

# Uvid u primjenska ograničenja halogenhidrin-dehalogenaza kroz kinetička istraživanja

N. Milčić,<sup>a,\*</sup> M. Sudar,<sup>a</sup> M. Majerić Elenkov<sup>b</sup> i Z. Findrik Blažević<sup>a</sup>

Ovo djelo je dano na korištenje pod  
Creative Commons Attribution 4.0  
International License



<sup>a</sup> Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Trg Marka Marulića 19, 10 000 Zagreb

<sup>b</sup> Institut Ruder Bošković, Bijenička 54, 10 000 Zagreb

## Sažetak

Biokataliza sve više dobiva na važnosti kao znanstvena disciplina u području asimetrične sinteze farmaceutskih spojeva i specijaliziranih kemikalija, a tijekom posljednjih godina bilježi izrazit napredak kroz industrijsku primjenu. Da bi se biokatalitički procesi uspješno razvili, optimizirali i integrirali u industrijsku sintezu, nužno ih je sagledati iz više perspektiva, npr. od proteinskog inženjerstva za dizajn novih enzima, preko organske kemije u planiranju sintetskih puteva, do reakcijskog inženjerstva za dizajn i optimizaciju procesa. Ovaj se rad posebno usredotočuje na halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH), skupinu enzima s velikim potencijalom, koja je unatoč svojoj perspektivnosti još uvijek nedovoljno istražena. HHDH kataliziraju reakcije otvaranja epoksidnih prstenova s različitim nukleofilima, što dovodi do stvaranja novih C–C, C–O, C–S i C–N veza te sinteze  $\beta$ -supstituiranih alkohola. To svojstvo čini HHDH vrijednim enzimima za proizvodnju važnih spojeva kao što su lijekovi, agrokemikalije i fine kemikalije. Unatoč velikom zanimanju koje su znanstvena i industrijska zajednica opravdano pokazale prema ovoj skupini enzima, što je posljedično dovelo do implementacije HHDH-kataliziranih reakcija u farmaceutskoj industriji, kinetičke karakteristike te skupine ipak su ostale uglavnom nepoznate. Izazovi kao što su razne inhibicije enzima i smanjenje operacijske stabilnosti pri sintetski relevantnim uvjetima još uvijek su slabo istraženi. Budući da je istraživanje tih problema kroz detaljne kinetičke studije ključno za proširenje mogućnosti praktičnih primjena HHDH u procesima sinteze, ovaj pregledni rad koncipiran je kao rasprava o nedavnim i relevantnim istraživanjima na temu kinetičkih karakteristika i ograničenja te skupine enzima, prikupljenim tijekom višegodišnjeg praktičnog iskustva i laboratorijskog rada s HheC iz *Agrobacterium radiobacter* i njegovim varijantama, uglavnom u sintezi fluoriranih  $\beta$ -azido alkohola i  $\beta$ -hidroksi nitrila.

## Ključne riječi

Halogenhidrin-dehalogenaze, HHDH, enzimski kinetika, inhibicije enzima, operacijska stabilnost enzima

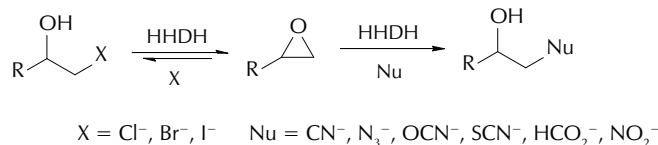
## 1. Uvod

Enzimi su makromolekularni biološki katalizatori koji se desetljećima upotrebljavaju u industrijskim procesima.<sup>1</sup> Budući da djeluju u blagim reakcijskim uvjetima s visokom aktivnošću, specifičnošću i selektivnošću, biokataliza se često nameće kao ekološki prihvatljivija i ekonomski isplativija alternativa tradicionalnim sintetskim postupcima u organskoj kemiji.<sup>2</sup> Iako se dugo smatrala zelenom obećavajućom tehnologijom s potencijalom za primjenu u procesima na industrijskoj razini, biokataliza danas ima status prepoznate i široko prihvaćene tehnologije u asimetričnoj sintezi.<sup>3</sup> Fokus ovog rada je na prilično neistraženoj, ali industrijski značajnoj skupini enzima halogenhidrin-dehalogenaza (HHDH). HHDH, koji se također nazivaju haloalkohol-dehalogenaze i halohidrin-hidrogenhalid-liaze, pripadaju E.C. 4.5.1. skupini enzima, a po svojoj primarnoj prirodnoj funkciji uključeni su u razgradnju halogeniranih onečišćujućih tvari koje mikroorganizmi na onečišćenim područjima rabe kao jedini izvor energije.<sup>4,5</sup> Halogenirani organski spojevi su postojani, toksični i široko rasprostranjeni ksenobiotici, stoga se HHDH rabe u bioremedijaciji onečišćenog okoliša. Zbog toga je dehalogeniranje 1,3-diklor-2-propanola (1,3-DCP) i sinteza epiklorohidrina (ECH) jedna od najbolje proučenih reakcija kataliziranih

tom skupinom enzima.<sup>6</sup> Kako je reakcija dehalogenacije reverzibilna, HHDH enzimi nisu poznati samo po svojoj sposobnosti uklanjanja atoma klora, broma i joda iz onečišćujućih tvari, već i po ugradnji iona halogena otvaranjem epoksidnog prstena. Činjenicu da ti enzimi kataliziraju pretvorbu dibromopropanola u epibromohidrin uočili su već 1968. Castro i Bartnicki,<sup>7</sup> ali je tek ranih 1990-ih otkriveno da HHDH imaju sposobnost kataliziranja *in vitro* reakcija otvaranja prstena s različitim nukleofilima.<sup>8</sup> Od njihova otkrića do danas, utvrđeno je da HHDH enzimi uz halogene rabe i čitav niz drugih nukleofila u reakcijama otvaranja epoksidnog prstena (shema 1). Ti, za HHDH neprirodni nukleofili, su mali negativno nabijeni ioni kao što su azid, cijanid, cijanat, tiocijanat, nitrit i format.<sup>9</sup> Navedeno svojstvo pokazalo se iznimno korisnim sa stajališta sintetske kemije jer omogućuje stvaranje novih C–C, C–O, C–S i C–N veza te reakcije s nestandardnim supstratima. Na taj način nastaju alkoholi poput  $\beta$ -nitro- i  $\beta$ -azido alkohola,  $\beta$ -cijanoalkohola te općenito 1,2-difunkcionalizirani organski spojevi.<sup>10,11</sup> Osim njihove mogućnosti prihvaćanja širokog spektra nukleofila, HHDH enzimi ne zahtijevaju kofaktore te u reakcijama pokazuju svojstva visoke regio- i enantioselektivnosti, što ih čini zanimljivim kandidatima za različite industrijske primjene.<sup>12</sup> HHDH se mogu upotrebljavati za sintezu važnih građevnih blokova i prekursora u farmaceutskoj i agrokemijskoj industriji, kao i industriji finih kemikalija. Najistaknutiji industrijski primjer je upotreba varijanta C-tipa HHDH enzima za proizvodnju etil

\* Autorica za dopisivanje: doc. dr. sc. Nevena Milčić  
E-pošta: [nmilcic@fkit.unizg.hr](mailto:nmilcic@fkit.unizg.hr)

(*R*)-4-cijano-3-hidroksibutanoata, ključnog intermedijara u sintetskom putu za lijek atorvastatin.<sup>13</sup> HDDH se također upotrebljavaju u sintezi ključnog intermedijara za antivirusni lijek (*S*)-cidofovir, koji se prodaje pod imenom Vistide (Gilead Sciences).<sup>14</sup>



*Shema 1* – Raspon nukleofila koje halogenhidrin-dehalogenaze prihvaćaju u katalitičkim reakcijama. Reakcijska shema prilagođena iz referencija<sup>9,15</sup>.

*Scheme 1* – Range of accepting nucleophiles in reactions catalysed by halohydrin dehalogenases. Reaction scheme adapted from references<sup>9,15</sup>.

## 2. HDDH u sintezi azido i cijanoalkohola

Fluorirani organski spojevi opsežno su proučavani u farmaceutskim istraživanjima i medicinskoj kemiji zbog njihovih jedinstvenih svojstava. Na trenutačnom globalnom tržištu više od 20 % lijekova sadrži fluor, a oko polovica ih sadrži mono- ili multfluorirani aromatski prsten.<sup>16,17</sup> Štoviše, broj lijekova koji sadrže fluor na svjetskom tržištu u trendu je stalnog porasta. Međutim, organofluorirani spojevi su iznimno rijetki u prirodi, te dolaze u obliku samo nekoliko međusobno strukturno sličnih molekula. To ustvari znači da je dostupnost i raznolikost fluoriranih građevnih blokova za potrebe istraživanja isključivo odgovornost sintetskih kemičara.

Epoksidi su vrlo vrijedni početni materijali u organskoj kemiji zahvaljujući svojoj reaktivnosti i sintetskom potencijalu.<sup>18</sup> Isto tako, organski azidi i nitrili strateški su vrijedni građevni blokovi jer su njihove funkcionalne skupine vrlo reaktivne te omogućuju spajanje građevnih blokova s drugim molekulama, čime se pojednostavljuje proces dizajniranja složenih molekula od interesa. Često se upotrebljavaju u farmaceutskoj industriji za sintezu raznih građevnih blokova koji sadrže dušik, npr. amina i heterocikličkih spojeva poput triazola.<sup>19,20</sup> Organski azidi često su reaktivni i nestabilni, što čini rukovanje tim spojevima zahtjevnim, pa se često izostavljaju iz industrijskih procesa. Međutim, studije su pokazale da u nekim slučajevima ugradnja atoma fluora u organske azide rezultira stabilizacijom molekula, što može sintezu na većoj skali učiniti daleko sigurnijom, a time i poželjnijom sa stajališta procesnog inženjerstva.<sup>21</sup>

Iako je vrijednost fluoriranih organskih azida i cijanida velika, dostupne metode za njihovu sintezu su rijetke i zahtjevne.<sup>22</sup> Zbog vrijednosti konačnih produkata, u ovom radu, HDDH-katalizirane reakcije sinteze fluoriranih enantioobogaćenih  $\beta$ -azido alkohola,  $\beta$ -hidroksi nitrila i epoksida primjenjuju se kao modelne reakcije za ilustraciju kinetičkih karakteristika HDDH enzima, kao i raspravu o njihovim primjenskim ograničenjima.

*Majerić Elenkov i sur.*<sup>15</sup> ustvrdili su 2018. godine da HheB2 iz *Mycobacterium* sp. GP1 može katalizirati azidolizu epifluorohidrina na neselektivni način. Konačni produkt je 1-azido-3-fluoro-2-propanol, što je u suprotnosti s drugim ispitivanim epihalohidrinima ( $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$ ), gdje kao produkt nastaje 1,3-diazido-2-propanol. Na taj način autori su pokazali da HDDH ne mogu upotrebljavati fluorirane alkohole kao supstrate u reakciji zatvaranja prstena, budući da enzimi nisu sposobni za cijepanje jake C–F veze.<sup>15</sup> Potom je u istoj istraživačkoj skupini provedena azidoliza i cijanoliza niza fluoriranih derivata stiren oksida.<sup>23</sup> Enantioselektivne reakcije otvaranja epoksidnog prstena katalizirane HDDH enzimima provedene su s ciljem sinteze  $\beta$ -azido i cijanoalkohola visoke optičke čistoće. Reakcije su započete s pet odabranih derivata stiren oksida s različitim fluoriranim skupinama u *para*-položaju ( $\text{F}, \text{CF}_3, \text{OCF}_3, \text{OCHF}_2, \text{SCF}_3$ ). Osim željenih  $\beta$ -azido i cijanoalkohola visoke optičke čistoće, produkti tih reakcija kinetičke rezolucije su neizreagirani (*S*)-enantiomeri supstrata koji zaostaju u reakcijskoj smjesi.<sup>23</sup> Biokatalitička kinetička rezolucija u teoriji je vrlo atraktivna s okolišnog i ekonomskog aspekta, budući da se njome izbjegava izravna fluorinacija molekula toksičnim kemikalijama. U navedenom istraživanju<sup>23</sup> pokazano je da se divlji tip HheC i njegova W249P varijanta mogu upotrebljavati u modifikaciji malih, fluoriranih organskih molekula upotrebljavajući azide i cijanide kao nestandardne nukleofile. Reakcije azidolize odvijale su se s visokom  $\beta$ -regioselektivnošću i enantioselektivnost, s  $E > 100$  za *para*-fluoro-stiren oksid te  $E > 200$  za ostale fluorirane derivate stiren-oksida. To istraživanje, prvo te vrste, pokazalo je da se HDDH enzimi mogu upotrebljavati u sintezi korisnih, optički čistih, fluoriranih građevnih blokova. Ipak, u istraživanju su uočeni određeni nedostaci i ograničenja, koji su bili posebno izraženi pri prijelazu s analitičke na preparativnu skalu. Naime, kinetička rezolucija *rac*-2-(4-(trifluorometil)fenil)oksirana s natrijevim cijanidom katalizirana W249P varijantom enzima provedena je na preparativnoj skali, a za dobivanje produkta (*S*)-3-hidroksi-3-(4-(trifluorometil)fenil)propannitrila s iskorištenjem od 30 % i ee 98 % bile su potrebne visoke količine enzima ( $w_{\text{enzim}} = 40 \%$ ), niske koncentracije supstrata ( $C_{\text{supstrat}} = 20 \text{ mM}$ ) te dugo reakcijsko vrijeme ( $t = 15 \text{ h}$ ). Velik utrošak enzima i rezultirajuće neadekvatne koncentracije produkta, zajedno s dugim ukupnim trajanjem reakcije, ukazuju na potrebu za poboljšanjem. Na temelju reakcijskog ishoda, jedan od zaključaka istraživanja bio je da bi se takve biokatalitičke reakcije trebale optimizirati da bi se smanjili gubici u sustavu i poboljšao ishod sintetskog procesa.

## 3. Kinetičke značajke istraživanih HDDH enzima

Budući da su HDDH enzimi još uvijek u velikoj mjeri neistraženi, ta skupina kontinuirano se i opsežno proučava, ne samo u laboratorijskom mjerilu već i u industriji.<sup>11,13,14</sup> Posljednjih godina velik je napredak postignut u svezi HDDH u različitim aspektima, od otkrivanja do sad nepoznatih podskupina enzima s novim specifičnostima i svojstvima, poput aktivnosti HheG prema cikličkim epoksidima,<sup>24,25</sup> preko nepoznatih preferencija već dugo poznatih

enzima,<sup>26</sup> do dizajna novih varijanti enzima s poboljšanim katalitičkim svojstvima.<sup>27</sup> U 2020. godini<sup>11</sup> prikupljeni su i odrađeni podaci iz svih do tad objavljenih radova na temu HDDH, kojih je u to vrijeme bilo oko 100. Unatoč brojnim nedavno objavljenim kvalitetnim studijama o HDDH enzimima, u postojećoj literaturi utvrđen je ozbiljan nedostatak podataka o kinetičkom ponašanju HDDH enzima. Analizom podataka otkriveno je da su 34 rada izvjestila o nekim ili svim temeljnim kinetičkim parametrima (maksimalna brzina reakcije –  $V_m$ , Michaelisova konstanta –  $K_m$ , katalitička konstanta –  $k_{cat}$ ) za specifične reakcije, ali niti u jednom istraživanju nije provedena temeljitija kinetička analiza koja bi ukazala na nešto više od jednostavnog odnosa između enzima i supstrata. Fundamentalni kinetički parametri predstavljaju vrijedne podatke pri usporedbi različitih divljih tipova ili varijanti HDDH enzima i mogu poslužiti kao čvrsta osnova za početni pregled aktivnosti enzima prema različitim supstratima. Unatoč tome, da bi se uistinu i sveobuhvatnije procijenila primjenjivost pojedinih enzima, potreban je širi skup kinetičkih podataka. Nedostatak znanja o kinetičkom ponašanju enzima HDDH, kao i nedovoljna biokatalitička produktivnost u nekim slučajevima, koje su prikazane u prethodnom istraživanju,<sup>11</sup> zajedno s ranije objašnjenim ograničenjima na preparativnoj skali koja su utvrđena istraživanjem provedenim u istraživačkoj skupini Majerić Elenkov,<sup>23</sup> doveli su do ideje za sustavnu kinetičku karakterizaciju varijanti HheC enzima u sintezi  $\beta$ -azido alkohola<sup>28</sup> i  $\beta$ -hidroksil nitrila.<sup>29</sup>

### 3.1. Istraživanje prisutnosti fenomena inhibicija u HDDH-kataliziranim reakcijama

U ranije opisanom istraživanju postojeće literature o HDDH enzimima<sup>11</sup> uočeno je da je samo sedam radova izvjestilo o postojanju inhibicije enzima nekim spojevima prisutnim u reakcijskom sustavu i numerički ih izrazilo kao konstante inhibicije ( $K_i$ ). Inhibicije enzima supstratima, produktima i nusproduktima predstavljaju važan dio metabolizma za održavanje stanične homeostaze, stoga su široko rasprostranjeni fenomeni u kinetici enzima i često se susreću tijekom *in vitro* eksperimenata sa svim oblicima biokatalizatora (pročišćeni enzimi, cijele stanice, slobodni i imobilizirani biokatalizatori). Naravno, spojevi prisutni u biokatalitičkim reakcijama iz prirodnih metaboličkih puteva nisu jedini koji uzrokuju inhibicije. Razna otapala koja se dodaju za povećanje topljivosti organskih spojeva, stabilizatori, ali i drugi spojevi koji su prisutni kad se sinteze odvijaju kaskadno, što je čest slučaj kod HDDH enzima, mogu biti inhibitori enzimske aktivnosti.

U ranijim istraživanjima pokazalo se da je HDDH enzim inhibiran etil 4-kloroacetatom (COBE), koji je prisutan kao supstrat za ketoreduktazu u kaskadnoj sintezi prekursora atorvastatina, etil (*R*)-4-cijano-3-hidroksibutirata.<sup>13</sup> Kasnije se pokazalo da je inhibicija kompetitivne prirode,<sup>30</sup> pri čemu se COBE veže na aktivno mjesto HheC. Konstanta inhibicije je aproksimirana na 0,249  $\mu$ M, što je znatno niže od  $K_m$  vrijednosti supstrata (3,545 mM) i ukazuje na izrazito jaku inhibiciju. Budući da spomenuta kaskada predstavlja dosad najvažniju industrijsku primjenu HDDH enzima, sljedeće istraživanje *Chena i sur.* bilo je usmjereno na otkrivanje varijanti enzima sa

smanjenim učinkom inhibicije uz zadržavanje dobrih katalitičkih svojstava.<sup>30</sup> *Schallmeyer i sur.*<sup>31</sup> otkrili su da je HheC-T134A inhibiran supstratima u reakcijama dehalogenacije s 1,3-dikloro-2-propanolom ( $K_i^{DCP} = 8,9$  mM), 1,3-dibromo-2-propanolom ( $K_i^{DBP} = 1,7$  mM), 1-bromo-2,3-propandiolom ( $K_i^{BPP} = 33,3$  mM), 1-kloro-2-propanolom ( $K_i^{CCP} = 32,8$  mM), 1-kloro-2-metil-2-propanolom ( $K_i^{CMP} = 4,9$  mM) i 2-kloro-1-feniletanolom ( $K_i^{CPE} = 8,5$  mM).<sup>31</sup> *Zou i sur.* otkrili su da ECH, produkt dehalogenacije 1,3-DCP, djeluje kao kompetitivni inhibitor ( $K_i^{ECH} = 9$  mM) i time smanjuje produktivnost reakcije.<sup>32</sup> Autori su ponudili *in situ* uklanjanje produkta kao potencijalno rješenje za inhibiciju produktom. *Tang i sur.* pokazali su da je u sintezi *para*-nitro-2-bromo-1-feniletanola (PNSHH) enzim inhibiran supstratom ( $K_i^{PNSHH} = 1$  mM) te produktima, *para*-nitro stiren oksidom (PNSO) i bromidnim ionima ( $K_i^{PNSO} = 0,01$  mM;  $K_i^{HBr} = 1,2$  mM).<sup>33,34</sup> *Lutje Spelberg i sur.* istraživali su na istoj modelnoj reakciji, kataliziranoj divljim tipom HheC, inhibiciju različitim nukleofilima u dehalogenaciji (*R*)-PNSHH.<sup>35</sup> Autori su otkrili da enzim inhibiraju  $I^-$  ( $K_i^{iodid} = 1$  mM),  $Br^-$  ( $K_i^{bromid} = 4,3$  mM),  $Cl^-$  ( $K_i^{klorid} = 13$  mM),  $F^-$  ( $K_i^{fluorid} = 29$  mM),  $N_3^-$  ( $K_i^{azid} = 2,7$  mM),  $NO_2^-$  ( $K_i^{nitrit} = 20$  mM),  $OCN^-$  ( $K_i^{cijanat} = 4,5$  mM),  $SCN^-$  ( $K_i^{tiocijanat} = 30$  mM),  $NO_3^-$  ( $K_i^{nitrat} = 44$  mM) i  $CH_3COO^-$  ( $K_i^{acetat} = 33$  mM). Nažalost, ni u jednom od navedenih istraživanja nisu provedena kinetička ispitivanja inhibicija u reakcijama otvaranja epoksidnog prstena, koje su daleko vrjednije sintetske reakcije s industrijskog gledišta, jer dovode do stvaranja novih C–C, C–S, C–N i C–O veza. Postojanje inhibicija, tj. otkrivanje stvarnog uzroka pada specifične aktivnosti enzima, može se naslutiti iz reakcijskog tijeka, no nemoguće ga je sa sigurnošću odrediti kad su svi reakcijski spojevi prisutni u sustavu.

Na primjer, u preglednom radu o HDDH-kataliziranim reakcijama<sup>11</sup> istaknuto je istraživanje gdje su *An i sur.*<sup>36</sup> pretpostavili postojanje inhibicije produktom, jer nisu postigli zadovoljavajuće iskorištenje na produktu s povećanjem koncentracije supstrata, dok su njihovi podaci zapravo ukazivali na inhibiciju azidnim ionima kao nukleofilima u reakciji otvaranja prstena stiren-oksida. Taj primjer ilustrira da su detaljna kinetička istraživanja, počevši od pojedinačnih reakcijskih spojeva, potrebna za dobivanje dubljih i jednoznačnih informacija o enzimima i reakcijskim ograničenjima.

U kinetičkoj studiji biokatalitičke sinteze (*R*)-2-azido-1-[4-(trifluormetil)fenil]etanola ((*R*)-azido alkohola) kroz azidolizu *rac*-2-[4-(trifluormetil)fenil]oksirana (*rac*-3F-epoksida) kataliziranu varijantom HheC-W249P kinetika enzima opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom ( $V_{m1} = 0,40$  U  $mg^{-1}$ ;  $K_m^{azid} = 2,02$  mM;  $K_m^{(R)-3F-epoksid} = 1,10$  mM), pri čemu je enzim inhibiran supstratom (*R*)-3F-epoksidom ( $K_i^{(R)-3F-epoksid} = 32,86$  mM), suprotnim enantiomerom supstrata (*S*)-3F-epoksidom ( $K_i^{(S)-3F-epoksid} = 2,26$  mM), biokatalitičkim produktom (*R*)-azido alkoholom ( $K_i^{(R)-azido\ alkohol} = 6,14$  mM), hidrolitičkim produktom, *rac*-2-[4-(trifluormetil)fenil]-1,2-etandiolom (*rac*-3F-diol,  $K_i^{rac-3F-diol} = 6,53$  mM) i ko-otapalom DMSO ( $K_i^{DMSO-1} = 373,01$  mM).<sup>28</sup> Drugim riječima, utvrđeno je da je biokatalitička sinteza (*R*)-azido alkohola zahtjevan zadatak zbog prisutnosti inhibicija svim spojevima prisutnim u reakcijskoj smjesi, izuzev azidnih iona.

Sinteza (S)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksiopropanonitrila ((S)-hidroksi nitrila) kroz cijanolizu *rac*-2-(4-fluorofenil) oksirana (*rac*-F-epoksida) kataliziranu HheC-ISM-4 enzimom opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom ( $V_{m2} = 42,21 \text{ U mg}^{-1}$ ;  $K_{m1}^{\text{cijanid}} = 67,74 \text{ mM}$ ;  $K_m^{(R)\text{-F-epoksid}} = 26,70 \text{ mM}$ ), s inhibicijama (R)-F-epoksidom ( $K_{i1}^{(R)\text{-F-epoksid}} = 58,90 \text{ mM}$ ), produktom (S)-hidroksi nitrilom ( $K_i^{(S)\text{-hidroksi nitril}} = 5,11 \text{ mM}$ ), nusproduktom *rac*-F-diolom ( $K_i^{\text{rac-F-diol}} = 73,94 \text{ mM}$ ) i ko-otapalom DMSO ( $K_i^{\text{DMSO-2}} = 1546,7 \text{ mM}$ ).<sup>29</sup> Kako reakcija cijanolize nije potpuno enantioselektivna, kinetika neželjene biokatalitičke reakcije također je određena i opisana dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom ( $V_{m3} = 4,99 \text{ U mg}^{-1}$ ;  $K_{m2}^{\text{cijanid}} = 194,58 \text{ mM}$ ;  $K_m^{(R)\text{-F-epoksid}} = 19,05 \text{ mM}$ ), s prisutnim inhibicijama suprotnim enantiomerom supstrata i ko-otapalom DMSO ( $K_{i2}^{(R)\text{-F-epoksid}} = 1,10 \text{ mM}$ ;  $K_i^{\text{DMSO-2}} = 1546,7 \text{ mM}$ ). Dakle, kinetička istraživanja reakcije sinteze (S)-hidroksi nitrila pokazala su da tu reakciju čine zahtjevnom ne samo brojne inhibicije i hidrolitički raspad supstrata već i njezin ne u potpunosti enantioselektivan karakter.

Kao što je ranije istaknuto, istraživanja o inhibicijama HHDH enzima su rijetka, a do 2020. godine objavljeno je samo sedam radova u kojima su spomenute konstante inhibicije ( $K_i$ ) bilo koje vrste. S obzirom na novije rezultate kojima je utvrđen i kvantificiran vrlo velik broj inhibicija u dvama različitim sustavima cijanolize i azidolize derivata stiren-oksida s varijantama HheC enzima,<sup>28,29</sup> vrlo je izgledno da su inhibicije prisutne i u drugim sintezama kataliziranim HHDH enzimima u literaturi. Vjerojatniji scenarij je da inhibicije jednostavno nisu primijećene zbog uskih raspona koncentracija u kojima su prethodna istraživanja bila provedena. Npr. u novijim istraživanjima<sup>28</sup> koncentracija (R)-3F-epoksida varirana je u rasponu od 0 do 150 mM, pri čemu je inhibicija od strane supstrata vidljiva samo pri koncentracijama iznad 10 mM. Za usporedbu, pri testiranju aktivnosti enzima prema specifičnim supstratima u postojećoj literaturi najčešće se rabe koncentracije između 2 i 5 mM.<sup>37-41</sup>

Čak i uz manjak kinetičkih podataka u prethodno dostupnoj literaturi mogu se povući određene paralele s novijim radovima. Jedan primjer je rad *Wana i sur.*, koji su ispitali HheG-kataliziranu sintezu 4-ariloksazolidinona iz derivata stiren-oksida s različitim supstituentima u *meta*- i *para*-položaju.<sup>42</sup> Naime, autori su proveli testiranje utjecaja početnih uvjeta na ishod biokatalitičke reakcije ( $Y$ ,  $ee$ ) sa stiren-oksidom kao predstavnikom ispitivanih supstrata. Otkrili su da primjena koncentracija supstrata od 5 do 30 mM rezultira iskorištenjima na produktu iznad 75 %, ali pri višim koncentracijama vrijednost znatno pada, pri čemu rezultirajuće iskorištenje iznosi samo oko 50 % s 50 mM stiren-oksida. Autori nisu ponudili moguće objašnjenje za takav pad vrijednosti iskorištenja, već su samo prihvatili činjenicu da sinteza ima prihvatljiv ishod kad se primjenjuju umjerene početne koncentracije supstrata. Uzimajući u obzir sadašnja saznanja o brojnim inhibicijama i prikazane rezultate *Wana i sur.*, inhibicija je vjerojatno objašnjenje u danom slučaju, što bi trebalo potvrditi neovisnim kinetičkim mjerenjima i praćenjem enzimske aktivnosti.<sup>42</sup>

S obzirom na kinetička ograničenja u reakcijama sinteze (R)-azido alkohola i (S)-hidroksi nitrila,<sup>28,29</sup> znatna poboljša-

nja u ishodu reakcije mogu se postići pažljivim odabirom tipa reaktora i početnih uvjeta, pri čemu se minimizira učinak inhibicije i drugih nepovoljnih utjecaja, poput hidrolize supstrata. Tako je, primjerice, u sintezi (R)-azido alkohola simulacijama prikazano da se prinos može poboljšati primjenom repetitivnog šaržnog reaktora, u kojem se supstrat epoksid dodaje u obrocima prema njegovoj potrošnji.<sup>28</sup> Tim pristupom koncentracija enantiomera koji reagira u biokatalitičkoj reakciji održava se unutar područja maksimalne aktivnosti enzima, što omogućuje postizanje iskorištenja na produktu od 95 % uz poboljšanje selektivnosti od 100 % u usporedbi sa šaržnim reaktorom. Slično tomu, pri sintezi (S)-hidroksi nitrila simulacijama je prikazana sinteza u repetitivnom šaržnom reaktoru te u kotlastom reaktoru s dotokom supstrata, što rezultira željenim produktom u koncentracijama od 145 mM, odnosno 75 mM, uz ee vrijednost od 80 %, odnosno 90 %.

Iako se prisutnost inhibicija otkrivenih u nedavnim istraživanjima ne može široko generalizirati za druge HHDH-katalizirane reakcije bez dodatnih kinetičkih istraživanja, ili čak za reakcije katalizirane W249P i ISM-4 enzimima, ti bi rezultati ipak trebali podići svijest o ne samo mogućim već i vrlo vjerojatnim znatnim utjecajima inhibicija na tu vrstu biokatalitičkih sustava.

### 3.2. Istraživanja operacijske stabilnosti HHDH enzima

Osim činjenice da su reakcije u drugim sustavima kataliziranim s HHDH enzimima provedene pri niskim i uskim koncentracijskim rasponima, inhibicije se nisu mogle uočiti ni zato što je mjerena samo količina produkta nastalog nakon određenog vremena. Na taj način nemoguće je zaključiti je li niže iskorištenje na produktu u nekim slučajevima rezultat smanjenog afiniteta enzima prema supstratu, prisutnosti inhibicija od strane supstrata, produkta ili nusprodukta, ili čak brze deaktivacije enzima tijekom reakcije pri ispitivanim uvjetima. Niži enzimski afinitet i aktivnost prema odabranom supstratu ne mogu se razlikovati od negativnih učinaka inhibicija i deaktivacija na temelju jednog eksperimenta za istraživane enzime i supstrate.<sup>11,28,29</sup>

Smanjeno iskorištenje na produktu pri povišenim koncentracijama reakcijskih spojeva često je rezultat inhibicija. Međutim, takvo tumačenje uvijek treba uzeti s oprezom, budući da se smanjenje iskorištenja na produktu pri različitim koncentracijama supstrata također može dogoditi zbog smanjenja operacijske stabilnosti enzima kad je ono ovisno o koncentraciji supstrata.<sup>43,44</sup> Neki enzimi stabilni su jedino kad su izloženi malim organskim molekulama, poput supstrata i produkata, na milimolarnoj ili mikromolarnoj skali koja odgovara koncentracijama koje se inače susreću u njihovom fiziološkom okruženju. Više koncentracije supstrata, koje su obično potrebne za ekonomski isplativu sintezu, mogu dovesti do nepovratnih promjena u prirodnoj strukturi proteina, a posljedično i do deaktivacije enzima. Stoga je tolerancija enzima prema višim koncentracijama supstrata važan parametar pri procjeni primjenjivosti enzima kao katalizatora za sintetske postupke na industrijskoj razini.

Iako operacijska stabilnost predstavlja jedno od najvažnijih primjenskih svojstava biokatalizatora, na tu temu postoje

vrlo ograničeni podaci u postojećoj literaturi o HDDH. Do 2022. niti jedno istraživanje nije uključivalo utjecaj različitih procesnih parametara na operacijsku stabilnost tih enzima. Kao što je objašnjeno u poglavlju 3.1, u većini istraživanja s HDDH inhibicije enzima mogle su proći nezapaženo jer su koncentracije supstrata bile preniske da bi se takvi fenomeni mogli uočiti ili sa sigurnošću utvrditi. Slično tome, potencijalni problemi s operacijskom stabilnošću enzima nisu istraženi, možda zato što su bili zanemarivi ili, vjerojatnije, zato što nisu otkriveni tijekom testiranja enzimske aktivnosti pri koncentracijama supstrata od 1 do 5 mM tijekom provođenja reakcije samo jednom s istom šaržom enzima, odnosno bez višestruke primjene enzima. Osim što utječu na specifičnu aktivnost enzima u reaktoru, tvari u reakcijskoj smjesi također mogu imati negativan utjecaj na operacijsku stabilnost enzima, dovodeći do strukturne degradacije proteina te posljedičnog smanjenja enzimske aktivnosti.<sup>43,44</sup> Zbog toga podatke o nižoj aktivnosti pri većim koncentracijama supstrata, poput ranije opisanog slučaja iz istraživanja Wana i sur.<sup>42</sup>, koji su primijetili smanjenu aktivnost HheC u sintezi 4-ariloksazolidinona pri višim koncentracijama derivata stiren-oksida, treba tumačiti s oprezom.

Smanjenje operacijske stabilnosti može se razlikovati od inhibicijskog učinka provođenjem niza neovisnih mjerenja.<sup>43,45</sup> U nedavnim studijama azidolize i cijanolize otkriveno je da enzimi W249P i ISM-4 gube svoju aktivnost kad se inkubiraju s derivatima stiren-oksida pri višim koncentracijama, dok inkubacija s nukleofilima (CN<sup>-</sup> i N<sub>3</sub><sup>-</sup>) nije imala nikakav mjerljiv učinak na stabilnost enzima.<sup>28,29</sup> Inkubacijska mjerenja uz pojedine reakcijske komponente kad je enzim u "stanju mirovanja", odnosno kad ne izvršava katalitičku funkciju jer u reakcijskoj smjesi nedostaje npr. jedan od supstrata ili kofaktor, pokazala su se u nekim slučajevima kao dobar pokazatelj operacijske stabilnosti enzima.<sup>43</sup> Nadalje, praćenjem aktivnosti enzima u neovisnim mjerenjima tijekom biokatalitičkih sinteza u šaržnom reaktoru konstruirani su profili stabilnosti i procijenjene vrijednosti konstanti deaktivacije enzima ( $k_d$ ). Kao što je predviđeno na temelju inkubacijskih mjerenja u prisutnosti supstrata epoksida a bez nukleofila azida, odnosno cijanida, korelacijom procijenjenih  $k_d$  vrijednosti s početnim koncentracijama epoksida u reaktoru pronađena je hiperbolična ovisnost smanjenja operacijske stabilnosti s povećanjem koncentracije supstrata za oba enzima (W249P, ISM-4).<sup>28,29</sup> To zapravo znači da koncentracija supstrata igra odlučujuću ulogu u operacijskoj stabilnosti tih enzima. Poznavanje ovisnosti konstanti deaktivacije enzima o početnim uvjetima u reaktoru predstavlja iznimno korisnu informaciju jer omogućuje odabir uvjeta i tipova reaktora u kojima se deaktivacija enzima može minimizirati, što je od velike važnosti za primjenu enzima.

Slične ovisnosti uočene su i s drugim vrstama enzima,<sup>43,44</sup> ali to su prva istraživanja takve vrste za HDDH. Rijetka istraživanja koja spominju operacijsku stabilnost HDDH odnose se na imobilizirane biokatalizatore u sintezi ECH iz 1,3-DCP. Na primjer, Zou i sur.<sup>46</sup> izvijestili su o visokoj operacijskoj stabilnosti imobiliziranog divljev tipa HheC u spomenutoj sintezi. U radu su opisali zadržavanje visoke konverzije i iskorištenja na produktu čak i nakon provođenja 50 uzastopnih reakcijskih ciklusa s istom šaržom imobiliziranog enzima, navodeći da je biokatalizator zadržao

impresivno visoku operacijsku stabilnost. U spomenutom slučaju pad operacijske stabilnosti enzima čini se zanemarivim, međutim, ako se uspoređuje samo konačna produktivnost nakon određenog vremena reakcije, moguća deaktivacija enzima također se ne mora uočiti. Zhang i sur.<sup>47</sup> također su proučavali ECH sintezu iz 1,3-DCP s imobiliziranim enzimom HheC-P175S/W249P. Autori su opisali da se iskorištenje na produktu gotovo nije smanjilo u zadnjem ciklusu u odnosu na prvi, ističući izvrsnu operacijsku stabilnost. Međutim, također su izmjerili preostalu aktivnost enzima nakon 45 uzastopnih serija, koja je iznosila oko 80 % početne vrijednosti. To znači da je, iako je ishod reakcije ostao praktički isti, pad operacijske stabilnosti ipak nastupio, ali se nije odrazio na iskorištenje na produktu u promatranom reakcijskom vremenu.

## 4. Zaključak

Istraživanja koja se bave kinetičkim uvidima, inhibicijama i deaktivacijama u sustavima kataliziranim HDDH enzimima od velike su važnosti za proširenje primjenskog potencijala tih enzima. Iako su neki od tih enzima obećavajući sa sintetske točke gledišta kad je riječ o rasponu organskih supstrata i nukleofila koje prihvaćaju te stereoselektivnosti reakcija, kinetičke karakteristike mogu predstavljati ograničenje za daljnju primjenu. Inhibicije supstratima, produktima, nusproduktima i otapalima mogu uvelike smanjiti aktivnost enzima, što negativno utječe na ishod reakcije. Stoga, kad se radi s enzimima iz te skupine, treba uzeti u obzir vjerojatnost prisutnosti sličnih kinetičkih ograničenja, kao onih ovdje razmotrenih te ih karakterizirati u ranoj fazi testiranja novih varijanti enzima. Iako su proučavane inhibicije u specifičnim reakcijama azidolize i cijanolize, rezultati upućuju na to da bi slični fenomeni mogli biti, i najvjerojatnije jesu, prisutni i u drugim reakcijama kataliziranim HDDH. Takva saznanja naglašavaju potrebu za sveobuhvatnim kinetičkim studijama u različitim reakcijskim sustavima da bi se bolje razumjeli negativni učinci te da bi se ublažio njihov utjecaj u sintetskim primjenama što je više moguće. Isto tako, operacijska stabilnost HDDH u reakcijskim uvjetima preduvjet je za njihovu praktičnu primjenu. Jedine sveobuhvatne studije o operacijskoj stabilnosti HDDH pokazale su da visoke koncentracije supstrata dovode do deaktivacije obje varijante enzima, smanjujući ukupnu učinkovitost biokatalitičkih procesa. Detaljna kinetička mjerenja i procjene stabilnosti ključni su koraci u karakterizaciji enzima za širu upotrebu, budući da poznavanje tih ograničenja može dovesti do primjene strategija za smanjenje njihovih učinaka. Poboljšanja se teoretski mogu postići različitim strategijama, na primjer dizajnom reaktora, promjenom reakcijskog medija i imobilizacijom biokatalizatora. Reaktori se mogu projektirati i početni uvjeti odabrati tako da osiguraju kontakt enzima s inhibitorom u koncentraciji u kojoj se učinak inhibicije svodi na minimum. Na primjer, u slučaju inhibicije supstratom u šaržnom reaktoru s dotokom moguće je dozirati supstrat u koncentraciji koja će osiguravati maksimalnu brzinu reakcije. Također, dvofazni sustav mogao bi omogućiti nižu koncentraciju inhibitora otopljenog u vodenoj fazi koja služi kao spremnik enzima, dok bi imobilizacija enzima mogla poboljšati operacijsku stabilnost i omogu-

čiti kontinuirani način rada. Da bi se smanjila potreba za velikim količinama enzima i vremenima trajanja reakcije, koja su često prisutna da bi se prevladale inhibicije i deaktivacije enzima, mogu se primijeniti strategije optimiranja i intenzifikacije procesa, pri čemu je znanje o kinetičkim ograničenjima osnova za njihov razvoj.

### ZAHVALA

Ovaj pregledni rad nastao je na temelju saznanja prikupljenih tijekom projekta podržanog od strane Hrvatske zaklade za znanost (HrZZ, IP-2018-01 4493).

### Popis kratica i simbola

#### List of abbreviations and symbols

BPP	– 1-bromo-2,3-propandiol – 1-bromo-2,3-propandiol
CCP	– 1-kloro-2-propanol – 1-chloro-2-propanol
CMP	– 1-kloro-2-metil-2-propanol – 1-chloro-2-methyl-2-propanol
COBE	– 4-kloroacetoacetat – 4-chloroacetoacetate
CPE	– 2-kloro-1-feniletanol – 2-chloro-1-phenylethanol
DBP	– 1,3-dibromo-2-propanol – 1,3-dibromo-2-propanol
DCP	– 1,3-dikloro-2-propanol – 1,3-dichloro-2-propanol
DMSO	– dimetil sulfoksid – dimethyl sulfoxide
ECH	– epiklorohidrin – epichlorohydrin
ee	– enantiomerni višak – enantiomeric excess
HHDH	– halogenhidrin-dehalogenaza – halohydrin dehalogenase
HheC	– C tip HHDH enzima – C-type of HHDH enzyme
HheC-ISM-4	– termostabilna HheC varijanta – thermostable HheC variant
HheC-W249P	– HheC varijanta s izmijenjenim Trp i Pro aminokiselinama na poziciji 249 – HheC variant with exchanged Trp and Pro amino acids on position 249
HheG	– G tip HHDH enzima – G-type of HHDH enzyme
$k_d$	– konstanta deaktivacije enzima, $\text{min}^{-1}$ – enzyme deactivation constant, $\text{min}^{-1}$
$K_i$	– konstanta inhibicije, mM – inhibition constant, mM
$K_m$	– Michaelisova konstanta, mM – Michaelis constant, mM
PNSHH	– <i>para</i> -nitro-2-bromo-1-feniletanol – <i>para</i> -nitro-2-bromo-1-phenylethanol

PNSO	– <i>para</i> -nitro stiren oksid – <i>para</i> -nitro styrene oxide
<i>rac</i> -3F-epoksid	– <i>rac</i> -2-[4-(trifluorometil)fenil]oksiran – <i>rac</i> -2-[4-(trifluoromethyl)phenyl]oxirane
<i>rac</i> -F-epoksid	– <i>rac</i> -2-(4-fluorofenil)oksiran – <i>rac</i> -2-(4-fluorophenyl)oxirane
(S)-hidroksi nitril	– (S)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksiopropanonitril – (S)-3-(4-fluorophenyl)-3-hydroxypropanonitrile
$V_m$	– maksimalna brzina reakcije, $\text{U mg}^{-1}$ – maximum reaction rate, $\text{U mg}^{-1}$
Y	– iskorištenje, % – yield, %

### Literatura

#### References

1. 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* **1** (2021) 46, doi: <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00044-z>.
2. R. A. Sheldon, D. Brady, Broadening the scope of biocatalysis in sustainable organic synthesis, *ChemSusChem* **12** (2019) 2859–2881, doi: <https://doi.org/10.1002/cssc.201900351>.
3. P. D. de María, G. de Gonzalo, A. R. Alcántara, *Biocatalysis* as useful tool in asymmetric synthesis: an assessment of recently granted patents (2014–2019). *Catalysts* **9** (10) (2019) 802, doi: <https://doi.org/10.3390/catal9100802>.
4. E. T. van Hylckama Vlieg Johan, L. Tang, H. Lutje Spelberg Jeffrey, T. Smilda, J. Poelarends Gerrit, 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, doi: <https://doi.org/10.1128/jb.183.17.5058-5066.2001>.
5. M. Estévez-Gay, J. Iglesias-Fernández, S. Osuna, Conformational landscapes of halohydrin dehalogenases and their accessible active site tunnels, *Catalysts*, **10** (12) (2020) 1403, doi: <https://doi.org/10.3390/catal10121403>.
6. Q. Jiang, R. Fang, I. Gul, L. Aer, Y. Zhao, J. Guo, L. Tang, Halohydrin dehalogenase immobilization in magnetic biochar for sustainable halocarbon biodegradation and biotransformation, *Environ. Technol. Innov.* **27** (2022) 102759, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102759>.
7. C. E. Castro, E. W. Bartnicki, Biodehalogenation. Epoxidation of halohydrins, epoxide opening, and transhalogenation by a Flavobacterium species, *Biochemistry* **7** (1968) 3213–3218, doi: <https://doi.org/10.1021/bi00849a025>.
8. T. Nakamura, T. Nagasawa, Y. Fujio, I. Watanabe, H. Yamada, A new catalytic function of halohydrin hydrogen-halide-lyase, synthesis of  $\beta$ -hydroxynitriles from epoxides and cyanide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180** (1991) 124–130, doi: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)81264-1](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)81264-1).
9. A. Schallmey, M. Schallmey, Recent advances on halohydrin dehalogenases - from enzyme identification to novel biocatalytic applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100** (2016) 7827–7839, doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7750-y>.
10. K. Faber, W. Kroutil, New enzymes for biotransformations, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9** (2005) 181–187, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.01.001>.

11. Z. Findrik 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** (2021) 388–410, doi: <https://doi.org/10.1002/adsc.202000984>.
12. M. Schallmey, J. Koopmeiners, E. Wells, R. Wardenga, A. Schallmey, Expanding the halohydrin dehalogenase enzyme family: identification of novel enzymes by database mining, *Appl. Environ. Microbiol.* **80** (2014) 7303–7315, doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.01985-14>.
13. S. K. Ma, J. Gruber, C. Davis, L. Newman, D. Gray, A. Wang, J. Grate, G. W. Huisman, R. A. Sheldon, A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate, *Green Chem.* **12** (2010) 81–86, doi: <https://doi.org/10.1039/B919115C>.
14. S. Simić, E. Zukić, L. Schmermund, K. Faber, C. K. Winkler, W. Kroutil, Shortening synthetic routes to small molecule active pharmaceutical ingredients employing biocatalytic methods, *Chem. Rev.* **122** (2022) 1052–1126, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00574>.
15. M. Majerić Elenkov, M. Čičak, A. Smolko, A. Knežević, Halohydrin dehalogenase-catalysed transformations of epifluorohydrin, *Tetrahedron Lett.* **59** (2018) 406–408, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.12.054>.
16. D. O'Hagan, Fluorine in health care: Organofluorine containing blockbuster drugs, *J. Fluor. Chem.* **131** (2010) 1071–1081, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2010.03.003>.
17. M. Inoue, Y. Sumii, N. Shibata, Contribution of organofluorine compounds to pharmaceuticals, *ACS Omega* **5** (2020) 10633–10640, doi: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00830>.
18. S. Matsunaga, 5.22 Desymmetrization of meso Epoxide, u E. M. Carreira, H. Yamamoto (ur.) *Comprehensive Chirality*, Elsevier, Amsterdam, 2012., str. 534–580.
19. H. Tanimoto, K. Kakiuchi, Recent applications and developments of organic azides in total synthesis of natural products, *Nat. Prod. Commun.* **8** (7) (2013), doi: <https://doi.org/10.1177/1934578X1300800730>.
20. S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, V. Zimmermann, Organic azides: an exploding diversity of a unique class of compounds, *Angew. Chem. Int. Ed.* **44** (2005) 5188–5240, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.200400657>.
21. O. Bakhanovich, P. Beier, Synthesis, Stability and reactivity of  $\alpha$ -fluorinated azidoalkanes, *Chem. Eur. J.* **26** (2020) 773–782, doi: <https://doi.org/10.1002/chem.201903627>.
22. J. Tomaszewska, K. Koroniak, H. Koroniak, Fluorinated organic azides – their preparation and synthetic application, *ARKIVOC* **2** (2017) 421–432, doi: <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.p009.771>.
23. I. Dokli, N. Milčić, P. Marin, M. S. Miklenić, M. Sudar, L. Tang, Z. Findrik Blažević, M. Majerić Elenkov, Halohydrin dehalogenase-catalysed synthesis of fluorinated aromatic chiral building blocks, *Catal. Commun.* **152** (2021) 106285, doi: <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2021.106285>.
24. J. Koopmeiners, C. Diederich, J. Solarczek, H. Voß, J. Mayer, W. Blankenfeldt, A. Schallmey, HheG, a halohydrin dehalogenase with activity on cyclic epoxides, *ACS Catalysis* **7** (2017) 6877–6886, doi: <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b01854>.
25. H.-H. Wang, N.-W. Wan, R.-P. Miao, C.-L. He, Y.-Z. Chen, Z.-Q. Liu, Y.-G. Zheng, Identification and structure analysis of an unusual halohydrin dehalogenase for highly chemo-, regio- and enantioselective bio-nitration of epoxides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **61** (2022) e202205790, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.202205790>.
26. E. Mehić, L. Hok, Q. Wang, I. Dokli, M. S. Miklenić, Z. Findrik Blažević, L. Tang, R. Vianello, M. Majerić Elenkov, Expanding the scope of enantioselective halohydrin dehalogenases – group B, *Adv. Synth. Catal.* **364** (2022) 2576–2588, doi: <https://doi.org/10.1002/adsc.202200342>.
27. R. Ma, X. Hua, C.-L. He, H.-H. Wang, Z.-X. Wang, B.-D. Cui, W.-Y. Han, Y.-Z. Chen, N.-W. Wan, Biocatalytic thionation of epoxides for enantioselective synthesis of thiiranes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **61** (2022) e202212589, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.202212589>.
28. N. Milčić, M. Sudar, I. Dokli, M. Majerić Elenkov, Z. Findrik Blažević, Halohydrin dehalogenase-catalysed synthesis of enantiopure fluorinated building blocks: bottlenecks found and explained by applying a reaction engineering approach, *React. Chem. Eng.* **8** (2023) 673–686, doi: <https://doi.org/10.1039/D2RE00461E>.
29. N. Milčić, M. Sudar, A.-K. Marić, K. Kos, M. Majerić Elenkov, Z. Findrik Blažević, HHDH-catalyzed synthesis of enantioenriched fluorinated  $\beta$ -hydroxy nitrile - process advances through a reaction engineering approach, *Ind. Eng. Chem. Res.* **63** (2024) 7051–7063, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.4c00477>.
30. S.-Y. Chen, X.-J. He, J.-P. Wu, G. Xu, L.-R. Yang, Identification of halohydrin dehalogenase mutants that resist COBE inhibition, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **19** (2014) 26–32, doi: <https://doi.org/10.1007/s12257-013-0457-3>.
31. M. Schallmey, P. Jekel, L. Tang, M. Majerić Elenkov, H. W. Höffken, B. Hauer, D. B. Janssen, A single point mutation enhances hydroxynitrile synthesis by halohydrin dehalogenase, *Enzyme Microb. Technol.* **70** (2015) 50–57, doi: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.12.009>.
32. S.-P. Zou, Z.-C. Wang, C. Qin, Y.-G. Zheng, Covalent immobilization of *Agrobacterium radiobacter* epoxide hydrolase on ethylenediamine functionalised epoxy supports for biocatalytic synthesis of (R)-epichlorohydrin, *Biotechnol. Lett.* **38** (2016) 1579–1585, doi: <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2135-y>.
33. 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, doi: <https://doi.org/10.1021/bi0273361>.
34. 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, doi: <https://doi.org/10.1021/bi034941a>.
35. 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, doi: [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(02\)00222-7](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(02)00222-7).
36. M. An, W. Liu, X. Zhou, R. Ma, H. Wang, B. Cui, W. Han, N. Wan, Y. Chen, Highly  $\alpha$ -position regioselective ring-opening of epoxides catalyzed by halohydrin dehalogenase from *Ilumatobacter coccineus*: a biocatalytic approach to 2-azido-2-aryl-1-ols, *RSC Adv.* **9** (2019) 16418–16422, doi: <https://doi.org/10.1039/C9RA03774H>.
37. C. Guo, Y. Chen, Y. Zheng, W. Zhang, Y. Tao, J. Feng, L. Tang, Exploring the enantioselective mechanism of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 by iterative saturation mutagenesis, *Appl. Environ. Microbiol.* **81** (2015) 2919–2926, doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.04153-14>.
38. X. Wang, Z. Xie, J. Yan, X. He, W. Liu, Y. Sun, Enhancement of the thermostability of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 by constructing a combinatorial

- smart library, *Int. J. Biol. Macromol.* **130** (2019) 19–23, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.099>.
39. N. Wan, J. Tian, H. Wang, M. Tian, Q. He, R. Ma, B. Cui, W. Han, Y. Chen, Identification and characterization of a highly S-enantioselective halohydrin dehalogenase from *Tsukamurella* sp. 1534 for kinetic resolution of halohydrins, *Bioorg. Chem.* **81** (2018) 529–535, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.09.012>.
  40. A. Mikleušević, I. Primožič, T. Hrenar, B. Salopek-Sondi, L. Tang, M. Majerić Elenkov, Azidolysis of epoxides catalysed by the halohydrin dehalogenase from *Arthrobacter* sp. AD2 and a mutant with enhanced enantioselectivity: an (S)-selective HDDH, *Tetrahedron: Asymmetry* **27** (2016) 930–935, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2016.08.003>.
  41. H.-B. Cui, L.-Z. Xie, N.-W. Wan, Q. He, Z. Li, Y.-Z. Chen, Cascade bio-hydroxylation and dehalogenation for one-pot enantioselective synthesis of optically active  $\beta$ -halohydrins from haloalkanes, *Green Chem.* **21** (2019) 4324–4328, doi: <https://doi.org/10.1039/C9GC01802F>.
  42. N. Wan, J. Tian, X. Zhou, 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.* **361** (2019) 4651–4655, doi: <https://doi.org/10.1002/adsc.201900786>.
  43. M. Česnik, M. Sudar, R. Roldan, K. Hernandez, T. Parella, P. Clapés, S. Charnock, Đ. Vasić-Rački, Z. Findrik Blažević, Model-based optimization of the enzymatic aldol addition of propanal to formaldehyde: A first step towards enzymatic synthesis of 3-hydroxybutyric acid, *Chem. Eng. Res. Des.* **150** (2019) 140–152, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.06.025>.
  44. Đ. Vasić-Rački, J. Bongs, U. Schörken, G. A. Sprenger, A. Liese, Modeling of reaction kinetics for reactor selection in the case of L-erythrulose synthesis, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **25** (2003) 285–290, doi: <https://doi.org/10.1007/s00449-002-0312-y>.
  45. N. Milčić, I. Čevič, M. M. Çakar, M. Sudar, Z. Findrik Blažević, Enzyme reaction engineering as a tool to investigate the potential application of enzyme reaction systems, *Hung. J. Ind. Chem.* **50** (2022) 45–55, doi: <https://doi.org/10.33927/hjic-2022-08>.
  46. S.-P. Zou, K. Gu, Y.-G. Zheng, Covalent immobilization of halohydrin dehalogenase for efficient synthesis of epichlorohydrin in an integrated bioreactor, *Biotechnol. Progress* **34** (2018) 784–792, doi: <https://doi.org/10.1002/btpr.2617>.
  47. X.-J. Zhang, P.-X. Shi, H.-Z. Deng, X.-X. Wang, Z.-Q. Liu, Y.-G. Zheng, Biosynthesis of chiral epichlorohydrin using an immobilized halohydrin dehalogenase in aqueous and non-aqueous phase, *Biores. Technol.* **263** (2018) 483–490, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.027>.

## SUMMARY

### Insights into Application Limitations of Halohydrin Dehalogenases through Kinetic Studies

Nevena Milčić,<sup>a,\*</sup> Martina Sudar,<sup>a</sup> Maja Majerić Elenkov,<sup>b</sup> and Zvezdana Findrik Blažević<sup>a</sup>

Biocatalysis is gaining increasing importance as a scientific discipline in the field of asymmetric synthesis of pharmaceutical compounds and specialised chemicals, and has shown significant progress in industrial applications in recent years. For biocatalytic processes to be successfully developed, optimised, and integrated into industrial synthesis, they must be examined from multiple perspectives, e.g., from protein engineering for the design of new enzymes, through organic chemistry in planning synthetic pathways, to reaction engineering for process design and optimisation. This paper focuses specifically on halohydrin dehalogenases (HDDHs), a group of enzymes with great potential that, despite their promise, remain insufficiently explored. HDDHs catalyse the ring-opening reactions of epoxides in the presence of various nucleophiles, leading to the formation of new C–C, C–O, C–S, and C–N bonds, and the synthesis of  $\beta$ -substituted alcohols. This property makes HDDHs valuable enzymes for the production of important compounds such as drugs, agrochemicals, and fine chemicals. Despite the justified significant interest shown by the scientific and industrial community toward this group of enzymes, which has consequently led to the implementation of HDDH-catalysed reactions in pharmaceutical production, the kinetic characteristics of this group remain largely unknown. Challenges such as various enzyme inhibitions and decreased operational stability under synthetically relevant conditions are still poorly explored. Since addressing these issues through detailed kinetic studies is crucial for expanding the practical applications of HDDH in synthetic processes, this review paper is conceived as a discussion of recent and relevant research on the kinetic characteristics and limitations of this group of enzymes, collected over several years of practical experience and laboratory work with HheC from *Agrobacterium radiobacter* and its variants, primarily in the synthesis of fluorinated  $\beta$ -azido alcohols and  $\beta$ -hydroxy nitriles.

#### Keywords

Halohydrin dehalogenases, HDDH, enzyme kinetics, enzyme inhibitions, operational stability of enzymes

<sup>a</sup> University of Zagreb Faculty of Chemical Engineering and Technology, Trg Marka Marulića 19, 10 000 Zagreb, Croatia

<sup>b</sup> Ruder Bošković Institute, Bijenička 54, 10 000 Zagreb, Croatia

Review

Received July 28, 2025

Accepted September 10, 2025