije može se zaključiti da je utjecaj inhibicije najznačajniji za nitritni ion jer je konstanta inhibicije najniža, dok je u slučaju cijanata relativno slaba na što upućuje visoka vrijednost procijenjene konstante inhibicije u reaktoru (Tablica 17). Primjerice, u slučaju odabira veće koncentracije epoksida kao supstrata, nukleofil koji je jaki inhibitor enzimske aktivnosti, potrebno je dodavati pomoću pumpe u reaktor kako bi se koncentracija održala na odgovarajućoj vrijednosti koja osigurava maksimalnu aktivnost enzima.



Slika 19. MM krivulja – grafički prikaz ovisnosti specifične aktivnosti HheB2 o koncentraciji nukleofila (NaN_3 , NaNO_2 , NaOCN , NaCN , NaSCN)

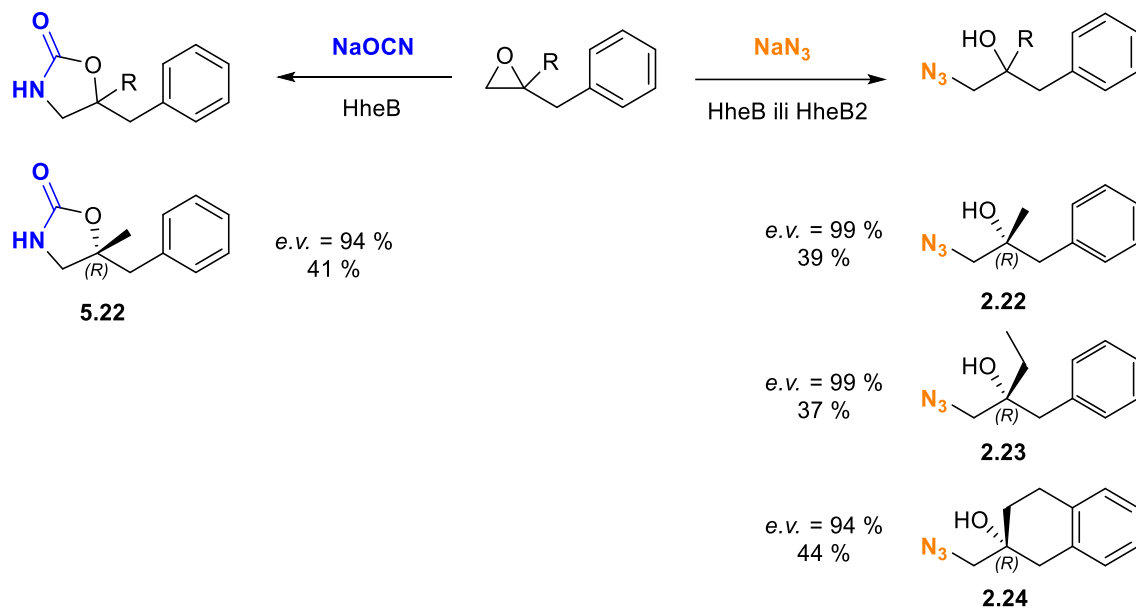
Tablica 17. Procijenjeni parametri MM kinetike

Nukleofil	V_m / U/mg	K_m / mM	K_i / mM
NaN ₃	28,93	2,51	-
NaNO ₂	84,46	32,75	2,22
NaCN	3,98	0,98	18,91
NaOCN	4,54	2,54	52,50
NaSCN	10,68	13,23	13,09

3.9. Enzimske reakcije na preparativnoj skali

Da bi pokazali sintetsku primjenu ovih enzima, neke od reakcija provedene su na preparativnoj skali. Za to su odabrani supstrati **1.22** – **1.24** kod kojih je enzimska aktivnost i enantioselektivnost bila najviša, te enzimi koji su pokazali najbolja biokatalitička svojstva (HheB i HheB2) (Shema 34). Od pet nukleofila za koje je dokazano da su prihvaćeni u aktivnom mjestu, azid i cijanat odabrani su za reakcije na preparativnoj skali. Azidni ioni ne uzrokuju inhibiciju pri koncentracijama do 100 mM, reakcije su izrazito brze i selektivne, dok cijanat uzrokuje najmanju inhibiciju enzima pri povećanim koncentracijama (Slika 1, Tablica 17). Preostala tri nukleofila (NaCN, NaSCN i NaNO₂) uzrokuju značajnu inhibiciju enzima pri povećanim koncentracijama. Osim inhibicije nukleofilom, pretpostavka je da dolazi i do inhibicije produktom što dovodi do niskih konverzija. To se najviše odnosi na reakcije s cijanidom. Produkti koji nastaju u reakciji s tiocijanatom su nestabilni, zbog čega se u navedenim reakcijama dobiva smjesa produkata, odnosno tiocijanat-alkohola i tiirana. U reakcijama s nitritom, također nastaje smjesa dva produkta. Sve navedeno uzrokuje niska reakcijska iskorištenja zbog čega cijanid, tiocijanat i nitrit nisu odabrani za ispitivanja na preparativnoj skali.

Enzimske reakcije provedene su na skali od 1 mmol kako je opisano u poglavlju 4.8. eksperimentalnog dijela. Azidolizom epoksida **1.22** – **1.24** pripremljeni su odgovarajući (*R*)-azido-alkoholi **2.22** – **2.24**. visoke enantiomerne čistoće od 94 – 99 % *e.v.*, a iskorištenja nakon kromatografskog čišćenja iznosila su 37 – 44 %. Kinetičkom rezolucijom **1.22** s natrij cijanatom sintetiziran je odgovarajući oksazolidinon (*R*)-**5.22** u enantiomernom suvišku od 94 % *e.v.* i iskorištenju od 41 %. Ostali supstrati **1.23** i **1.24** s cijanatom nisu dali produkte niti u tragovima. Neki supstrati, unatoč tome što reagiraju s azidom, ne reagiraju s cijanatnim ionima. Slično ponašanje primijećeno je i u reakcijama s HheC, kada su korišteni epoksidi supstituirani većim grupama. (69)



Shema 34. Sinteza enantiomerno obogaćenih azido-alkohola i oksazolidinona katalizirana HheB/HheB2 enzimima

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Metode

Spektri nuklearne magnetske rezonancije snimljeni su na instrumentu Bruker AV 300 ili 600 (^1H na 300 ili 600 MHz, ^{13}C na 75 ili 151 MHz). Spektri su snimljeni u CDCl_3 , kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm prema tetrametilsilanu (TMS, $\delta = 0,00$ ppm) kao unutarnjem standardu, a konstante spreznja (J) u Hz. Signali su označeni kao s = singlet, d = dublet, dd = dublet dubleta, t = triplet, q = kvartet i m = multiplet. Maseni spektri visoke rezolucije (HRMS) snimljeni su na instrumentu 4800 Plus MALDI TOF/TOF, Applied Biosystems.

Tankoslojna kromatografija (TLC) rađena je na komercijalno dostupnim aluminijskim pločicama silikagela, 0,25 mm TLC-Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck). Spojevi su detektirani pomoću UV lampe pri 254 nm ili su bojani fosfomolibdatnim reagensom. Za kromatografsko čišćenje produkata korištene su kolone punjene silikagelom (veličina čestica 60Å, Sigma-Aldrich). Plinska kromatografija (GC) rađena je na instrumentima Agilent 8860 i 7820A s plameno-ionizacijskim detektorom i dušikom kao plinom nosiocem. Temperatura injektora iznosila je 250 °C, a temperatura detektora 300 °C. Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija (HPLC) provedena je na instrumentu Agilent 1260 Infinity II s UV detektorom. Kao mobilna faza korištena je smjesa 2-PrOH/*n*-heksana u različitim omjerima. Za mjerenje koncentracije i aktivnosti enzima koristio se instrument UV-VIS spektar, Shimadzu UV-1280. Optičko skretanje mjereno je na automatskom polarimetru AA-10, Optical Activity.

Hranjive podloge pripremale su se korištenjem pročišćene vode pomoću uređaja Millipore (Bedford, MA) Milli-Q. Posuđe i hranjive podloge za pripremu enzima sterilizirane su na uređaju nūve steamArt, OT 90L.

4.2. Materijali

Popis komercijalno dostupnih korištenih kemikalija:

Sigma-Aldrich: (2,3-epoksipropil)benzen, stiren oksid, alil glicidil eter, 1,2-epoksibutan, epiklorhidrin, 1,3-dikloro-2-propanol, 1,2-epoksiheksan, cikloheksen oksid, trimetilsulfoksonium jodid, trimetilsulfonium jodid, KO*t*Bu, NaH (60 %-tna disperzija u mineralnom ulju), azidotrimetilsilan, (*R,R*)-*N,N*-bis(3,5-di-*tert*butilsaliciliden)-1,2-cikloheksandiaminokrom-(III), BSA, Sorbitol, Tris (Trizma®).

Alfa Aesar: 3,3-Dimetil-1,2-epoksibutan, 4-klorostiren oksid, 2-metil-3-fenil propen, 2-tetralon, NaN₃, NH₄Cl.

AK Scientific: 2'-trifluorometilacetofenon, 3'-trifluorometilacetofenon, 4'-trifluorometilacetofenon, 2-trifluorometilbenzaldehyd, 3-trifluorometil-benzaldehyd, 4'-kloroacetofenon.

Carl Roth: L-Arabinoza, natrijeva sol ampicilina, β-merkaptoetanol, glicerol, EDTA, SDS, APS, BPB, TEMED, 30 % otopina akrilamida.

Difco: Bakto-tripton, hranjiva podloga (BD, LB Broth, Miller Lauria-Bertaini), agar (BD, Bacto™ Agar).

Kemika: NaCN, octena kiselina.

Roche: proteazni inhibitor (cOmplete Tablets, EDTA-free).

ThermoScientific: marker za elektroforezu PageRuler Unstained Protein Ladder.

4.3. Priprava i karakterizacija enzima

4.3.1. Priprava enzima

4.3.1.1. Uzgoj kulture transformiranih ultrakompetentnih stanica XL10-Gold®

Na krutu LB podlogu s ampicilinom nacijepnjene su XL10-Gold stanice sa željenim plazmidom te su inkubirane preko noći pri 37 °C. Idući dan po jedna kolonija prenesena je mikrobiološkom ušicom u sterilnu tubu (10 mL) za uzgoj u kojoj se nalazi 5 mL tekuće LB hranjive podloge i 5 μL ampicilina. Mala kultura inkubirana je preko noći pri 37 °C i 250 okr/min (Thermo Scientific, MaxQ 4450). Cijeli postupak proveden je u sterilnim uvjetima uz plamenik.

4.3.1.2. Izolacija plazmida pomoću kompleta za izolaciju plazmidne DNA

Plazmidni vektori izolirani su pomoću kompleta za izolaciju plazmidne DNA (Thermo scientific; GeneJET Plasmid Miniprep Kit) prema uputama proizvođača za high-copy plazmide.

1. U vialicu od 2 mL dodano je 2 mL male kulture i centrifugirano je 2 min pri 8000 g i 25 °C (Thermo Scientific, SL 8R Centrifuge).
2. Nadtalog je bačen, a talog je resuspendiran s tipsom u 250 μL otopine za resuspenziju.
3. U otopinu je dodano 250 μL otopine za lizu i resuspendirano.
4. U otopinu je dodano 350 μL otopine za neutralizaciju i resuspendirano.

5. Otopina je centrifugirana 5 minuta pri 12000-13000 g i 25 °C.
6. Supernatant je prebačen u vialicu s filterom i otopina je centrifugirana 1 min pri 12000-13000 g i 25 °C.
7. Dio otopine zadržan na filteru opran je s 500 µL otopine za pranje i centrifugiran 1 min pri 12000-13000 g i 25 °C. Postupak je ponovljen dva puta.
8. Filter je prebačen u vialicu od 1,5 mL i dodano je 50 µL sterilne vode. Vialica je inkubirana 2 min i centrifugirana 2 min pri 12000-13000 g i 25 °C. Plazmid je pohranjen u vialici i čuvan pri -20 °C.

4.3.1.3. Priprema elektrokomponentnih stanica MC1061

Prvi dan – Stanice *E. coli* soj MC1061 nacijspljene su na krutu LB podlogu i inkubirane preko noći pri 37 °C. Postupak je proveden u sterilnim uvjetima uz plamenik.

Drugi dan – U sterilnu tubu za uzgoj (10 mL) pipetirano je 5 mL tekuće LB podloge, mikrobiološkom ušicom dodana je jedna kolonija s krute LB podloge, te je inkubirano preko noći pri 37 °C i 250 okr/min. Postupak je proveden u sterilnim uvjetima uz plamenik.

Treći dan – U Erlenmeyerovu tikvicu od 2 L dodano je 200 mL tekuće LB podloge, 450 µL glukoze ($w/v = 0,5\%$) i 4 mL svježe prekonoćne bakterijske kulture. Postupak je proveden u sterilnim uvjetima uz plamenik. Kultura je inkubirana je pri 37 °C i 250 okr/min sve dok optička gustoća stanica pri $\lambda = 600$ nm nije dosegla vrijednost apsorbancije od $\approx 0,3 - 0,4$. Bakterijska kultura podijeljena je u Falcon epruvete, stavljena 20 minuta na led, te centrifugirana 30 min pri 4000 g i 4 °C. Nadtalog je odekantiran, a stanice oprane redom s: 45 mL, 37,5 mL, 25 mL i 12,5 mL hladne sterilne vode. Između svakog pranja centrifugirane su 30 min pri 4000 g i 4 °C. Stanice su zatim resuspendirane u ukupnom volumenu od 20 mL hladnog sterilnog glicerola ($v/v = 10\%$) i centrifugirane 30 min pri 4000 g i 4 °C. Nadtalog je odekantiran, a stanice su ponovno resuspendirane u 2 mL sterilnog glicerola. Po 50 µL stanica otpipetirano je u sterilne vialice od 0,5 mL. Zamrznute su na suhom ledu i pohranjene na -80 °C.

4.3.1.4. Transformacija elektrokompetentnih MC1061 stanica plazmidnom DNA

1 µL plazmida dodan je u epruvetu s 50 µL elektrokompetentnih MC1061 stanica. Ukupni volumen prebačen je sterilnom pipetom u pothlađenu kivetu za elektroporaciju (razmak elektroda 0,2 cm). Elektroporacija je izvedena (BIO-RAD; MicroPulser) pri naponu od 2500

V u trajanju od 5 ms (program EC2). Nakon elektroporacije u kivetu je dodan 1 mL tekuće LB hranjive podloge, resuspendirano je i prebačeno u sterilnu tubu za uzgoj (5 mL). Inkubirano je 30 min pri 37 °C i 250 okr/min. 100 µL kulture prebačeno je na krutu hranjivu podlogu s ampicilinom i razmazano sterilnim staklenim štapićem. Inkubirano je preko noći pri 37 °C. Postupak je proveden u sterilnim uvjetima uz plamenik.

4.3.1.5. Prekomjerna ekspresija HHDH proteina

Prvi dan (priprema male prekonoćne kulture) – U Erlenmeyerovu tikvicu od 20 mL dodano je 20 mL tekuće LB hranjive podloge, 20 µL ampicilina i 2 –5 bakterijskih kolonija. Postupak je proveden u sterilnim uvjetima uz plamenik. Inkubacija je provedena preko noći pri 37 °C i 250 okr/min.

Drugi dan (priprema velike prekonoćne kulture) – U Erlenmeyerovu tikvu od 2 L dodano je 500 mL tekuće LB hranjive podloge, 500 µL ampicilina (100 mg/mL), 5 mL svježije prekonoćne kulture i 500 µL arabinoze (200 mg/mL). Postupak je proveden u sterilnim uvjetima uz plamenik. Inkubacija je provedena preko noći pri 30 °C i 200 okr/min.

4.3.1.6. Izolacija proteina

Velika prekonoćna kultura raspodijeljena je u Falcon epruvete te je centrifugirana 30 min pri 4500 okr/min i 4 °C. Nadtalozni su bačeni, a talozni su resuspendirani u TEMG puferu (0,25 g/mL). U suspenziju je dodan proteazni inhibitor (400 µL inhibitora na 10 mL TEMG pufera), i sonificirana je (SONOPULS, Bandelin, sonda TS102) u ciklusima 10×10" 3 min (na ledu, 10 puta 10 sekundi sonificiranja nakon kojih slijedi 10 sekundi pauze). Suspenzija je zatim prebačena u vialice i centrifugirana 45 min pri 11000 okr/min. Nadtalog je pohranjen u vialice i spremljen na -20 °C.

4.3.1.7. Priprema hranjivih podloga, otopina i pufera

Kruta hranjiva podloga

25 g LB podloge u prahu i 15 g agara otopljeno je u 1 L miliQ vode te sterilizirano pri 120 °C. 20 mL podloge izliveno je u sterilne plastične Petrijeve zdjelice te ohlađeno. Postupak je proveden u sterilnim uvjetima uz plamenik. Za uzgoj bakterija koje su transformirane plazmidom koji nosi gen za otpornost na ampicilin korištene su krute podloge s dodatkom ampicilina tako da bude zadovoljen omjer 1 mL LB : 1 µL ampicilin.

Tekuća hranjiva podloga

25 g LB podloge u prahu otopi se u 1 L miliQ vode i sterilizira pri 120 °C.

Priprema ostalih otopina:

- Otopina **ampicilina** koncentracije 100 mg/mL pripravljena je u miliQ vodi i sterilizirana propuštanjem kroz sterilni filter (0,2 µm). Čuvano pri -20 °C.
- Otopina **L-arabinoze** koncentracije 200 mg/mL pripravljena je u miliQ vodi i sterilizirana propuštanjem kroz sterilni filter (0,2 µm). Čuvano pri -20 °C.
- Pufer **Tris-SO₄** koncentracije 1 mol/L pripremljen je u miliQ vodi. pH 7,5 podešen je dodatkom sumporne kiseline.
- Otopina **EDTA** koncentracije 0,01 mol/L pripravljena je u miliQ vodi. U pripravljenu otopinu dokapavana je otopina NaOH do potpunog otapanja EDTA.
- 50 mL **TEMG pufera** pripravljeno je miješanjem:
 - 0,5 mL Tris-SO₄
 - 5 mL EDTA
 - 5 mL glicerola
 - 3 µL β-merkaptoetanola
 - miliQ voda do 50 mL

4.3.2. Karakterizacija enzima

4.3.2.1. SDS-PAGE elektorforeza

„Resolving“ i „stocking“ otopine za polimerizaciju gelova pripremljene su prema uputama u Tablici 18. Uzorci za elektroforezu pripremljeni su miješanjem 10 µL enzimskog ekstrakta i 10 µL „sample buffera“ (Tablica 18). Uzorci su zatim centrifugirani 1 minutu pri maksimalnom broju okretaja, inkubirani 10 minuta u vrućoj vodi i ponovno centrifugirani 1 minutu. Nakon polimerizacije gelova u jažice je nanešeno po 10 µL markera (THERMO SCIENTIFIC) i prethodno pripremljenih uzoraka. Gel s nanešenim uzorcima prenesen je u jedinicu za elektroforezu koja je ispunjena „running bufferom“ (Tablica 18). Elektroforeza je provedena pri konstantnom naponu od 200 V (BIORAD Mini-PROTEAN Tetra System). Po završetku elektroforeze gel je prebačen u otopinu za bojanje (Tablica 18), a nakon toga u 10 % octenu kiselinu za odbojavanje.

Potrebne otopine:

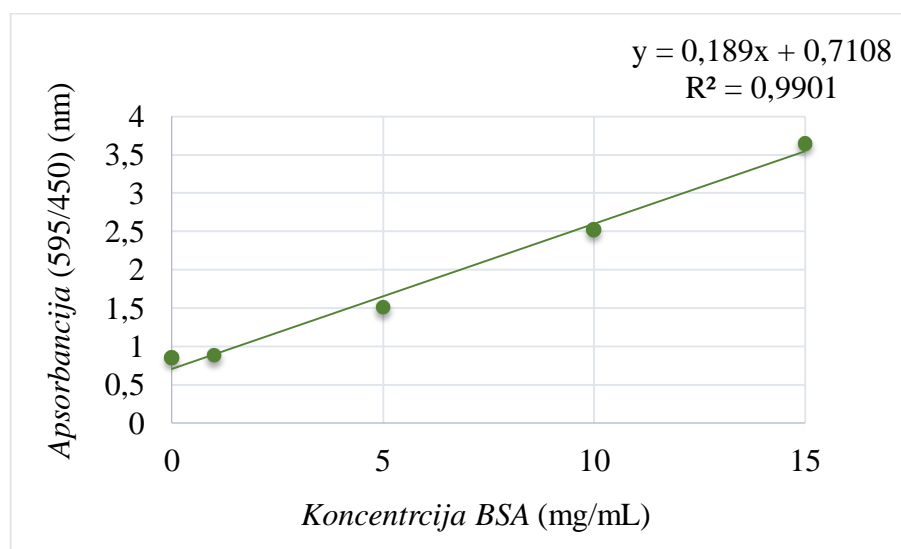
- Pufer **Tris** koncentracije 1,5 mol/L pripravljen je u miliQ vodi, pH 8,8 podešen je dodatkom 6 M HCl
- Pufer **Tris** koncentracije 0,5 mol/L pripravljen je u miliQ vodi, pH 6,8 podešen je dodatkom 6 M HCl
- 10 % otopina **APS-a** pripravljena je otapanjem u miliQ vodi neposredno prije pripreve gelova
- 10 % otopina **SDS-a** pripravljena je otapanjem u miliQ vodi
- 10 % otopina **BPB** pripravljena je otapanjem u miliQ vodi
- 10 % **octena kiselina** pripravljena je razrijeđivanjem koncentrirane kiseline u miliQ vodi
- 30 % otopina **akrilamida**

Tablica 18. Priprema otopina za SDS-PAGE elektforezu

„Resolving gel“	„Stocking gel“	„Sample buffer“	„Running buffer“	Otopina za bojanje
3,35 mL vode	3,05 mL vode	3,55 L vode	1 L vode	0,1 g CBB
1,25 mL 1,5 M Tris pH 8,8	1,25 mL 50 mM Tris pH 6,8	1,25 mL 50 mM Tris pH 6,8	30,3 g Tris	50 mL MeOH
4 mL 30 % akrilamid	0,66 mL 30 % akrilamid	2,5 mL glicerol	144,2 g glicin	7 mL 10 % octena kiselina
0,1 mL 10 % SDS	0,05 mL 10 % SDS	2 mL 10 % SDS	10 g SDS	43 mL vode
0,05 mL 10 % APS	0,05 mL 10 % APS	0,2 mL 10 % BPB		
0,005 mL TEMED	0,005 mL TEMED			

4.3.2.2. Mjerenje koncentracije metodom po Bradfordu

Baždarni pravac ovisnosti koncentracije o apsorbanciji za izračun ukupne koncentracije proteina izrađen je mjerenjem apsorbancije otopina BSA poznatih koncentracija. Na y osi baždarnog pravca prikazan je omjer apsorbancija uzorka na dvije valne duljine 595/450 nm u ovisnosti o koncentraciji albumina prikazanog na x osi (Slika 20). Razrijeđeni uzorci enzimskog ekstrakta pomiješani su s Bradfordovim reagensom. Nakon inkubacije od 10 minuta uzorci su snimljeni na dvije valne duljine. Odgovarajuće koncentracije izračunate su iz jednadžbe pravca ($y = 0,189x + 0,7108$, Slika 20). Svi uzorci snimani su u tri paralele.



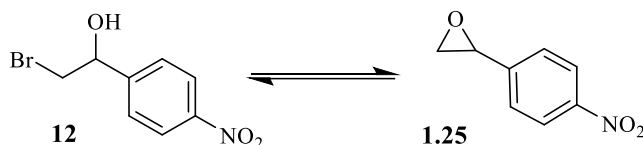
Slika 20. Baždarna krivulja – ovisnost koncentracije BSA o apsorbanciji

- Priprema 100 mL Bradfordovog reagensa:
 - 10 mg CBB
 - 5 mL 95 % EtOH
 - 10 mL 85 % fosforne kiseline
 - miliQ voda do ukupnog volumena od 100 mL

Nakon pripreme Bradfordov reagens se profiltrira pri čemu dolazi do promjene boje iz plave u crvenkastu.

4.3.2.3. Mjerenje aktivnosti PNSHH testom

Aktivnost pripremljenih enzima provjerena je PNSHH testom, u kojem se prati promjena apsorbancije u vremenu u reakciji zatvaranja 1-(*p*-nitrofenil)-2-brometanola (PNSHH) **12** u *p*-nitrostiren oksid (PNSO) **1.25** (Shema 35). Promjena apsorbancije praćena je pri valnoj duljini od 310 nm u vremenu od 100 sekundi. Iz nagiba dobivene krivulje ($\Delta A/\Delta t$) izračunate su volumne (16) i specifične aktivnosti (17) pripremljenih enzima.



Shema 35. Konverzija PNSHH (**11**) u PNSO (**1.25**)

Formule za izračun volumne i specifične aktivnosti enzima:

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon d V_E} \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (16) \qquad S.A. = \frac{V.A.}{\gamma} \quad (17)$$

V.A. – volumna aktivnost (U/mL)

S.A. – specifična aktivnost (U/mg)

V_r – ukupni volumen (1 mL)

ε – ekstincijski koeficijent (ε (epoksid) = 4,289 mM⁻¹ cm⁻¹)

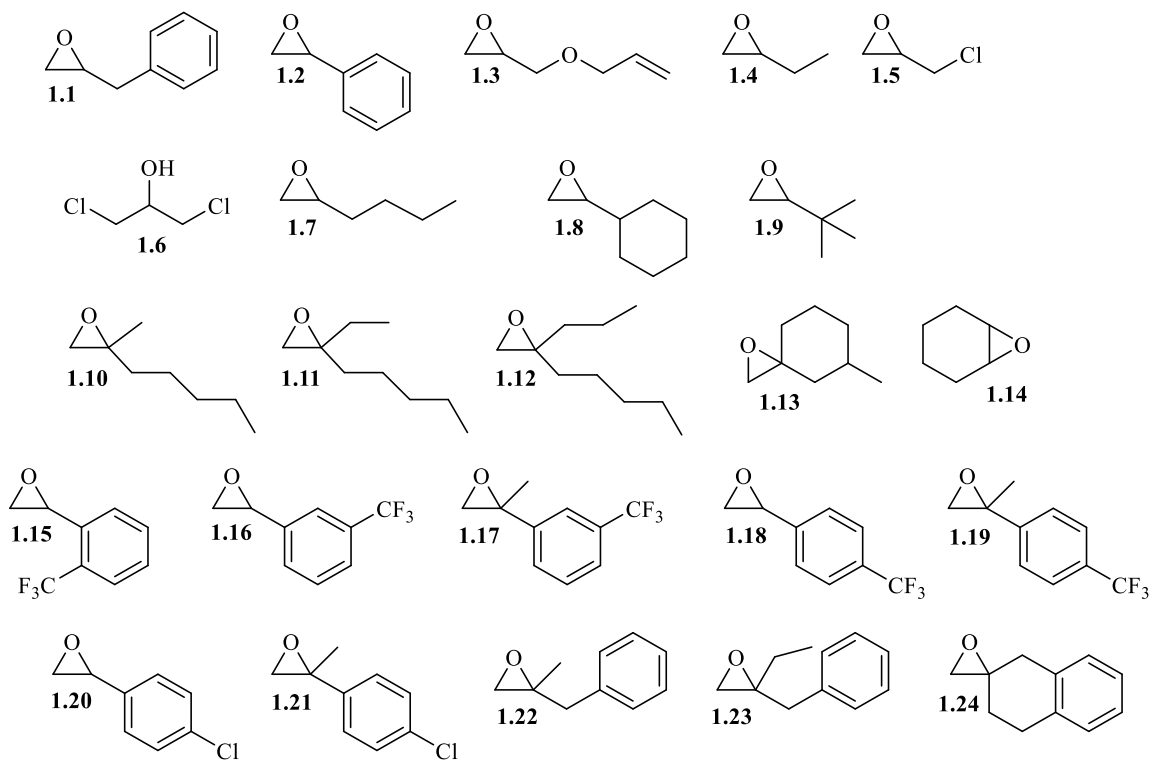
d – širina kivete ($d = 1$ cm)

V_E – volumen enzima (mL)

γ – ukupna koncentracija proteina dobivena metodom po Bradfordu (mg/mL)

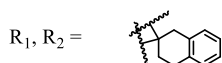
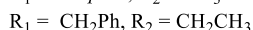
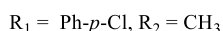
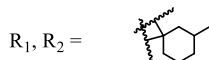
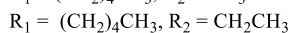
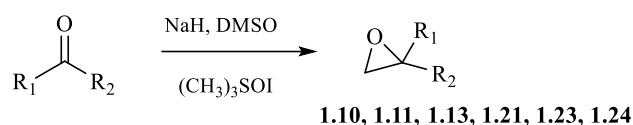
4.4. Priprava epoksida

Za ispitivanje biokatalitičkih svojstava enzima odabran je set od 24 supstrata (Shema 36). 10 od 24 epoksida je komercijalno dostupno, a ostale je bilo potrebno pripremiti **1.8**, **1.10** – **1.13**, **1.15** – **1.19** i **1.21** – **1.24**.



Shema 36. Prikaz strukture supstrata odabranih za biokatalitička ispitivanja

4.4.1. Opći postupak pripreve racemičnih epoksida **1.10**, **1.11**, **1.13**, **1.21**, **1.23**, **1.24**



Shema 37. Priprava epoksida **1.10**, **1.11**, **1.13**, **1.21**, **1.23**, **1.24**

Otopini trimetilsulfoksonij jodida u suhom DMSO-u dodan je natrijev hidrid (60 %-tni u mineralnom ulju) i otopina je miješana u inertnoj atmosferi dušika pri temperaturi 0 – 5 °C (Shema 37). Nakon 30 minuta dokapana je otopina ketona u DMSO-u i miješano je preko noći. Reakcija je prekinuta dodatkom vode (20 mL), te je provedena ekstrakcija s dietil-eterom (3 x 30 mL). Organski ekstrakt opran je vodom (2 x 30 mL), zasićenom otopinom NaCl (20 mL), sušen na bezvodnom Na₂SO₄ i uparen do suha. Čisti epoksidi dobiveni su destilacijom pri atmosferskom tlaku ili kolonskom kromatografijom na stupcu silikagela uz eluens *n*-heksan/EtOAc = 95/5.

Priprava 2-metil-2-pentiloksirana (**1.10**).

Prema općem postupku iz 2,45 mL (17,5 mmol) 2-heptanona, 5,00 g (22,8 mmol) (CH₃)₃SOI i 0,91 g (22,8 mmol) NaH u 30 mL DMSO-a, nakon destilacije (75 °C) dobiveno je 1,92 g (86 %) čistog produkta **1.10**. u obliku žućkastog ulja

NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2,61 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H), 2,57 (d, *J* = 4,9 Hz, 1H), 1,67-1,32 (m, 6H), 1,31 (s, 3H), 1,28-1,22 (m, 2H), 0,89 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 57,1, 54,0, 36,7, 31,9, 24,9, 22,6, 20,9, 14,0.

Priprava 2-etil-2-pentiloksirana (**1.11**).

Prema općem postupku iz 2,43 mL (15,6 mmol) 3-oktanona, 4,46 g (20,3 mmol) (CH₃)₃SOI i 0,82 g (20,3 mmol) NaH u 30 mL DMSO-a, nakon destilacije (80 °C) dobiveno je 2,10 g (95 %) čistog produkta **1.11**. u obliku žućkastog ulja.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 2,59$ (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), $2,57$ (d, $J = 4,9$ Hz, 1H), $1,66$ - $1,51$ (m, 2H), $1,41$ - $1,20$ (m, 8H), $0,95$ - $0,82$ (m, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 60,2$, $52,2$, $34,0$, $32,0$, $26,9$, $24,5$, $22,6$, $14,0$, $8,9$.

Priprava (3R,5R),(3S,5S)-5-metil-1-oksaspiro[2.5]oktana (1.13).

Prema općem postupku iz $2,00$ g ($17,8$ mmol) 3-metilcikloheksanona, $5,10$ g ($23,2$ mmol) $(\text{CH}_3)_3\text{SOI}$ i $0,93$ g ($23,2$ mmol) NaH u 30 mL DMSO-a, nakon destilacije pri atmosferskom tlaku (60 °C) dobiveno je $1,56$ g (69 %) čistog produkta **1.13** u obliku bezbojnog ulja.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 2,62$ (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), $2,60$ (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), $1,81$ - $1,70$ (m, 4H), $1,66$ - $1,60$ (m, 1H), $1,48$ (dd, $J = 13,5$; $11,6$ Hz, 1H), $1,29$ - $1,20$ (m, 2H), $1,03$ - $0,95$ (m, 1H), $0,91$ (d, $J = 6,6$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 58,4$, $53,9$, $41,5$, $33,7$, $32,6$, $30,4$, $23,4$, $22,2$.

Priprava 2-(4-klorfenil)-2-metiloksirana (1.21).

Prema općem postupku iz $2,00$ g ($12,9$ mmol) 1-(4-klorfenil)etan-1-ona, $3,70$ g ($16,8$ mmol) $(\text{CH}_3)_3\text{SOI}$ i $0,67$ g ($16,8$ mmol) NaH u 30 mL DMSO-a, nakon kolonske kromatografije na silikagelu dobiveno je $0,78$ g (36 %) čistog produkta **1.21** u obliku bezbojnog ulja.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,30$ (s, 4H), $2,97$ (d, $J = 5,4$ Hz, 1H), $2,76$ (d, $J = 5,5$ Hz, 1H), $1,70$ (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 139,8$, $133,3$, $128,5$, $126,8$, $57,0$, $56,3$, $21,7$.

Priprava 2-benzil-2-etiloksirana (1.23).

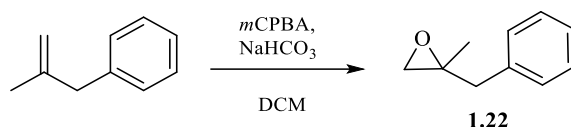
Prema općem postupku iz $1,27$ g ($8,5$ mmol) 1-fenilbutan-2-ona, $2,44$ g ($11,1$ mmol) $(\text{CH}_3)_3\text{SOI}$ i $0,44$ g ($11,1$ mmol) NaH u 20 mL DMSO-a, nakon kolonske kromatografije na silikagelu dobiveno je $0,87$ g (63 %) čistog produkta **1.23** u obliku bezbojnog ulja.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,31$ - $7,28$ (m, 2H), $7,25$ - $7,21$ (m, 3H), $2,94$ (d, $J = 14,3$ Hz, 1H), $2,86$ (d, $J = 14,3$ Hz, 1H), $2,63$ (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), $2,58$ (d, $J = 4,8$ Hz, 1H), $1,67$ - $1,48$ (m, 2H), $0,94$ (t, $J = 7,5$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 137,1$, $129,6$, $128,3$, $126,5$, $60,4$, $51,5$, $40,5$, $26,7$, $8,9$. HRMS (MALDI TOF/TOF): izračunato za $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{ONa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): $185,0942$, dobiveno: $185,0940$.

Priprava 3,4-dihidro-1H-spiro[naftalen-2,2'-oksirana] (1.24).

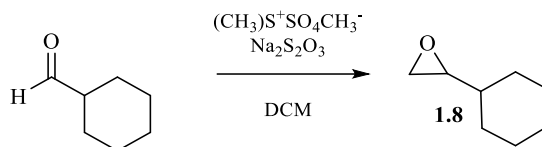
Prema općem postupku iz 2,00 g (13,7 mmol) 2-tetralona, 3,90 g (17,8 mmol) $(\text{CH}_3)_3\text{SOI}$ i 0,71 g (17,8 mmol) NaH u 30 mL DMSO-a, nakon kolonske kromatografije na silikagelu dobiveno je 1,06 g (48 %) čistog produkta **1.24** u obliku bezbojnog ulja.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,20-7,03$ (m, 4H), 3,13-2,98 (m, 2H), 2,98-2,84 (m, 2H), 2,83-2,76 (m, 2H), 1,98-1,80 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 136,1, 134,7, 129,0, 128,7, 126,0, 125,9, 57,5, 54,3, 36,3, 30,2, 28,3$. HRMS (MALDI TOF/TOF): izračunato za $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{ONa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 183,0786, dobiveno: 183,0780.

4.4.2. Priprava racemičnog 2-benzil-2-metiloksirana (1.22)**Shema 38. Priprava 2-benzil-metiloksirana (1.22)**

2,00 g (2-metilalil)benzena otopljeno je u 150 mL DCM-a te je dodano 1,27 g (15,1 mmol) NaHCO_3 i 5,22 g (30,2 mmol) *m*CPBA (Shema 38). Reakcijska smjesa miješana je preko noći pri sobnoj temperaturi. Dodana je voda (100 mL), te su slojevi odvojeni. Organski sloj ekstrahiran je s 10 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (1 x 40 mL), opran zasićenom NaHCO_3 (2 x 50 mL), sušen na bezvodnom Na_2SO_4 , te uparen do suha. Nakon kolonske kromatografije na silikagelu uz eluens *n*-heksan/EtOAc = 9/1 dobiveno je 1,67 g (75 %) čistog produkta **1.22** u obliku bezbojnog ulja. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,35-7,15$ (m, 5H), 2,90 (d, $J = 14,2$ Hz, 1H), 2,82 (d, $J = 14,1$ Hz, 1H), 2,66 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H), 2,61 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H), 1,28 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 137,2, 129,6, 128,3, 126,6, 57,3, 53,3, 43,1, 20,9$.

4.4.3. Priprava racemičnog 2-cikloheksiloksirana (1.8)

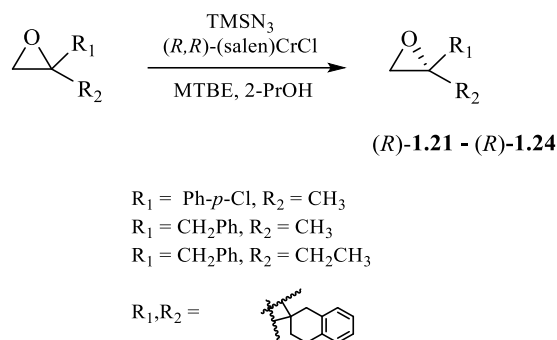


Shema 39. Priprava 2-cikloheksiloksirana (**1.8**)

2,24 g (20 mmol) cikloheksankarboksialdehida otopljeno je u DCM-u (20 mL) te je dodano 4,40 g (23 mmol) trimetilsulfonilmetilsulfata i 10 mL 50 % NaOH (Shema 39). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Dodana je voda (40 mL) te su slojevi odvojeni. Vodeni sloj ekstrahiran je s DCM-om (2 x 30 mL), a u spojeni organski ekstrakt dodana je zasićena otopina natrij metabisulfata (60 mL), i sve je miješano na sobnoj temperaturi 20 minuta. Organski sloj opran je s vodom (2 x 40 mL), sušen na bezvodnom Na_2SO_4 , i uparen do suha. Nakon kolonske kromatografije na silikagelu uz eluens *n*-heksan/EtOAc = 9/1 dobiveno je 0,42 g (17 %) čistog produkta **1.8** u obliku bezbojnog ulja.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) (δ /ppm): 2,72 (m, 2H), 2,55 – 2,49 (m, 1H), 1,92-1,84 (m, 1H), 1,80 – 1,62 (m, 4H), 1,28 – 1,11 (m, 6H).

4.4.4. Opći postupak pripreve enantiomerno obogaćenih epoksida (*R*)-**1.21** – (*R*)-**1.24**



Shema 40. Priprava enantiomerno obogaćenih epoksida (*R*)-**1.21** – (*R*)-**1.24**

Racemični epoksid (0,85 mmol) otopljen je u 300 μL MTBE te je dodan Jacobsenov katalizator (*R,R*)-*N,N*-bis(3,5-di-*tert*butilsaliciliden)-1,2-cikloheksandiaminokrom-(III) (0,016 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 5 min na sobnoj temperaturi nakon čega je ohlađena na 0 – 5 $^{\circ}\text{C}$. Dodano je 36 μL 2-PrOH i 65 μL TMSN₃, te je smjesa miješana preko noći pri sobnoj temperaturi (Shema 40). Potom je reakcijska smjesa uparena do suha i pročišćena kolonskom kromatografijom na silikagelu uz eluens MTBE/*n*-heksan = 5/95.

Priprava (*R*)-**2**-(4-klorfenil)-**2**-metiloksirana ((*R*)-**1.21**).

Iz 0,14 g (0,85 mmol) racemičnog epoksida **1.21** dobiveno je 0,05 g (*R*)-**1.21** u enantiomernom suvišku 37 %.

Priprava (*R*)-**2**-benzil-**2**-metiloksirana ((*R*)-**1.22**).

Iz 0,13 g (0,85 mmol) racemičnog epoksida **1.22** dobiveno je 0,04 g (*R*)-**1.22** u enantiomernom suvišku 95 %.

Priprava (*R*)-**2**-benzil-**2**-etiloksirana ((*R*)-**1.23**).

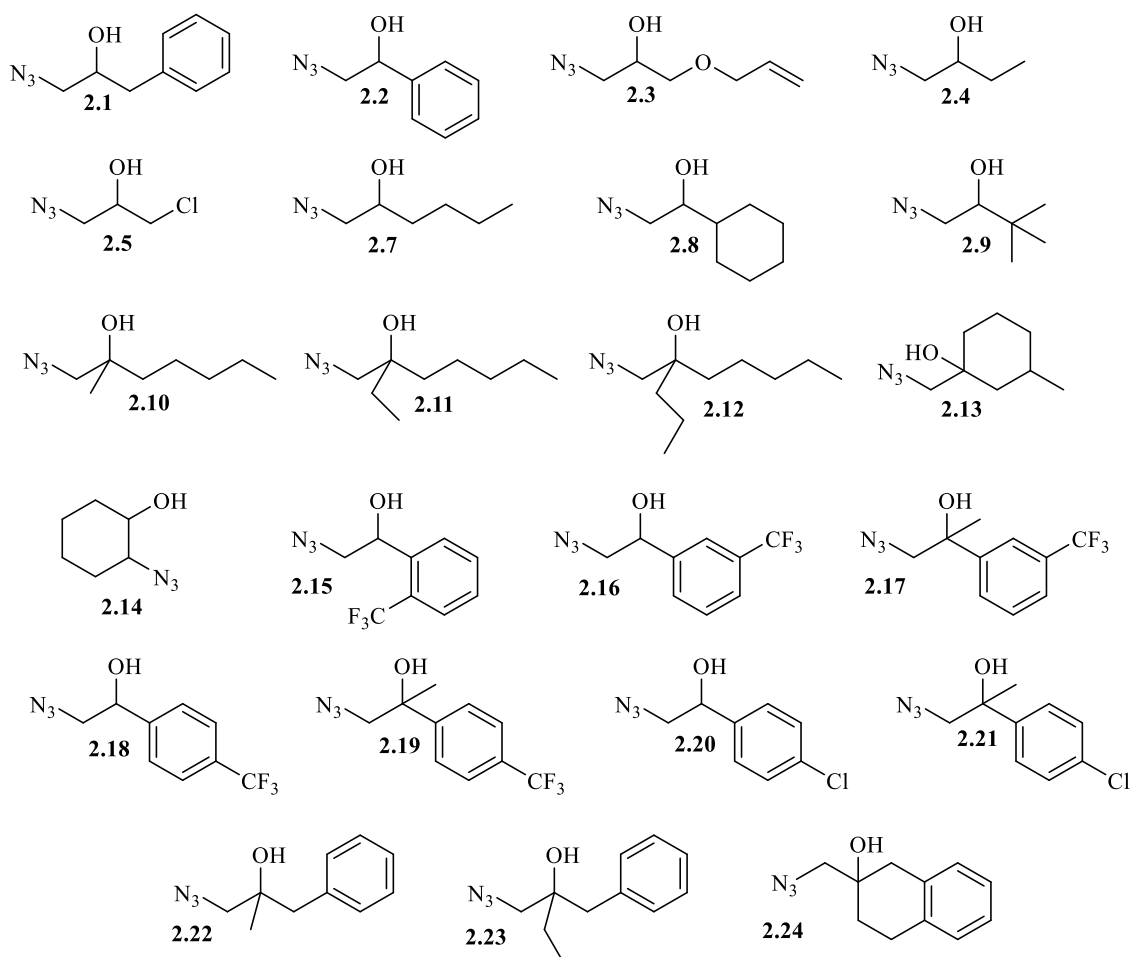
Iz 0,14 g (0,85 mmol) racemičnog epoksida **1.23** dobiveno je 0,05 g (*R*)-**1.23** u enantiomernom suvišku 9 %.

Priprava (*R*)-**3,4**-dihidro-*1H*-spiro[naftalen-2,2']-oksirana ((*R*)-**1.24**).

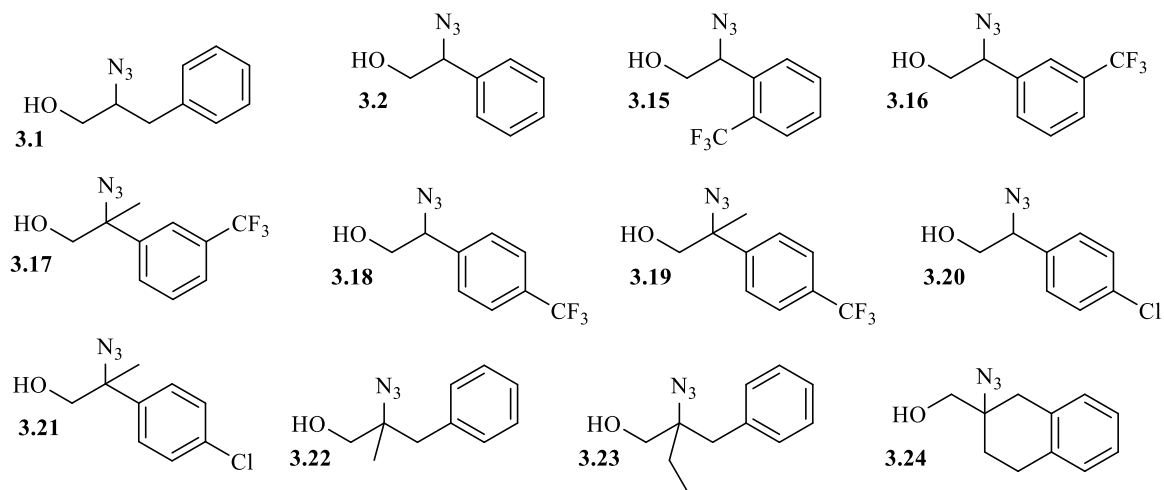
Iz 0,14 g (0,85 mmol) racemičnog epoksida **1.24** dobiveno je 0,05 g (*R*)-**1.24** u enantiomernom suvišku 28 %.

4.5. Priprava β -supstituiranih alkohola i oksazolidinona

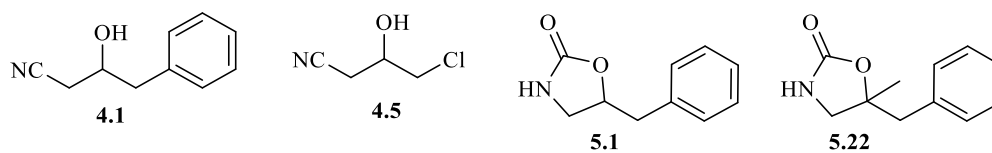
Kao standardi za razvoj analitičkih metoda u svrhu praćenja enzimskih reakcija i određivanja enantiomerne čistoće produkata, korišteni su racemični alkoholi i oksazolidinoni prikazani na Shemama 41 – 44. Neki od spojeva su bili prethodno pripremljeni u laboratoriju, dok je ostale trebalo sintetizirati.



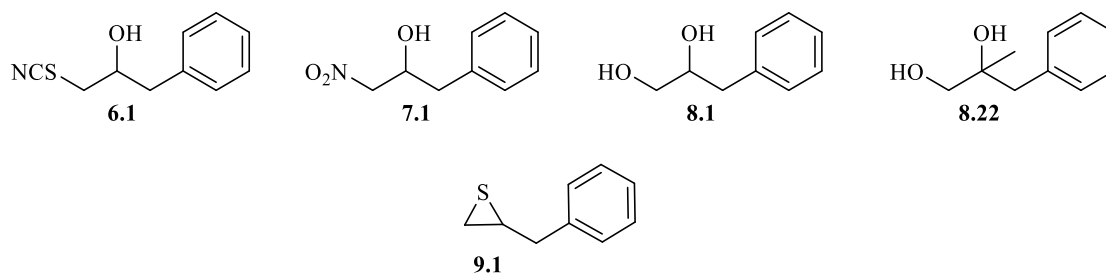
Shema 41. Prikaz strukture sekundarnih azido-alkohola



Shema 42. Prikaz strukture primarnih azido-alkohola

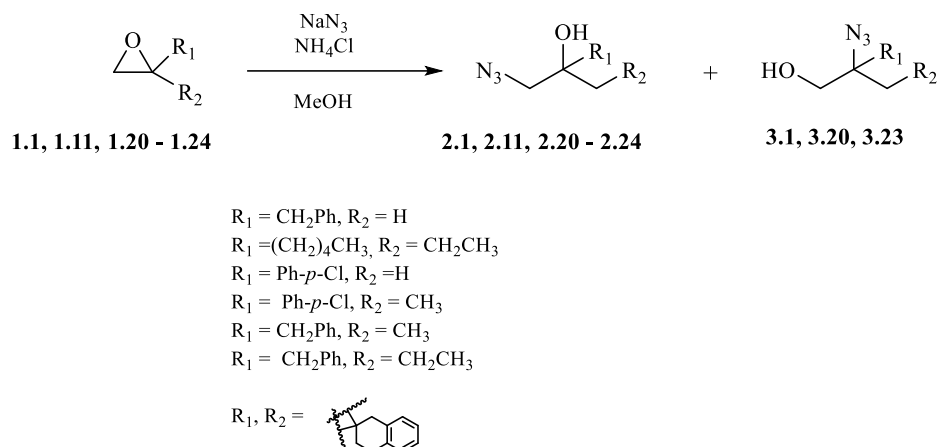


Shema 43. Prikaz strukture cijano-alkohola i oksazolidinona



Shema 44. Prikaz strukture ostalih racemičnih spojeva

4.5.1. Opći postupak pripreve azido-alkohola **2.1**, **2.11**, **2.20** – **2.24** i **3.1**, **3.20**, **3.23**



Shema 45. Priprava primarnih i sekundarnih azido-alkohola **2.11**, **2.11**, **2.20** – **2.24** i **3.1**, **3.20**, **3.23**

Otopini epoksida (1 mmol) u metanolu (15 mL), dodano je 0,19 g (3 mmol) NaN_3 i 0,16 g (3 mmol) NH_4Cl (Shema 45). Reakcijska smjesa miješana je preko noći uz refluks, nakon čega je uparena. U suhi ostatak dodana je voda (10 mL) i ekstrahirano je s EtOAc (3 x 10 mL). Spojeni organski slojevi sušeni su na bezvodnom Na_2SO_4 i upareni do suha. Čisti azido-alkoholi izolirani su nakon kolonske kromatografije na silikagelu uz eluens *n*-heksan/EtOAc = 98/2.

Priprava 1-azido-3-fenilpropan-2-ola (**2.1**) i 2-azido-3-fenilpropan-1-ola (**3.1**).

Prema općem postupku iz 0,33 g (2,5 mmol) 2-benziloksirana **1.1** dobiveno je 0,20 g (44 %) **2.1** i 5 mg (1 %) **3.1** u obliku bezbojnog ulja.

1-Azido-3-fenilpropan-2-ol (2.1): $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) (δ/ppm): 7,35 – 7,30 (m, 2H), 7,27 – 7,24 (m, 1H), 7,23 – 7,19 (m, 2H), 4,05 – 3,97 (m, 1H), 3,39 (dd, $J = 12,5; 3,6$ Hz, 1H), 3,30 (dd, $J = 12,5; 6,8$ Hz, 1H), 2,84 (dd, $J = 13,8; 6,0$ Hz), 2,80 (dd, $J = 13,8; 7,8$ Hz), 1,96 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) (δ/ppm): 137,1, 129,3, 128,8, 126,9, 71,7, 56,0, 40,9.

2-Azido-3-fenilpropan-1-ol (3.1): $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) (δ/ppm): 7,35 – 7,31 (m, 2H), 7,28 – 7,22 (m, 3H), 3,80 – 3,63 (m, 2H), 3,59 – 3,53 (m, 1H), 2,89 (dd, $J = 13,9; 6,4$ Hz, 1H), 2,84 (dd, $J = 13,9; 7,5$ Hz, 1H), 1,78 (t, $J = 11,8$ Hz, 1H). $^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) (δ/ppm): 137,0, 129,3, 128,7, 126,9, 65,3, 64,4, 37,0.

Priprava 3-(azidometil)oktan-3-ola (2.11).

Prema općem postupku iz 0,14 g (1 mmol) 2-(4-klorfenil)-2-metiloksirana (**1.11**) dobiveno je 0,70 g (38 %) čistog produkta **2.11** u obliku bezbojnog ulja.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 3,27 (s, 2H), 1,60 (s, 1H), 1,53 (q, J = 7,6 Hz, 2H), 1,49-1,44 (m, 2H), 1,36-1,25 (m, 6H), 0,90-0,87 (m, 6H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): δ = 74,8, 58,7, 36,4, 32,3, 29,5, 23,0, 22,6, 14,0, 7,7. HRMS (MALDI TOF/TOF): izračunato za $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{N}_3\text{ONa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 208,1426, dobiveno: 208,1419.

Priprava 1-azido-2-(4-klorfenil)etan-2-ola (2.20) i 2-azido-2-(4-klorfenil)etan-1-ola (3.20).

Prema općem postupku iz 0,46 g (3 mmol) 2-(4-klorfenil)oksirana (**1.20**) dobiveno je 0,10 g (15 %) **2.20** i 0,19 (33%) **3.20** u obliku bezbojnog ulja.

1-Azido-2-(4-klorfenil)etan-2-ol (2.20): ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 7.36-7.33 (m, 2H), 7.32-7.29 (m, 2H), 4.87-4.83 (m, 1H), 3.46-3.41 (m, 2H), 2.46 (d, J = 3.3 Hz, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): δ = 139.0, 134.1, 128.9, 127.3, 72.7, 58.0.

2-azido-2-(4-klorfenil)etan-1-ol (3.20): ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 7,39-7,36 (m, 2H), 7,30-7,27 (m, 2H), 4,66 (dd, J = 7,8; 4,8 Hz, 1H), 3,75-3,70 (m, 2H), 1,91 (s, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): δ = 134,8, 134,6, 129,2, 128,5, 67,1, 66,4.

Priprava 1-azido-2-(4-klorfenil)propan-2-ola (2.21).

Prema općem postupku iz 0,17 g (1 mmol) 2-(4-klorfenil)-2-metiloksirana (**1.21**) dobiveno je 0,10 g (46 %) čistog produkta **2.21** u obliku žutog ulja.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7,44-7,28 (m, 4H), 3,57 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 3,44 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 2,34 (s, 1H), 1,57 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 143,2, 133,4, 128,6, 126,4, 74,3, 62,0, 27,2.

Priprava 1-azido-2-metil-3-fenilpropan-2-ola (2.22).

Prema općem postupku iz 0,15 g (1 mmol) 2-benzil-2-metiloksirana (**1.22**) dobiveno je 0,10 g (51 %) čistog produkta **2.22** u obliku bezbojnog ulja.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,43\text{-}7,30$ (m, 2H), 7,28-7,24 (m, 1H), 7,22-7,20 (m, 2H), 3,26 (d, $J = 12,1$ Hz, 1H), 3,22 (d, $J = 12,1$ Hz, 1H), 2,84 (d, $J = 13,4$ Hz, 1H), 2,78 (d, $J = 13,4$ Hz, 1H), 1,78 (s, 1H), 1,20 (s, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 136,3, 130,4, 128,5, 126,9, 72,8, 60,0, 45,5, 24,8$.

Priprava 1-azido-2-etil-3-fenilpropan-2-ola (2.23) i 2-azido-2-benzilbutan-1-ola (3.23).

Prema općem postupku iz 0,41 g (2,5 mmol) 2-benzil-2-etiloksirana (**1.23**) dobiveno je 0,18 g (35 %) **2.23** i 30 mg (6 %) **3.23** u obliku bezbojnog ulja.

1-Azido-2-etil-3-fenilpropan-2-ol (2.23): ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,34\text{-}7,29$ (m, 2H), 7,28-7,25 (m, 1H), 7,23-7,20 (m, 2H), 3,23 (s, 2H), 2,82 (d, $J = 13,6$ Hz, 1H), 2,79 (d, $J = 13,6$ Hz, 1H), 1,64 (bs, 1H), 1,58-1,50 (m, 2H), 0,98 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 136,3, 130,4, 128,5, 126,8, 74,6, 57,4, 42,8, 29,7, 7,8$. HRMS (MALDI TOF/TOF): izračunato za $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{ONa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 228,1113, dobiveno: 228,1110.

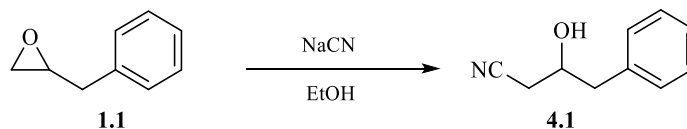
2-Azido-2-benzilbutan-1-ol (3.23): ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) (δ/ppm): 7,33 – 7,29 (m, 2H), 7,28 – 7,24 (m, 3H), 3,52 (dd, $J = 11,3; 5,1$ Hz, 1H), 3,46 (dd, $J = 11,4; 6,2$ Hz, 1H), 2,97 (d, $J = 13,6$ Hz, 1H), 2,84 (d, $J = 13,6$ Hz, 1H), 1,72 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H), 1,65 (dd, $J_1 = 14,3, J_2 = 7,5$ Hz, 1H), 1,59 (dd, $J_1 = 14,4, J_2 = 7,5$ Hz, 1H), 1,03 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) (δ/ppm): 135,9, 130,4, 128,4, 126,9, 67,9, 65,5, 39,3, 26,1, 8,0.

Priprava 2-(azidometil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ola (2.24).

Prema općem postupku iz 0,16 g (1 mmol) 3,4-dihidro-1H-spiro[naftalen-2,2'-oksirana] (**1.24**) dobiveno je 0,14 g (69 %) čistog produkta **2.24** u obliku žutog ulja.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,17\text{-}7,02$ (m, 4H), 3,39 (s, 2H), 3,09-2,93 (m, 1H), 2,90-2,71 (m, 3H), 1,98 (s, 1H), 1,96-1,74 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 135,1, 133,2, 129,6, 128,7, 126,3, 126,1, 71,3, 60,2, 39,6, 31,7, 25,8$. HRMS (MALDI TOF/TOF): izračunato za $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{ONa}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 226,0956, dobiveno: 226,0950.

4.5.2. Priprava 3-hidroksi-4-fenilbutanitrila (4.1)

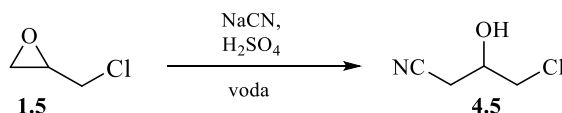


Shema 46. Priprava 3-hidroksi-4-fenilbutanitrila (4.1)

0,13 g (1 mmol) 2-benziloksirana **1.1** otopljeno je u vodi (4,5 mL), te je dodano 0,07 g NaCN (1,4 mmol) i etanol (1 mL) (Shema 46). Reakcijska smjesa miješana je 72 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega je dodana zasićena otopina NaCl, te je ekstrahirano s EtOAc (2 x 10 mL). Spojeni organski slojevi osušeni su na bezvodnom Na₂SO₄ i upareni do suha. Nakon kolonske kromatografije na silikagelu uz eluens *n*-heksan/EtOAc = 9/1 dobiveno je 0,08 g (50 %) čistog produkta **4.1** u obliku bezbojnog ulja.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7,37-7,32 (m, 2H), 7,29-7,26 (m, 1H), 7,23-7,21 (m, 2H), 4,18-4,12 (m, 1H), 2,93 (dd, *J* = 13,7; 5,6 Hz, 1H), 2,88 (dd, *J* = 13,7; 7,6 Hz, 1H), 2,57 (dd, *J* = 16,7; 5,1 Hz, 1H), 2,50 (dd, *J* = 16,7; 6,1 Hz, 1H), 2,16 (d, *J* = 4,4 Hz, 1H). ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 136,2, 129,3, 129,0, 127,3, 117,4, 68,6, 42,8, 25,1.

4.5.3 Priprava 4-klor-3-hidroksibutironitrila (4.5)



Shema 47. Priprava 4-klor-3-hidroksibutironitrila (4.5)

0,13 g (2,6 mmol) NaCN otopljeno je u vodi (0,8 mL). U reakcijsku smjesu pri 0 – 5 °C dodano je 0,07 mL (1,30 mmol) koncentrirane H₂SO₄ i 0,17 mL (2,16 mmol) epiklorhidrina **1.5** (Shema 47). Miješano je preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa ekstrahirana je s EtOAc (3 x 2 mL), spojeni organski slojevi osušeni su na bezvodnom Na₂SO₄, profiltrirani i ukoncentrirani. Nakon kolonske kromatografije na silikagelu uz eluens EtOAc/*n*-heksan = 3,5/6,5 dobiveno je 0,11 g (42 %) čistog produkta **4.5** u obliku žutog ulja.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 4,25-4,17 (m, 1H), 3,70 (dd, *J* = 11,5; 4,8 Hz, 1H), 3,67 (dd, *J* = 11,5; 5,6 Hz, 1H), 2,76-2,66 (m, 2H), 2,58 (d, *J* = 5,8 Hz, 1H). ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 116,3, 67,5, 47,6, 23,2.

$J = 14,0; 6,3$ Hz, 1H), 2,94 (dd, $J = 14,1; 6,8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 159,9, 135,4, 129,5, 128,9, 127,3, 77,3, 45,2, 40,7$.

Priprava 5-benzil-5-metiloksazolidin-2-ona (5.22).

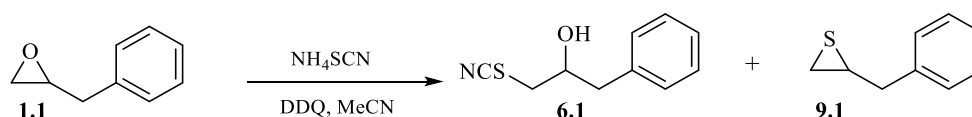
Iz 0,33 g (1,7 mmol) azido-alkohola **2.21**, 0,54 mL piridina (6,8 mmol) i 0,74 g (4,8 mmol) fenilkloroformata dobiveno je 0,33 g (63 %) čistog 1-azido-2-metil-3-fenilpropan-2-il fenil karbonata (**13.22**) u obliku bijelog praha.

Iz 0,33 g (1,1 mmol) **13.22** i 0,06 g (0,6 mmol) 10 % Pd/C dobiveno je 0,10 g (48 %) čistog produkta **5.22** u obliku bijelog praha.

Karbonatni prekursor 13.22: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,43 - 7,38$ (m, 2H), 7,35 - 7,30 (m, 2H), 7,30 - 7,21 (m, 4H), 7,20 - 7,15 (m, 2H), 3,66 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H), 3,56 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H), 3,24 (d, $J = 13,2$ Hz, 1H), 3,20 (d, $J = 13,8$ Hz, 1H), 1,54 (s, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 151,8, 150,9, 135,3, 130,6, 129,5, 128,5, 127,1, 126,1, 121,2, 85,6, 55,7, 41,9, 21,3$.

5-Benzil-5-metiloksazolidin-2-on (5.22): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,35 - 7,18$ (m, 5H), 6,21 (s, 1H), 3,48 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H), 3,23 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 2,97 (s, 2H), 1,43 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) (δ/ppm): 159,6, 135,2, 130,4, 128,4, 127,1, 82,8, 50,4, 45,8, 25,8.

4.5.5. Priprava 1-fenil-3-tiocijanatopropan-2-ola (6.1) i 2-benzil-tirana (9.1)



Shema 49. Priprava 1-fenil-3-tiocijanatopropan-2-ola (6.1) i 2-benzil-tirana (9.1)

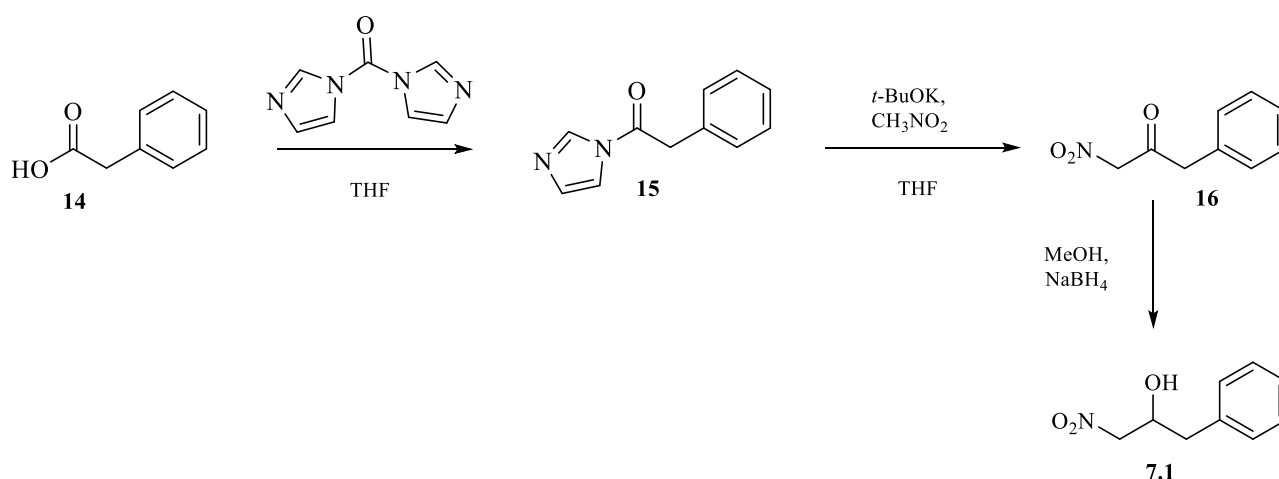
0,14 g (1 mmol) epoksida **1.1** otopljeno je u MeCN (4 mL), te je dodano 0,23 g (3 mmol) NH_4SCN i 0,02 g (0,1 mmol) DDQ-a (Shema 49). Reakcijska smjesa miješana je uz refluks 4h, nakon čega je profiltrirana, a filtrat je uparen do suha. Nakon kolonske kromatografije na silikagelu uz eluens n -heksan/EtOAc = 1/9 dobiveno je 2 mg (12 %) **6.1** u obliku žutog ulja i 15 mg (10 %) **9.1** u obliku bezbojnog ulja.

1-Fenil-3-tiocijanatopropan-2-ol (6.1): ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,37-7,32$ (m, 2H), 7,30-7,27 (m, 1H), 7,25 - 7,21 (m, 2H), 4,20-4,14 (m, 1H), 3,20 (dd, $J = 13,3; 3,7$ Hz, 1H), 2,99 (dd, $J = 13,3; 8,0$ Hz, 1H), 2,95 (dd, $J = 13,7; 4,9$ Hz, 1H), 2,86 (dd, $J = 13,7; 8,0$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 136,3, 129,4, 129,0, 127,2, 112,3, 71,1, 42,4, 40,1$. HRMS (MALDI TOF/TOF): izračunato za $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{NOS}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 194,0640, dobiveno: 194,0634.

2-Benzil tiiran (9.1): ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,34\text{--}7,30$ (m, 2H), 7,28–7,23 (m, 3H), 3,12–3,07 (m, 1H), 2,98 (dd, $J = 14,4; 6,3$ Hz, 1H), 2,93 (dd, $J = 14,4; 6,8$ Hz, 1H), 2,56 (dd, $J = 6,2; 1,2$ Hz, 1H), 2,29 (dd, $J = 5,6; 1,2$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 139,3, 128,6, 128,5, 126,7, 42,6, 35,7, 25,7$.

4.5.6. Priprava 1-nitro-3-fenil-propan-2-ol (7.1)



Shema 50. Priprava 1-nitro-3-fenil-propan-2-ola (7.1)

1 g (7,3 mmol) 2-feniloctene kiseline (**14**) otopljeno je u suhom THF-u (25 mL) i dodano je 1,4 g (8,8 mmol) CDI-a u porcijama (Shema 50). Reakcijska smjesa miješana je 1 sat uz refluks, nakon čega je reakcijska smjesa uparena do suha.

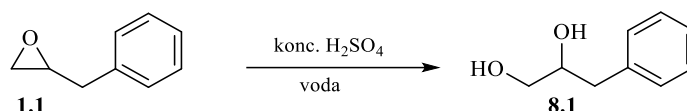
1,26 g (10,9 mmol) *t*-BuOK otopljeno je u suhom THF-u (40 mL) te je dokapano 2,36 mL (43,8 mmol) nitrometana pri temperaturi 0 – 5 °C. Nakon dva sata miješanja na sobnoj temperaturi dokapana je prethodno pripravljena otopina 1-(1H-imidazol-1-il)-2-feniletan-1-ona (**15**) u THF-u (20 mL) pri temperaturi 0 – 5 °C, te je reakcija nastavljena preko noći na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa je profiltrirana, a talog je opran s DCM-om (60 mL) i otopljen u vodi (100 mL). Zakiseljeno je s 6 M HCl na pH 4 – 5 i ekstrahirano s DCM-om (3 x 50 mL). Spojeni organski slojevi sušeni su na bezvodnom Na_2SO_4 , profiltrirani i upareni do suha. Nakon kolonske kromatografije na silikagelu uz eluens *n*-heksan/EtOAc = 1/9 dobiveno je 1,0 g (76 %) čistog 1-nitro-3-fenilpropan-2-ona (**16**).

1 g (5,6 mmol) ketona **16** otopljeno je u metanolu (10 mL) te je dodano 0,21 g (5,6 mmol) NaBH_4 u porcijama (Shema 50). Nakon četiri sata u reakcijsku smjesu dodano je nekoliko kapi 1 M HCl-a, miješano 15 minuta i upareno do suha. Dodana je voda (20 mL) i ekstrahirano je s

DCM-om (3 x 20 mL). Spojeni organski slojevi sušeni su na bezvodnom Na₂SO₄, profiltrirani i upareni do suha. Nakon kolonske kromatografije na silikagelu uz eluens *n*-heksan/EtOAc = 9/1 dobiveno je 0,2 g (20 %) čistog produkta **7.1**.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7,33-7,29 (m, 2H), 7,25-7,21 (m, 3H), 4,04-3,99 (m, 1H), 3,41 (dd, *J* = 9,5; 3,4 Hz, 1H), 3,30 (dd, *J* = 9,5; 7,1 Hz, 1H), 2,83-2,76 (m, 2H), 2,24 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H). ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 138,1, 129,5, 128,7, 126,6, 76,1, 71,4, 40,0.

4.5.7. Priprava 3-fenil-propan-1,2-diola (**8.1**)

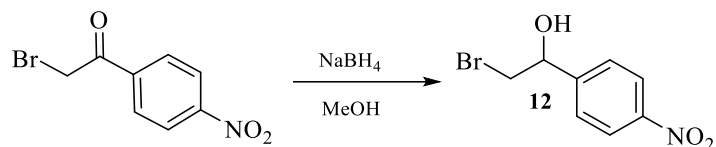


Shema 51. Priprava 3-fenil-propan-1,2-diola (**8.1**)

0,34 g (1 mmol) epoksida **1.1** suspendirano je u vodi (0,6 mL) i dodano 38 μL koncentrirane H₂SO₄ (Shema 51). Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi preko noći. Ekstrahirano je s EtOAc (3x2 mL), a spojeni organski slojevi sušeni su na bezvodnom Na₂SO₄, profiltrirani i upareni do suha. Nakon kolonske kromatografije na silikagelu uz eluens EtOAc/*n*-heksan = 3,5/6,5 dobiveno je 0,11 g (68 %) čistog produkta **8.1** u obliku bezbojnog ulja.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7,34-7,28 (m, 2H), 7,25-7,24 (m, 3H), 3,97-3,90 (m, 1H), 3,67 (dd, *J* = 11,2; 3,2 Hz, 1H), 3,50 (dd, *J* = 11,2; 7,0 Hz, 1H), 2,79 (dd, *J* = 13,7; 5,5 Hz, 1H), 2,74 (dd, *J* = 13,7; 7,9 Hz, 1H). ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 137,7, 129,3, 128,6, 126,6, 73,1, 66,0, 39,8.

4.5.8. Priprava 2-brom-1-(4-nitrofenil)etan-1-ola (**12**)



Shema 52. Priprava PNSHH **12**

3,8 g (16 mmol) 2-brom-1-(4-nitrofenil)etan-1-ona otopljeno je u MeOH (40 mL). 0,75 g (20 mmol) NaBH₄ dodano je u porcijama uz hlađenje (Shema 52). Reakcija je provedena na sobnoj temperaturi, a po završetku dodana je 10 %-tna otopina NH₃Cl (40 mL) i ekstrahirano s DCM-om (3x50 mL). Organski sloj sušen je na bezvodnom Na₂SO₄, profiltriran i uparen do suha. Nakon kolonske kromatografije na silikagelu uz eluens EtOAc/*n*-heksan = 7/3 dobiveno je 1,83 g (47 %) čistog produkta **12** u obliku bijelog praha.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) (δ/ppm): 8,25 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H), 7,59 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 5,06 (dd, *J* = 8,3; 3,3 Hz, 1H), 3,69 (dd, *J* = 10,6; 3,5 Hz, 1H), 3,53 (dd, *J* = 10,6; 8,4 Hz, 1H), 2,79 (s, 1H).

4.6. Razvoj analitičkih metoda

4.6.1. Kromatografske metode za praćenje reakcija

Za praćenje tijekom reakcije razvijene su metode plinske kromatografije (GC). U tu svrhu korištene su kolone HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, Agilent) ili HP-1 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, Agilent). U Tablici 19 prikazani su uvjeti i retencijska vremena spojeva.

Tablica 19. Analiza spojeva plinskom kromatografijom.

Spoj	Kolona	Uvjeti	Retencija / min
1.1 / 2.1	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	7,6 / 12,1
4.1 / 5.1	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	12,2 / 16,8
7.1 / 8.1	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	5,7 / 10,9
6.1 / 9.1	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	15,9 / 10,0
1.2 / 2.2	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	6,0 / 10,6
1.3 / 2.3	HP5	40 °C 2 min, 10 °C/min do 100 °C 5min	3,2 / 7,8
1.4 / 2.4	HP1	30 °C 8 min, 5 °C/min do 100 °C 5min	6,4 / 21,1
1.5 / 4.5	HP5	40 °C 2 min, 10 °C/min do 100 °C 5 min	1,2 / 6,1
1.6 / 4.5	HP5	40 °C 2 min, 10 °C/min do 100 °C 5 min	3,2 / 6,1
1.7 / 2.7	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5mn	1,9 / 7,1
1.8 / 2.8	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5mn	5,7 / 10,9
1.9 / 2.9	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	1,1 / 5,6
1.10 / 2.10	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	4,2 / 9,1
1.11 / 2.11	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	5,7 / 13,3
1.12 / 2.12	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	7,3 / 11,4
1.13 / 2.13	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	4,3 / 9,2
1.14	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	2,6
1.15 / 2.15	HP5	50 °C 2 min, 15 °C/min do 180 °C 2min	4,3 / 8,0
1.16 / 2.16	HP5	50 °C 2 min, 15 °C/min do 180 °C 2min	4,9 / 8,4
1.17 / 2.17	HP5	50 °C 2 min, 15 °C/min do 180 °C 2min	5,1 / 8,1
1.18 / 2.18	HP5	50 °C 2 min, 15 °C/min do 180 °C 2min	4,9 / 8,5
1.19 / 2.19	HP5	50 °C 2 min, 15 °C/min do 180 °C 2min	5,2 / 8,3
1.20 / 2.20	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	9,1 / 13,7
1.21 / 2.21	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	9,3 / 13,5
1.22 / 2.22	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	7,9 / 12,1
8.22 / 5.22	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	11,0 / 16,6
1.23 / 2.23	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	9,5 / 13,4
1.24 / 2.24	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	11,4 / 15,0
10.5	HP5	40 °C 2min, 10 °C/min do 200 °C 5min	9,3
1.25 / 11	HP5	100 °C 2 min, 10 °C/min do 200 °C 2 min	6,6 / 10,6

4.6.2. Kromatografske metode za određivanje enantiomerne čistoće

Za određivanje enantiomernog suviška (*e.v.*) produkta i reaktanta razvijene su metode plinske kromatografije (GC) i tekućinske kromatografije visokog učinka (HPLC) koristeći kiralne kolone:

- GC kolone:

Hydrodex g-DiMOM (25 m × 0,25 mm, Macherey-Nagel)

Lipodex E (25 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Macherey-Nagel)

Lipodex D (25 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Macherey-Nagel)

CP-Chirasil-Dex CB (25 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Varian)

Beta-DEX 225 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Supelco)

Alpha-DEX (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Supelco)

Chiraldex G-TA (30 m × 0,25 mm × 0,12 μm, Supelco)

Permabond L-Chirasil-Val (25 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Macherey-Nagel)

- HPLC kolone:

Chiralpak IC-3 (250 mm × 4,6 mm, 3 μm, Daicel)

Chiralpak AD-3 (250 mm × 4,6 mm, 3 μm, Daicel)

Chiralpak AS-3 (250 mm × 4,6 mm, 3 μm, Daicel)

Chiracel OJ-3 (250 mm × 4,6 mm, 3 μm, Daicel)

U Tablicama 20 – 21 prikazani su uvjeti i retencijska vremena spojeva.

Tablica 20. Uvjeti za određivanje enantiomernog viška supstrata

Epoksid	Metoda	Kolona	Uvjeti	Retencija / min
1.1	GC	Hydrodex g- DiMOM	90 °C, 3 °C/min do 170 °C, 170 kPa	7,4 (R) / 7,6 (S)
1.2	GC	Beta-DEX 225	80 °C 2 min, 2 °C/min do 200 °C, 170 kPa	14,1 (S) / 14,4 (R)
1.3	GC	Lipodex E	75 °C izotermno, 100 kPa	7,4 (R) / 7,9 (S)
1.4	GC	Hydrodex g- DiMOM	25 °C izotermno, 100 kPa	3,6 (R) / 4,6 (S)
1.5	GC	Lipodex E	70 °C 2min, 5 °C/min do 200 °C, 170 kPa	3,3 (S) / 3,6 (R)
1.7	GC	Hydrodex g- DiMOM	40 °C 17 min, 10 °C/min do 200 °C, 100 kPa	11,7 (S) / 13,1 (R)
1.8	GC	Lipodex E	80 °C izotermno, 100 kPa	10,4 (R) / 10,7 (S)
1.9	GC	Lipodex E	50 °C izotermno, 100 kPa	4,1 (R) / 4,3 (S)
1.10	GC	Beta-DEX 225	85 °C izotermno, 100 kPa	7,6 (R) / 7,8 (S)
1.11	GC	Hydrodex g- DiMOM	50 °C 2min, 1°C/min do 80 °C, 170 kPa	16,5 (R) / 19,4 (S)
1.12	GC	Hydrodex g- DiMOM	100 °C izotermno, 100 kPa	6,7 (S) / 6,9 (R)
1.13	GC	Chirasil-DEX	80 °C, 3 °C/min do 160 °C, 170 kPa	6,1 (3R, 5R) / 6,7 (3S, 5S)
1.16	GC	Chirasil-DEX	100 °C, 1 °C/min do 110 °C, 170 kPa	8,3 (R) / 8,5 (S)
1.17	GC	Chirasil-DEX	100 °C, 1 °C/min do 120 °C, 100 kPa	8,1 (R) / 8,5 (S)
1.18	GC	Chirasil-DEX	120 °C izotermno, 170 kPa	3,9 (R) / 4,1 (S)
1.19	GC	Chirasil-DEX	130 °C izotermno, 170 kPa	3,3 (R) / 3,5 (S)
1.20	GC	Beta-DEX 225	100 °C 2 min, 2 °C/min do 140 °C, 100 kPa	18,3 (S) / 18,5 (R)
1.21	GC	Beta-DEX 225	100 °C, 2 °C/min do 150 °C, 170 kPa	12,9 (S) / 13,2 (R)
1.22	GC	Hydrodex g- DiMOM	100 °C, 2 °C/min do 130 °C, 170 kPa	5,8 (R) / 6,0 (S)
1.23	GC	Hydrodex g- DiMOM	100 °C 2min, 2 °C/min do 130 °C, 170 kPa	9,5 (R) / 9,8 (S)
1.24	HPLC	Chiralpak IC-3	5 % 2-PrOH/heksan, 1 mL/min, 220 nm, 25 °C	10,1 (S) / 10,6 (R)

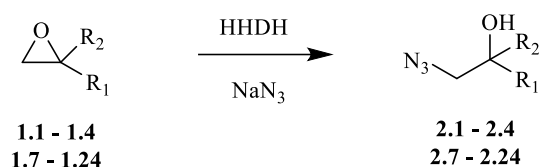
Tablica 21. Uvjeti za određivanje enantiomernog viška produkata

Alkohol	Metoda	Kolona	Uvjeti	Retencija / min
2.1	GC	Hydrodex g-DiMOM	90 °C, 3 °C/min do 170 °C, 170 kPa	23,3 (R) / 23,5 (S)
4.1	GC	Hydrodex g-DiMOM	90 °C, 3 °C/min do 180 °C, 170 kPa	28,2 (R) / 28,5 (S)
5.1	GC	Chirasil-DEX	150 °C, 3 °C/min do 200 °C 10 min, 170 kPa	21,5 (R) / 22,0 (S)
6.1	HPLC	Chiralpak AD-3	2 % 2-PrOH/heksan, 1 mL/min, 210 nm, 25 °C	31,2 (R) / 33,4 (S)
7.1	HPLC	Chiralpak AD-3	5 % 2-PrOH/heksan, 1 mL/min, 220 nm, 25 °C	18,4 (R) / 20,9 (S)
2.2	GC	Beta-DEX 225	80 °C 2 min, 2 °C/min do 200 °C, 170 kPa	44,9 (R) / 45,3 (S)
2.3	GC	Beta-DEX 225	120 °C, 1 °C/min do 140 °C	13,9 (R) / 14,4 (S)
2.4	GC	Lipodex D	70 °C, 1 °C/min do 100 °C, 100 kPa	21,9 (S) / 22,4 (R)
4.5	GC	Lipodex E	70 °C 2 min, 5 °C/min do 200 °C, 100 kPa	21,6 (S) / 21,7 (R)
2.7	GC	Lipodex D	100 °C, 1 °C/min to 200 °C, 100 kPa	15,3 (S) / 16,7 (R)
2.8	GC	Alpha-DEX	70 °C 2 min, 5 °C/min do 150 °C 15 min, 100 kPa	26,8 (S) / 27,2 (R)
2.9	GC	PermaBond L-Chirasil-Val	50 °C, 2 °C/min do 100 °C, 100 kPa	18,6 (S) / 18,9 (R)
2.10	GC	Lipodex D	100 °C 2 min, 2 °C/min do 150 °C 2 min, 100 kPa	11,8 (R) / 12,0 (S)
2.11	GC	Chiraldex G-TA	110 °C, 2 °C/min do 150 °C, 170 kPa	12,1 (R) / 1,3 (S)
2.12	GC	Chirasil-DEX	100 °C, 2 °C/min do 150 °C, 100 kPa	22,7 (S) / 22,9 (R)
2.13	GC	Chirasil-DEX	80 °C, 3 °C/min do 160 °C, 170 kPa	20,3 (3S,5S) / 20,6 (3R,5R)
2.16	HPLC	Chiralpak IC-3	0,75 % 2-PrOH/heksan, 1 mL/min, 220 nm, 25 °C	18,3 (R) / 20,4 (S)
2.17	HPLC	Chiracel OJ-3	0,75 % 2-PrOH/heksan, 1 mL/min, 220 nm, 30 °C	27,8 (R) / 29,8 (S)
2.18	HPLC	Chiracel OJ-3	2,5 % 2-PrOH/heksan, 1 mL/min, 220 nm, 25 °C	29,9 (R) / 33,1 (S)
2.19	HPLC	Chiracel OJ-3	2 % 2-PrOH/heksan, 1 mL/min, 220 nm, 30 °C	19,9 (S) / 26,3 (R)
2.20	HPLC	Chiralpak AS-3	4 % 2-PrOH/heksan, 1 mL/min, 220 nm, 25 °C	12,8 (S) / 14,7 (R)
2.21	HPLC	Chiralpak AD-3	2,5 % 2-PrOH/heksan, 1 mL/min, 200 nm, 25 °C	15,2 (R) / 15,8 (S)
2.22	GC	Beta-DEX 225	100 °C, 2 °C/min do 170 °C, 170 kPa	26,6 (R) / 27,1 (S)
5.22	CG	Chirasil-DEX	150 °C, 3 °C/min do 200 °C 10 min, 170 kPa	19,1 (R) / 19,9 (S)
2.23	HPLC	Chiralpak AD-3	10 % 2-PrOH/heksan, 1 mL/min, 220 nm, 25 °C	5,4 (R) / 6,1 (S)
2.24	HPLC	Chiralpak AD-3	10 % 2-PrOH/heksan, 1 mL/min, 220 nm, 25 °C	8,0 (S) / 8,7 (R)

4.7. Biokatalitičke transformacije

4.7.1. Ispitivanje supstrata

Šest prethodno pripremljenih enzima (HheB, HheB2, HheB-F36I, HheB-T120A, HheB-C124Y, HheB-H125Q) ispitano je u reakcijama otvaranja epoksida **1.1 – 1.4**, **1.7 – 1.24** uz NaN_3 kao nukleofil (Shema 53) ili NaCN u slučaju supstrata **1.5** i **1.6** (Shema 31). Biokatalitičke reakcije provedene se u Tris- SO_4 puferu (50 mM, pH 7,5) pri sobnoj temperaturi. Epoksid je u reakcijsku smjesu dodan kao temeljna otopina u DMSO-u, dok su NaN_3 i NaCN dodani kao temeljna otopina u vodi. Uzorci su uzimani u određenim vremenskim intervalima, ekstrahirani MTBE-om uz mesitilen kao unutarnji standard ili dietil-eterom uz klorobenzen kao unutarnji standard. Uzorci su sušeni na kratkom stupcu bezvodnog Na_2SO_4 i analizirani GC ili HPLC metodama.



Shema 53. Ispitivanje enzima u reakciji azidolize epoksida

4.7.1.1. Reakcije s alifatskim epoksidima 1.3, 1.4, 1.7 – 1.14

U 20 mL Tris- SO_4 pufera koji sadrži 5 mM epoksida i 5 mM NaN_3 dodano je 200 μL sirovog enzimskog ekstrakta. Konačna koncentracija DMSO-a u reakcijskoj smjesi iznosila je 0,5 %. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 21,3 mL. Za biokatalitičku transformaciju epoksida **1.9** s enzimom HheB2 korišteno je 400 μL sirovog enzimskog ekstrakta. Za biokatalitičku transformaciju epoksida **1.13** s enzimima HheB i HheB2-T120A korišteno je 10 μL sirovog enzimskog ekstrakta.

4.7.1.2. Reakcije s aromatskim epoksidima 1.15 – 1.21

U 2 mL Tris- SO_4 pufera koji sadrži 2 mM epoksida i 3 mM NaN_3 dodano je 250 μL sirovog enzimskog ekstrakta. Konačna koncentracija DMSO-a u reakcijskoj smjesi iznosila je 5 %. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 2,5 mL.

4.7.1.3. Reakcije s benzil supstituiranim epoksidima 1.1, 1.22 – 1.24

U 2,24 mL Tris-SO₄ pufera koji sadrži 2 mM epoksida i 3 mM NaN₃, dodano je 10 µL sirovog enzimskog ekstrakta. Konačna koncentracija DMSO-a u reakcijskoj smjesi iznosila je 5 %. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 2,5 mL. Za biokatalitičku transformaciju epoksida **1.23** s enzimima HheB2, HheB2-F36I, HheB2-T120A, HheB2-C124Y i HheB2-H125Q korišteno je 250 µL sirovog enzimskog ekstrakta.

4.7.1.4. Konverzija epiklorhidrina (1.5) i 1,3-dikloro-2-propanola (1.6) uz natrij cijanid

U 20 mL Tris-SO₄ pufera koji sadrži 5 mM **1.5** i 5 mM NaCN dodano je 100 µL sirovog enzimskog ekstrakta. Konačna koncentracija DMSO-a u reakcijskoj smjesi iznosila je 0,5 %. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 21,2 mL.

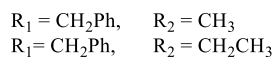
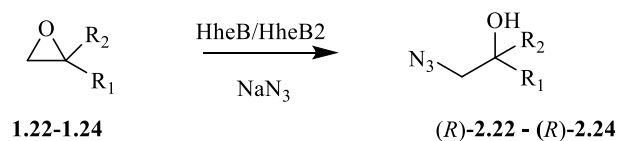
U 20 mL Tris-SO₄ pufera koji sadrži 5 mM **1.6** i 15 mM NaCN dodano je 100 µL sirovog enzimskog ekstrakta. Konačna koncentracija DMSO-a u reakcijskoj smjesi iznosila je 0,4 %. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 23,4 mL.

4.7.2. Ispitivanje nukleofila

Ispitivanje nukleofila provedeno je u 4,1 mL Tris-SO₄ pufera (50 mM, pH 7,5) uz 2 mM epoksida **1.1**, 3 mM nukleofila (NaCN, NaOCN, NaSCN, NaNO₂, NaNO₃ i NaCOOH) i 400 µL HheB2 za sve nukleofile osim za reakciju s azidnim nukleofilom gdje je korišteno 200 µL HheB2 (Shema 33). Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 5 mL.

4.8. Biokatalitičke transformacije na preparativnoj skali

4.8.1. Opća procedura pripreve azido-alkohola (*R*)-2.22 – (*R*)-2.24



Shema 54. Biokatalitička priprava azido-alkohola

1 mmol epoksida otopljeno je u 19 mL Tris-SO₄ pufera te su dodani nukleofil i sirovi enzimski ekstrakt ukupne koncentracije proteina 0,15 mg/mL (Shema 54). Po završetku produkt reakcije ekstrahiran je s 2 x 30 mL EtOAc. Organski sloj uparen je do suha i osušen na Na₂SO₄. Azido-alkoholi dobiveni su nakon čišćenja kolonskom kromatografijom na silikagelu uz eluens *n*-heksan/EtOAc = 98:2.

4.8.1.1. Priprava (*R*)-1-azido-2-metil-3-fenilpropan-2-ola ((*R*)-2.22)

Iz 148 mg (1 mmol) epoksida **1.22**, 36 mg (0,55 mmol) NaN₃ i 1 mL HheB2, nakon tri sata dobiveno je 51 mg (34 %, *e.v.* = 89,5 %) čistog (*S*)-**1.22** i 75 mg (39 %, *e.v.* = 99 %) čistog (*R*)-**2.22**, $[\alpha]_D^{25} = -1,92$.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,34 - 7,30$ (m, 2H), 7,28 – 7,25 (m, 1H), 7,23 – 7,20 (m, 2H), 3,26 (d, *J* = 12,1 Hz, 1H), 3,22 (d, *J* = 12,1 Hz, 1H), 2,84 (d, *J* = 13,4 Hz, 1H), 2,78 (d, *J* = 13,4 Hz, 1H), 1,78 (s, 1H), 1,20 (s, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): $\delta = 136,4, 130,4, 128,5, 126,9, 72,9, 60,0, 45,5, 24,8$.

4.8.1.2. Priprava (*R*)-1-azido-2-benzilbutan-2-ola ((*R*)-2.23)

Iz 162 mg (1 mmol) epoksida **1.23**, 36 mg (0,55 mmol) NaN₃ i 1 mL HheB nakon dva sata dobiveno je 52 mg (32 %, *e.v.* = 90 %) čistog (*S*)-**1.23** i 75 mg (36,5 %, *e.v.* = 99,5 %) čistog (*R*)-**2.23**, $[\alpha]_D^{25} = -14,93$.

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 7,33 - 7,30$ (m, 2H), 7,28 – 7,24 (m, 1H), 7,23 – 7,20 (m, 2H), 3,23 (s, 2H), 2,82 (d, *J* = 13,6 Hz, 1H), 2,79 (d, *J* = 13,6 Hz, 1H), 1,64 (s, 1H), 1,55 – 1,55

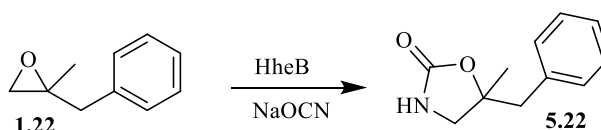
(m, 2H), 0,98 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 136,3, 130,4, 128,5, 126,8, 74,6, 57,4, 42,8, 29,7, 7,8$.

4.8.1.3. Priprava (*R*)-2-(Azidometil)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ola ((*R*)-2.24)

Iz 162 mg (1 mmol) epoksida **1.24**, 32,5 mg (0,5 mmol) NaN_3 i 1 mL HheB2 dva sata dobiveno je 65 mg (41 %, *e.v.* = 82 %) čistog (*S*)-**1.24** i 90 mg (44 %, *e.v.* = 94 %) čistog (*R*)-**2.24**, $[\alpha]_D^{25} = -39,43$.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,17 - 7,10$ (m, 3H), 7,09 – 7,04 (m, 1H), 3,38 (dd, $J = 12,6, 0,6$ Hz, 2H), 3,06 – 2,97 (m, 1H), 2,86 (dd, $J = 16,5, 4,1$ Hz, 2H), 2,79 (d, $J = 137,6$ Hz, 1H), 2,01 (s, 1H), 1,96 – 1,89 (m, 1H), 1,85 – 1,81 (m, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 135,1, 133,2, 129,6, 128,7, 126,3, 126,1, 71,3, 60,2, 39,6, 31,7, 25,8$.

4.8.2. Priprava (*R*)-5-benzil-5-metiloksazolidin-2-ona ((*R*)-5.22)

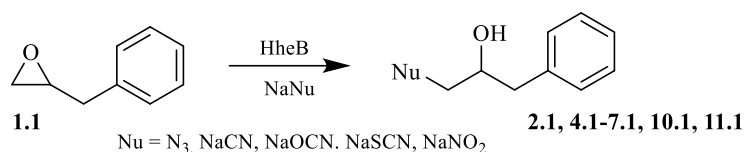


Shema 55. Biokatalitička priprava oksazolidinona

148 mg (1 mmol) epoksida **1.22** otopljeno je u 19 mL Tris- SO_4 pufera, te je dodano 65 mg (1 mmol) NaOCN i 1 mL HheB (Shema 55). Reakcijska smijesa miješana je pri sobnoj temperaturi 90 minuta. Smjesa je ekstrahirana 2 x 30 mL EtOAc. Organski sloj uparen je do suha i osušen na bezvodnom Na_2SO_4 . Kolonskom kromatografijom na silikagelu uz eluens *n*-heksan/EtOAc = 9:1 prvo je izolirano 67 mg (45%, *e.v.* = 77 %) čistog (*S*)-**1.22**, nakon čega je uz eluens DMC/EtOAc = 1/1 izolirano 78 mg (41 %, *e.v.* = 94 %) čistog (*R*)-**5.22**, $[\alpha]_D^{25} = -19,90$.

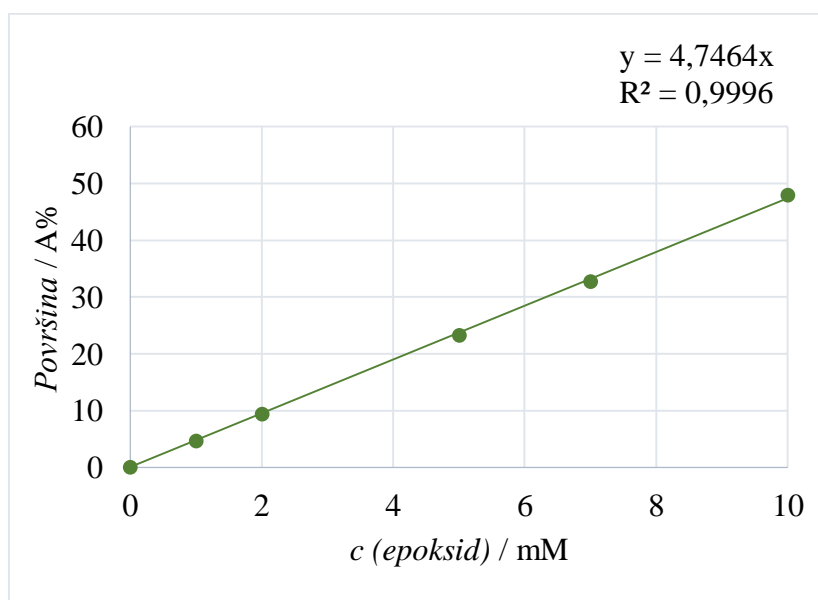
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,33 - 7,30$ (m, 2H), 7,29 – 7,22 (m, 3H), 5,72 (s, 1H), 3,49 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 3,24 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 3,00 (d, $J = 14,0$ Hz, 1H), 2,96 (d, $J = 14,0$ Hz, 1H), 1,45 (s, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 159,2, 135,2, 130,4, 128,4, 127,1, 82,8, 50,3, 45,8, 25,8$.

4.9. Kinetička mjerenja



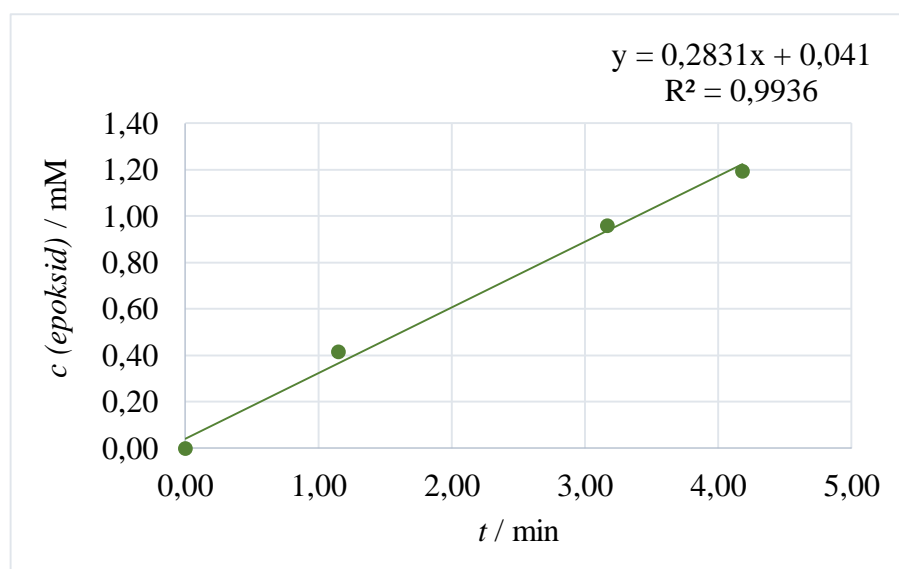
Shema 56. Modelna reakcija za kinetička mjerenja

Za procjenjivanje parametara MM kinetike i određivanje inhibicije nukleofilima koji su prihvaćeni u aktivnom mjestu HheB2 korištena je metoda početnih reakcijskih brzina. Kinetički eksperimenti provedeni su u eppicama od 1,5 mL, na termo shakeru (TS-100C, BioSan) pri temperaturi 25 °C i 1000 okr/min. Reakcije su provedene u Tris-SO₄ puferu, uz konstantnu koncentraciju epoksida (10 mM) i enzima (HheB2, w/w 1 – 2 %) (Shema 56). Koncentracija nukleofila mijenjana je u rasponu od 2 do 100 mM. Nukleofil je dodavan kao temeljna otopina u vodi, a epoksid kao temeljna otopina u DMSO-u. Konačna koncentracija DMSO-a u reakcijskoj smjesi iznosila je 2 %. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 0,50 mL. Točna koncentracija epoksida u uzorku izračunata je pomoću jednadžbe pravca ($y = 4,7464x$) koja je dobivena iz baždarnog dijagrama ovisnosti koncentracije epoksida o površini pika određenog plinskom kromatografijom (Slika 21).



Slika 21. Baždarna krivulja ovisnosti koncentracije epoksida o površini pika

Uzorci su uzimani unutar 10 % konverzije supstrata. Crtanjem krivulje ovisnosti koncentracije epoksida o vremenu (Slika 22) dobivena je jednadžba pravca ($y = 0,2831x + 0,041$) iz koje je nagib pravca ($\Delta c/\Delta t$) korišten za računanje volumne aktivnosti enzima, izraz (17). Specifična aktivnost enzima izračunata je iz prethodno dobivene volumne aktivnosti enzima, izraz (16). Dobivena ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentraciji nukleofila korištena je za procjenu kinetičkih parametara modela (Slika 19 i Tablica 17). Kinetički parametri procijenjeni su pomoću programskog paketa Scientist nelinearnom regresijom uz pomoć metode najmanjih kvadrata. Kinetički model za procjenjivanje parametara MM kinetike bez inhibicije (Slika 19 (A)) prikazan je izrazom (18), a reaktorski model za procjenjivanje parametara s inhibicijom izrazom (19) (Slika 19 (B – E)).



Slika 22. Grafički prikaz ovisnosti koncentracije epoksida o vremenu za enzimski kataliziranu reakciju (koncentracija NaN_3 iznosi 2 mM)

$$r = \frac{(V_m * c)}{(K_m + c)} \quad (18)$$

$$r = \frac{(V_m * c)}{\left(K_m + c + \left(c * \frac{c}{K_i}\right)\right)} \quad (19)$$

5. ZAKLJUČAK

Biokataliza je nezaobilazan alat organske sinteze koji sve češće nalazi primjenu i u industriji. Pronalazak novih enzima, ispitivanje njihove aktivnosti te modifikacija u aktivnije, otpornije i robusnije katalizatore glavni je cilj brojnih istraživanja. U ovom radu prikazani su rezultati ispitivanja HHDH skupine B na velikom broju supstrata i nukleofila.

Ispitivanjem niza strukturno različitih epoksida potvrđena je niska enantioselektivnost B grupe HHDH prema većini supstrata, osim prema supstratima s dva supstituenta na kiralnom centru **1.11**, **1.22** – **1.24**. Iako je HheB2 prethodno okarakteriziran kao neselektivan enzim, ovime je pokazana njegova biokatalitička vrijednost. Sinteza optički čistih tercijarnih alkohola predstavlja veliki izazov u organskoj kemiji, zbog čega je pronalazak novih katalizatora koji omogućuju njihovu pripremu na ekološki prihvatljiv način od velikog značaja. Kinetičkom rezolucijom racemičnih **1.22** – **1.24** na preparativnoj skali demonstrirana je mogućnost korištenja B grupe HHDH kao katalizatora za pripremu optički čistih spojeva s kvaternim stereocentrom. Ispitivanjem sedam nukleofila otkriveno je da B tip HHDH uz azidni ion prihvaća još tri iona kao nukleofile (NaNO_2 , NaOCN , NaSCN), što u konačnici povećava broj produkata koje je moguće sintetizirati ovom biokatalitičkom metodom. Nadalje, otkriveno je da većina testiranih nukleofila uzrokuje inhibiciju enzima pri višim koncentracijama, što ograničava eksperimentalne uvjete provođenja reakcija. Stoga, klasični kotlasti reaktor korišten u radu ne bi bio dobro rješenje za provedbu reakcije na industrijskom nivou. Ovaj zadatak zahtijevao bi bolje poznavanje kinetike enzimskih reakcija, te pažljiv odabir reaktora i reakcijskih uvjeta u kojima bi se kontrolirao negativan utjecaj inhibirajućeg nukleofila.

Glavni zadatak naprednih tehnika, poput direktne mutageneze i molekuskog modeliranja, je poboljšati postojeće enzime u vidu aktivnosti, stabilnosti, selektivnosti i otpornosti na inhibiciju supstratima/produktima. Otkrivanje aminokiselina ključnih za neko od ovih svojstava predstavlja dobru polaznu točku za daljnja istraživanja i razvoj novih enzima. Ogranci 120 i 125 eksperimentalno su određeni kao ključni za povećanu enantioselektivnost HheB u odnosu na HheB2, čime je potvrđena pretpostavka Watanabe i suradnika iz 2015. godine. Također, računalnim modeliranjem predloženi su ogranci 162 i 169 enzima, kao dva položaja koja su značajna za kiralno prepoznavanje.

Računalna analiza pokazala je da afiniteti vezanja pojedinih enantiomera epoksida i azidoalkohola nisu u skladu s eksperimentalno dobivenim rezultatima (*E* vrijednostima), te da nisu ključni u pogledu enantioselektivnosti HDDH kataliziranih reakcija. Kinetički i termodinamički parametri reakcija unutar aktivnog mjesta enzima HheB ključni su za uspješnu enantioselektivnost enzimske reakcije.

6. LITERATURA

- [1] R. Abu, J. M. Woodley, Application of enzyme coupling reactions to shift thermodynamically limited biocatalytic reactions, *ChemCatChem* 7 (2015) 3094-3105.
- [2] R. A. Woodley, J. M. Sheldon, Role of biocatalysis in sustainable chemistry, *Chem. Rev.* 118 (2018) 801-838.
- [3] R. D. Fleischmann, M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. H. Tomb, B. A. Dougher, J. M. Merrick, Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*, *Science* 269 (1995) 496-519.
- [4] E. L. Bell, W. Finnigan, S. P. France, A. P. Green, M. A. Hayes, L. J. Hepworth, S. L. Lovelock, H. Niikura, S. Osuna, E. Romero, K. S. Ryan, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *Biocatalysis*, *Nat. Rev. Methods Primers* 46 (2021) 1-21.
- [5] Z. F. Blažević, N. Milčić, M. Sudar, M. Majerić Elenkov, Halohydrin dehalogenases and their potential in industrial application - A viewpoint of enzyme reaction engineering, *Adv. Synth. & Catal* 363 (2020) 388-410.
- [6] H. D. Flack, Louis Pasteur's discovery of molecular chirality and spontaneous resolution in 1848, together with a complete review of his crystallographic and chemical work, *Acta. Cryst.* A65 (2009) 371-389.
- [7] J. H. Kim, A. R. Scialli, Thalidomide: the tragedy of birth defects and the effective treatment of disease, *Toxicol. Sci.* 122 (2011) 1-6.
- [8] A. Mikleušević, Z. Hameršak, B. Salopek-Sondi, L. Tang, D. B. Janssen, M. Majerić Elenkov, Oxazolidinone synthesis through halohydrin dehalogenase-catalyzed dynamic kinetic resolution, *Adv. Synth. Catal.* 357 (2015) 1709-1714.
- [9] C. K. Winkler, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, Power of biocatalysis for organic synthesis, *ASC Cent. Sci.* 7 (2021) 55-71.
- [10] A. A. Koesoema, D. M. Standley, T. Senda, T. Matsuda, Impact and relevance of alcohol dehydrogenase enantioselectivities on biotechnological application, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104 (2020) 2897-2909.
- [11] J. An, Y. Nie, Y. Xu, Structural insights into alcohol dehydrogenases catalyzing asymmetric reductions, *Crit. Rev. Biotechnol.* 39 (2019) 336-379.

- [12] C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. J. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krabber, R. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Dervine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to Sitagliptin manufacture, *Science* 329 (2010) 305-309.
- [13] S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore, K. Baldenius, U. T. Bornscheuer, Biocatalysis: Enzymatic synthesis for industrial applications, *Angew. Chem. Int. Ed.* 60 (2021) 88-119.
- [14] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*, Vol. 7, Springer International Publishing AG: Cham, Switzerland, 2018, str. 7-8.
- [15] A. Scholtissek, D. Tischler, A. Westphal, W. van Berkel, C. Paul, Old yellow enzyme-catalysed asymmetric hydrogenation: Linking family roots with improved catalysis, *Catalysts* 7 (2017) 130-153.
- [16] C. K. Winklwe, K. Faber, M. Hall, Biocatalytic reduction of activated C=C-bonds and beyond: emerging trends, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 43C (2018) 97-105.
- [17] K. F. Biegasiewicz, S. J. Cooper, X. Gao, D. G. Oblinsky, J. H. Kim, S. E. Garfinkle, L. A. Joyce, B. A. Sandoval, G. D. Scholes, T. H. Hyster, Photoexcitation of flavoenzymes enables a stereoselective radical cyclization, *Science* 364 (2019) 1166-1169.
- [18] R. Fasan, Tuning P450 Enzymes as oxidation catalyst, *ASC Catal.* 2 (2012) 647-666.
- [19] L. Hammerer, C. K. Winkler, W. Kroutil, Regioselective biocatalytic hydroxylation of fatty acids by cytochrome P450s, *Catal. Lett.* 148 (2018) 787-812.
- [20] M. Bordeaux, V. Tyagi, R. Fasan, Highly diastereoselective and enantioselective olefin cyclopropanation using engineered myoglobin-based catalysts, *Angew. Chem. Int. Ed.* 54 (2014) 1744-1748.
- [21] P. S. Coleho, E. M. Brustad, A. Kannan, F. H. Arnold, Olefin cyclopropanation via carbene transfer catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes, *Science* 339 (2012) 307-310.
- [22] R. Yang, M. Rodriguez-Fernandez, P. C. St. John, F. J. Doyle, *8 Systems Biology u C. Corbelli, E. Carson (ur.), Modeling Methodology for Physiology and Medicine*, Elsevier, 2014, str. 159-187.

- [23] G. Hegyi, J. Kardos, M. Kovacs, A. Malanasi-Csizmadia, L. Nyitray, G. Pal, L. Radnai, A. Remenyi, I. Venekei, *Introduction to Practical Biochemistry*, Budimpešta: ELTE TTL, 2013, str. 121-139.
- [24] C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaikas, C. J. Shi, Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 7294-7299.
- [25] K. Faber, Non-sequential processes for the transformation of a racemate into a single stereoisomeric product: Proposal for stereochemical classification, *Chem. Eur. J.* 7 (2011) 5005-5010.
- [26] M. A. E. Emanuelsson, M. B. Osuna, J. Simpa, P. M. L. Castro, Treatment of halogenated organic compounds and monitoring of microbial dynamics in up-flow fixed bed reactors under sequentially alternating pollutant scenarios, *Biotechnol. Bioeng.* 99 (2008) 800-810.
- [27] A. O. Olaniran, D. Pillay, B. Pillay, Haloalkane and haloacid dehalogenases from aerobic bacterial isolates indigenous to contaminated sites in Africa demonstrate diverse substrate specificities, *Cemosphere* 55 (2004) 27-33.
- [28] D. B. Janssen, I. J. T. Dinkla, G. J. Poelarends, P. Trepstra, Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities, *Environ. Microbiol.* 7 (2005) 1868-1882.
- [29] J. E. T. van Hylckma Vlieg, L. Tang, J. H. Lutje Spelberg, T. Smilda, G. J. Poelarends, T. Bosma, A. E. J. van Merode, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, Halohydrin dehalogenases are structurally and mechanistically related to short-chain dehydrogenases/reductases, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 5058-5066.
- [30] C. E. Castro, E. W. Brtnicki, Biodehalogenation. Epoxidation of halohydrins, epoxide opening, and transhalogenation by a *Flavobacterium* sp., *Biochemistry* 7 (1968) 3213-3218.
- [31] E. W. Brtnicki, C. E. Castro, Biodehalogenation. Pathway for transhalogenation and the stereochemistry of epoxide formation from halohydrins, *Biochemistry* 8 (1969) 4677-4680.
- [32] A. J. van den Wijngaard, D. B. Janssen, B. Witholt, Degradation of epichlorohydrin and halohydrins by bacterial cultures isolated from freshwater sediment, *J. Gen. Microbiol.* 135 (1989) 2199-2208.

- [33] T. Nakamura, F. Yu, W. Mizunashi, I. Watanabe, Microbial transformation of prochiral 1,3-dichloro-2-propanol into optically active 3-chloro-1,2-propanediol, *Agric. Biol. Chem.* 55 (1991) 1931-1933.
- [34] F. Yu, T. Nakamura, W. Mizunashi, I. Watanabe, Cloning of two halohydrin hydrogen-halide-lyase genes of *Corynebacterium* sp. strain N-1074 and structural comparison of the genes and gene products, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58 (1994) 1451-1457.
- [35] A. J. van den Wijngaard, P. T. V. Reuvenkamp, D. B. Janssen, Purification and characterization of haloalcohol dehalogenase from *Arthrobacter* sp. strain AD2, *J. Bacteriol.* 173 (1991) 124-129.
- [36] T. P. Higgins, S. J. Hope, A. J. Effendi, S. Dawson, B. N. Dancer, Biochemical and molecular characterisation of the 2,3-dichloro-1-propanol dehalogenase and stereospecific haloalkane dehalogenases from a versatile *Agrobacterium* sp., *Biodegradation* 16 (2005) 485-492.
- [37] M. Schallmeyer, J. Koopmeiners, E. Wells, R. Wardenga, A. Schallmeyer, Expanding the halohydrin dehalogenase enzyme family: identification of novel enzymes by database mining, *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (2014) 7303-7315.
- [38] L. Tang, J. H. Lutje Spelberg, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, Kinetic mechanism and enantioselectivity of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter*, *Biochemistry* 42 (2003) 5378-5386.
- [39] R. M. de Jong, J. J. W. Tiesinga, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, L. Tang, D. B. Janssen, B. W. Dijkstra, Structure and mechanism of a bacterial haloalcohol dehalogenase: A new variation of the short-chain dehydrogenase/reductase fold without an NAD(P)H binding site, *EMBO J.* 22 (2003) 4933-4944.
- [40] R. M. de Jong, J. J. Tiesinga, A. Villa, L. Tang, D. B. Janssen, B. W. Dijkstra, Structural basis for the enantioselectivity of an epoxide ring opening reaction catalyzed by halo alcohol dehalogenase HheC, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 13338-13343.
- [41] Q. Zang, H. Peng, F. Gao, Y. Liu, H. Cheng, J. Thompson, G. F. Gao, Structural insight into the catalytic mechanism of gluconate 5-dehydrogenase from *Streptococcus suis*: Crystal structures of the substrate-free and quaternary complex enzymes, *Protein Sci.* 18 (2009) 294-303.

- [42] P. E. M. Siegbahn, F. Himo, Recent developments of the quantum chemical cluster approach for modeling enzyme reactions, *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (2009) 643-651.
- [43] L. Tang, D. E. Torres Pazmino, M. W. Fraaije, R. M. de Jong, B. W. Dijkstra, D. B. Janssen, Improved catalytic properties of halohydrin dehalogenase by modification of the halide-binding site, *Biochemistry* 44 (2005) 6609-6618.
- [44] D. B. Janssen, M. Majerić Elenkov, G. Hasnaoui, B. Hauer, J. H. Lutje Spelberg, Enantioselective formation and ring-opening of epoxides catalysed by halohydrin dehalogenases, *Biochem. Soc. Trans.* 34 (2006) 291-295.
- [45] L. Tang, A. E. J. van Merode, J. H. Lutje Spelberg, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, Steady-state kinetics and tryptophan fluorescence properties of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter*. Roles of W139 and W249 in the active site and halide-induced conformational change. *Biochemistry* 42 (2003) 14057-14065.
- [46] R. M. de Jong, K. H. Kalk, L. Tang, D. B. Janssen, B. W. Dijkstra, The X-ray structure of the haloalcohol dehalogenase HheA from *Arthrobacter* sp. strain AD2: Insight into enantioselectivity and halide binding in the haloalcohol dehalogenase family, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 4051-4056.
- [47] F. Watanabe, F. Yu, A. Ohtaki, Y. Yamanaka, K. Noguchi, M. Yohda, M. Odaka, Crystal structures of halohydrin hydrogen-halide-lyases from *Corynebacterium* sp. N-1074, *Proteins* 83 (2015) 2230-2239.
- [48] G. J. Polarends, J. E. T. van Hylckama Vlieg, J. R. Marchesi, L. M. F. Dos Santos, D. B. Janssen, Degradation of 1,2-dibromoethane by *Mycobacterium* sp. strain GP1. *J. Bacteriol.* 181 (1999) 2050-2058.
- [49] M. Majerić Elenkov, B. Hauer, D. B. Janssen, Enantioselective ring opening of epoxides with cyanide catalysed halohydrin dehalogenases: A new approach to non-racemic β -hydroxy nitriles, *Adv. Synth. Catal.* 348 (2006) 579-585.
- [50] J. H. Schrittwieser, I. Lavandera, B. Seisser, B. Mautner, W. Kroutil, Biocatalytic cascade for synthesis of enantiopure β -azidoalcohols and β -hydroxynitriles, *Eur. J. Org. Chem.* 2009 (2009) 2293-2298.

- [51] J. H. Lutje Spelberg, L. Tang, M. van Gelder, R. M. Kellogg, D. B. Janssen, Exploration of the biocatalytic potential of a halohydrin dehalogenase using chromogenic substrates, *Tetrahedron: Asymmetry* 13 (2002) 1083-1089.
- [52] M. Majerić Elenkov, M. Čičak, A. Smolko, A. Knežević, Halohydrin dehalogenase-catalysed transformations of epifluorohydrin, *Tetrahedron Lett.* 59 (2018) 406-408.
- [53] B. Seisser, I. Lavandera, K. Faber, J. H. Lutje Spelberg, W. Kroutil, Stereo-complementary two-step cascades using a two-enzyme system leading to enantiopure epoxides, *Adv. Synth. Catal.* 349 (2007), 1399-1404.
- [54] T. Nakamura, T. Nagasawa, F. Yu. I. Watanabe, H. Yamada, A new enzymatic synthesis of (R)- γ -chloro- β -hydroxybutironitrile, *Tetrahedron* 50 (1994) 11821-11826.
- [55] F. Watanabe, F. Yu, A. Ohtaki, Y. Yamanaka, K. Noguchi, M. Odaka, M. Yohda, Improvement of enantioselectivity of the B-type halohydrin hydrogrn-halide-lyase from *Corynebacterium* sp. N-1074, *J. Biosci. Bioeng.* 122 (2016) 270-275.
- [56] G. Hasnaoui-Dijoux, M. Majerić Elenkov, J. H. Lutje Spelberg, B. Hauer, D. B. Janssen, Catalytic Promiscuity of Halohydrin Dehalogenase and its Application in Enantioselective Epoxide Ring Opening, *ChemBioChem* 9 (2008) 1048-1051.
- [57] G. Hasnaoui, J. H. Lutje Spelberg, E. de Vries, L. Tang, B. Hauer, D. B. Janssen, Nitrite-mediated hydrolysis of epoxides catalyzed by halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1: A new tool for the kinetic resolution of epoxides, *Tetrahedron: Asymmetry* 16 (2005) 1685-1692.
- [58] L. Turin, PCT Int. Appl. WO 2004/101472 A2; (2004) 1015974.
- [59] J. H. Lutje Spelberg, J. E. van Hylckama Vlieg, L. Tang, D. B. Janssen, R. M. Kellogg, Highly enantioselective and regioselective biocatalytic azidolysis of aromatic epoxides, *Org. Lett.* 3 (2001), 41-3.
- [60] K. Drauz, H. Groger, O. May, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Vol. 1, Wiley-VCH, Weinheim, 2012, str. 386-387.
- [61] W. Szymanski, C. P. Postema, C. Tarabino, F. Berthiol, L. Campbell-Verduyn, S. dr Wildeman, J. G. de Vries, B. L. Feringa, D. B. Janssen, Combining designer cells and click chemistry for a one-pot four-step preparation of enantiopure β -hydroxytriazoles, *Adv. Synth. Catal.* 352 (2010) 2111-2115.

- [62] D. Zelasctyk, K. Kiec-Kononowicz, Biocatalytic approaches to optically active β -blockers, *Curr. Med. Chem.* 14 (2007) 53-65.
- [63] C. Garcia, V. S. Martin, Asymmetric addition to ketones: enantioselective formation of tertiary alcohols, *Curr. Org. Chem.* 10 (2006) 1849-1889.
- [64] A. Ghanem, H. Y. Aboul-Enein, Application of lipases in kinetic resolution of racemates, *Chirality* 17 (2005) 1-15.
- [65] M. Majerić Elenkov, H. W. Hoeffken, L. Tang, B. Hauer, D. B. Janssen, Enzyme-catalyzed nucleophilic ring opening of epoxides for the preparation of enantiopure tertiary alcohols, *Adv. Synth. Catal.* 349 (2007) 2279-2285.
- [66] M. Majerić Elenkov, L. Tang, B. Hauer, D. B. Janssen, Sequential kinetic resolution catalyzed by halohydrin dehalogenase, *Org. Lett.* 8 (2006) 4227-4229.
- [67] J. Lutje Spelberg, J. van Hylckama Vlieg, T. Bosma, R. Kellogg, D. Janssen, A tandem enzyme reaction to produce optically active halohydrins, epoxides and diols, *Tetrahedron: Asymmetry* 10 (1999) 2863-2870.
- [68] R. C. Moellering, Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial, *Ann. Int. Med.* 138 (2003) 135-142.
- [69] M. Majerić Elenkov, L. Tang, A. Meetsma, B. Hauer, D. B. Janssen, Formation of enantiopure 5-Substituted oxazolidinones through enzyme-catalysed kinetic resolution of epoxides, *Org. Lett.* 10 (2008) 2417-2420.
- [70] N. Wan, J. Tian, X. Zhou, R. Ma, H. Wang, B. Cui, W. Han, Y. Chen, Regioselective ring-opening of styrene oxide derivatives using halohydrin dehalogenase for synthesis of 4-aryloxazolidinones, *Adv. Synth. Catal.* 9 (2019) 4657-4655.
- [71] W. J. Choi, Biotechnological production of enantiopure epoxides by enzymatic kinetic resolution, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84 (2009) 239-247.
- [72] R. M. Haak, C. Tarabino, D. B. Janssen, A. J. Minaard, J. G. de Vries, B. L. Feringa, Synthesis of enantiopure chloroalcohols by enzymatic kinetic resolution, *Org. Biomol. Chem.* 5 (2007) 318.

- [73] M. Fuchs, Y. Simeo, B. T. Ueberbacher, B. Mautner, T. Netscher, K. Faber, Enantiocomplementary chemoenzymatic asymmetric synthesis of (R)- and (S)-chromanemethanol, *Eur. J. Org. Chem.* (2009) 833-840.
- [74] R. M. Haak, F. Berthiol, T. Jerphagnon, A. J. A. Gayet, C. Tarabino, C. P. Postema, V. Ritleng, M. Pfeffer, D. B. Janssen, A. J. Minnaard, B. L. Feringa, J. G. de Vries, Dynamic kinetic resolution of racemic β -haloalcohols: Direct access to enantioenriched epoxides, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 13508-13509.
- [75] J. H. Lutje Spelberg, L. Tang, R. M. Kellogg, D. B. Janssen, Enzymatic dynamic kinetic resolution of epihalohydrins, *Tetrahedron: Asymmetry* 15 (2004) 1095-1102.
- [76] S. L. Neidleman, W. F. Amon, J. Geigert, US Pat. Appl. 42,219, 27. Jan. 1981; (1981) US 4,247,641.
- [77] T. Nagasawa, H. Yamada, Microbial production of commodity chemicals, *Pure Appl. Chem.* 67 (1995) 1241-1256.
- [78] J. Geigert, S. L. Neidleman, T. E. Liu, S. K. DeWitt, B. M. Panschar, D. J. Dalietos, E. R. Sigel, Production of epoxides from α,β -halohydrins by *Flavobacterium* sp., *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (1983) 1148-1149.
- [79] D. J. Hardman, B. M. Stubbs, A. Bull, P. J. Salis, Eur. Pat. Appl. 92303681.8, 23. March 1992, (1996) EP 0 510 987 B1.
- [80] N. Kasai, T. Suzuku, H. Idogaki, Enzymatic degradation of esters of dichloropropanols: Removal of chlorinated glycerides from processed foods *LWT - Food. Sci. Technol.* 39 (2006) 86-90.
- [81] U. T. Bornscheuer, M. Hesseler, Enzymatic removal of 3-monochloro-1,2-propanediol (3-MCPD) and its esters from oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112 (2010) 552-556.
- [82] S. C. Davis, J. H. Grate, D. R. Gray, US Pat. Appl.10/782,258, Nov. 2006; (2006) US 7,132,267 B2.
- [83] F. Dong, H. Chen, C. A. Malapit, M. B. Prater, M. Li, M. Yuan, K. Lim, and S. D. Minter, Biphasic bioelectrocatalytic synthesis of chiral β -hydroxy nitriles, *J. Am. Chem. Soc.* 142 (2020) 8374-8382.

-
- [84] L. Tang, J. E. T. van Hylckama Vlieg, J. H. Lutje Spelberg, M. W. Fraaje, D. B. Janssen, Improved stability of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 by replacement of cysteine residues, *Enzyme Microbiol. Technol.* 30 (2002) 251-258.
- [85] L. Tang, X. Zhu, H. Zheng, R. Jiang, M. Majerić Elenkov, Key residues for controlling enantioselectivity of halohydrin dehalogenase from *Arthrobacter* sp. strain AD2, revealed by structure-guided direct evolution, *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (2012) 2631-2637.
- [86] URL: <http://biocatalysis.uni-graz.at/biocatalysis-tools/enantio> (23.1.2023.)
- [87] M. Majerić Elenkov, I. Primožić, T. Hrenar, A. Smolko, I. Dokli, B. Salopek-Sondi, L. Tang, Catalytic activity of halohydrin dehalogenases towards spiroepoxides, *Org. Biomol. Chem.* 10 (2012) 5063-5072.

7. POPIS KRATICA

APS – amonijev persulfat

BPB – bromfenol plavo

BSA – goveđi serum albumin

c – koncentracija

CBB – Commasie brilliant blue

CDI – 1,1'-karbonildiimidazol

d – širina kivete

DDQ – 2,3-dikloro-5,6-dicijano-1,4-benzokinon

DKR – dinamička kinetička rezolucija

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

e.v. – enantiomerni višak

GC – plinska kromatografija

HHDH – halogenhidrin-dehalogenaze

HPLC – tekućinska kromatografija visokih performansa

K_i – konstanta inhibicije

K_m – Michaelisova konstanta

KR – kinetička rezolucija

MM – Michaelis – Menteničina kinetika

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

PNSO – *p*-nitrostiren oksid

r – brzina reakcije

S.A. – specifična aktivnost

SDS – natrijev dodecil-sulfat

STY – eng. Site Time Yield

TEMG – Tris, EDTA, β -Metkaproetanol, Glicerol

TEMED - tetrametiletildiamin

TLC – tankoslojna kromatografija

V.A. – volumna aktivnost

V_E – volumen enzima

V_m – maksimalna brzina

V_r – ukupni volumen

ε – ekstincijski koeficijent

γ – masena koncentracija

Aminokiseline:

Ala, A - Alanin

Arg, R – Arginin

Asn, N – Aspargin

Asp, D – Aspartna kiselina

Cys, C - Cistein

Gln, Q - Glutamin

His, H – Histidin

Ile, I – Izolucein

Leu, L – Lucein

Phe, F – Fenilalanin

Ser, S – Serin

Thr, T – Treonin

Trp, W – Triptofan

Tyr, Y – Tirozin

Val, V – Valin

8. ŽIVOTOPIS

Emina Mehić U razdoblju od 2001. – 2009. završila je OŠ Ante Kovačića, nakon čega je upisala opću gimnaziju Lucijan Vranjanin. 2013. godine upisala je Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, studij Kemijsko inženjerstvo. Za vrijeme trajanja preddiplomskog studija odradila je praksu u PLIVA Hrvatska d.o.o. (R&D TAPI Kemija) i Končar D&ST d.d. (Ulazna kontrola transformatorskog ulja). Završni rad izradila je pod mentorstvom prof. dr. sc. Sanje Martinez pod naslovom *Određivanje sastavnica mjerne nesigurnosti i validacija korozijskog ispitivanja u slanoj komori*. 2016. godine na istom Fakultetu upisala je diplomski studij Kemijskog inženjerstva, modul Kemijske tehnologije i proizvodi. Diplomski rad izradila je pod mentorstvom prof. dr. sc. Marijane Hranjec pod naslovom *Novi amidino susptituirani konjugati benzimidazola kao potencijalni antitumorski agensi*. Nakon obrane diplomskog rada 2018. godine zaposlila se na poziciji kemičara u PLIVA Hrvatska d.o.o.. Kao član R&D TAPI Kemije radila je na razvoju sinteze različitih API-ja. 2020. godine zaposlila se kao asistent na institutu Ruđer Bošković u sklopu projekta CATPHARMA, te je upisala doktorski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Tijekom dokorskog studija odradila je jednomjesečni boravak u laboratoriju za organsku kemiju i biokatalizu (Genoscope, Évry-Courcouronnes, Francuska), gdje je radila na ispitivanju nitrilaza i biokatalitičkim transformacijama uz korištenje cijelih stanica. Tijekom cijelog obrazovanja bila je aktivan član odbojkaških timova s kojima je osvojila brojna odličja.

Obrazovanje:

- 2020. – danas (dr. sc.) → Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišni poslijediplomski doktorski studiji, Kemijsko inženjerstvo i primjenjena kemija
- 2018. – 2016. (mag. ing. cheming.) → Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišni diplomski studiji, Kemijsko inženjerstvo, Kemijske tehnologije i proizvodi
- 2016. – 2013. (univ. bacc. ing. cheming.) → Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišni preddiplomski studiji, Kemijsko inženjerstvo

Radno iskustvo:

- 2020. – danas (asistent) → Institut Ruđer Bošković, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorij za stereoselektivnu sintezu i biokatalizu
- 2020. – 2018. (kemičar) → PLIVA Hrvatska, R&D TAPI Kemija

Profesionalno usavršavanje:

- 19.09.2022. – 18.10.2022. → CEA Institut de Génomique, Genoscope, Évry – Courcouronnes, Francuska, Laboratorij za organsku kemiju i biokatalizu

Popis publikacija:

- **E. Mehić**, L. Hok, Q. Wang, I. Dokli, M. Svetec Miklenić, Z. Findrik Blažević, L. Tang, R. Vianello, M. Majerić Elenkov, Expanding the scope of enantioselective halohydrin dehalogenases – group B, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 364 (2022), 2576-2588.
Rad je izdvojen na naslovnici časopisa.

Popis sudjelovanja na kongresima:

- **E. Mehić**, Z. Findrik Blažević, M. Majerić Elenkov, Biocatalytic scope of halohydrin dehalogenase from *Mycobacterium* sp. GP1 (HheB2), *BioTrans 2021*, Graz (2021.)
- R. J. Kolman, **E. Mehić**, M. Majerić Elenkov, I. Dokli, Synthesis and kinetic resolution of propargylic epoxides, *BioTrans 2021*, Graz (2021.)
- **E. Mehić**, Z. Findrik Blažević, M. Majerić Elenkov, Biocatalytic scope of halohydrin dehalogenase from *Mycobacterium* sp. GP1 (HheB2) and mutant HheB2-T120A, 27 HSKIKI, Veli Lošinj (2021.)
- R. J. Kolman, **E. Mehić**, M. Majerić Elenkov, I. Dokli, Synthesis and biocatalysis of propargylic epoxides, 27 HSKIKI, Veli Lošinj (2021)
- **E. Mehić**, Z. Findrik Blažević, M. Majerić Elenkov, Biocatalytic properties of group B halohydrin dehalogenases in nucleophilic ring-opening reactions of epoxides, *GRC Biocatalysis (Making Biocatalysis More Predictive: Accelerating Biocatalytic Solutions to Synthetic Challenges)*, Manchester, NH, United States (2022.)

Sudjelovanje na projektima:

- „Inovativna rješenja u katalitičkim proizvodnim procesima za potrebe farmaceutske industrije“ – CATPHARMA, Operativni program „Konkurentnost i kohezija“ 2014. – 2020. (KK.01.1.1.04.0013), voditelj projekta dr. sc. Srećko Kirin

Advanced 
**Synthesis &
Catalysis**



Cover Picture

Expanding the Scope of Enantioselective Halohydrin Dehalogenases – Group B

E. Mehić, L. Hok, Q. Wang, I. Dokli, M. Svetec Miklenić, Z. Findrik Blažević, L. Tang, R. Vianello, M. Majerić Elenkov

WILEY-VCH