

(Bio)sinteza šikiminske kiseline

Grgurić, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:770493>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Dora Grgurić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

(BIO)SINTEZA ŠIKIMINSKE KISELINE

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Zagreb, 2020.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

10. srpnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD	1
1.1. Kratki povijesni pregled	1
1.2. Važnost šikiminske kiseline	2
§ 2. (BIO)SINTEZA ŠIKIMINSKE KISELINE.....	3
2.1. Put šikiminske kiseline.....	3
2.1.1. Reakcije puta šikiminske kiseline.....	3
2.1.2. Sinteza 3-deoksi-D-arabinoheptulozamat-7-fosfata (DAHP)	5
2.1.3. Sinteza 3-dehidrokinata.....	6
2.1.4. Dehidratiranje 3-dehidrokinata.....	8
2.1.5. Redukcija 3-dehidrošikimata.....	9
2.1.6. Fosforilacija šikimata	9
2.1.7. Sinteza 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfata (EPSP).....	11
2.1.8. Sinteza korizmata.....	11
2.2. Biosinteza aromatskih aminokiselina	12
2.2.1. Biosinteza L-triptofana	12
2.2.2. Biosinteza L-fenilalanina i L-tirozina	15
2.3. Laboratorijska sinteza šikiminske kiseline	17
2.3.1. Sinteza racemata šikiminske kiseline temeljena na Diels-Alderovoj reakciji.....	17
2.3.2. Sinteza (-)-šikiminske kiseline temeljena na Diels-Alderovoj reakciji.....	20
2.3.3. Sinteza (-)-šikiminske kiseline iz ugljikohidrata.....	21
2.4. Današnja proizvodnja šikiminske kiseline	24
2.4.1. Upotreba šikiminske kiseline.....	24
2.5. Popis kratica.....	26
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXVII

§ Sažetak

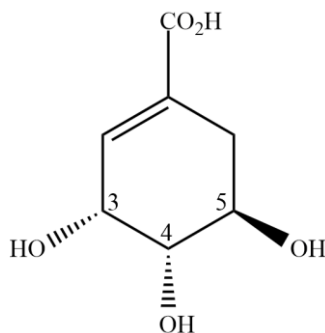
Šikiminska kiselina ((3*R*, 4*S*, 5*R*)-3,4,5-trihidroksicikloheks-1-enkarboksilna kiselina) glavni je prekursor za biosintezu aromatskih spojeva kod biljaka i mikroorganizama s naglaskom na aromatske aminokiseline, L-tirozin, L-triptofan i L-fenilalanin. Biosintetski put koji vodi od glukoze do navedenih aminokiselina zove se put šikiminske kiseline. Kako se on odvija isključivo kod biljaka i mikroorganizama, ostali organizmi ovisni su o unosu aromatskih aminokiselina prehranom. Konkretno, kod ljudi osim ove tri aromatske aminokiseline još je nekoliko aminokiselina koje moramo unositi hranom jer ih ne možemo sami sintetizirati zbog čega ih se naziva esencijalnim aminokiselinama.

U ovome radu detaljno je proučen put šikiminske kiseline, njegova važnost, regulacija i mehanizmi svakog pojedinog koraka puta. Također, navedeno je kako je poznavanje ovog biosintetskog puta pridonijelo znanstvenim otkrićima korištenim u svakodnevnom životu. Zbog važnosti šikiminske kiseline istraženi su i postupci laboratorijske sinteze šikiminske kiseline u racemičnom i enantiomerno čistom obliku. U konačnici, cilj je navesti uobičajeni način na koji se šikiminska kiselina dobiva u današnje vrijeme i koju ulogu ima kao sirovi produkt.

§ 1. UVOD

1.1. Kratki povijesni pregled

Šikiminsku kiselinu (slika 1) izolirao je prvi puta Johann Frederik Eijkman 1885. godine iz biljne vrste *Illicium regiosum*. Japanski naziv te biljne vrste je *shikimi-no-ki* te je po njoj kiselina dobila ime.¹ Eijkman je izoliranu tvar opisao kao trihidroksicikloheksenkarboksilnu kiselinu, no relativna i apsolutna stereokemija određena je tek 1930-ih zaslugom Emila Fishera, Karla Freudenbergera i Paula Karrera. Uloga šikiminske kiseline nije bila poznata sve do 1950-ih kada je B. D. Davis uočio da mutirani soj bakterija *Escherichia coli* i *Aerobacter aerogenes* kojima je za rast neophodno pet aromatskih spojeva (*p*-aminobenzojeva kiselina i *p*-hidroksibenzojeva kiselina te aromatske aminokiseline: L-tirozin, L-triptofan i L-fenilalanin) nakupljaju šikiminsku kiselinu. Zaključio je kako je ona neophodna kao prekursor za biosintezu svakog od pet navedenih aromatskih spojeva. Daljnim istraživanjima B. D. Davis, D. B. Springson i F. Gibson definirali su osam međuprodukata u ciklusu koji vodi od glukoze preko šikiminske kiseline do korizmatske kiseline, a danas je poznat kao put šikiminske kiseline.¹



Slika 1. Strukturna formula molekule šikiminske kiseline

Molekula šikiminske kiseline ima tri kiralna ugljikova atoma: C₃, C₄ i C₅. To znači da postoji osam različitih stereoizomera iste, no samo se (3*R*, 4*S*, 5*R*)-3,4,5-trihidroksicikloheksen-1-enkarboksilna kiselina smatra šikiminskom kiselinom. Stereokontrola prilikom biosinteze nije problematična zbog sudjelovanja enzima koji su i sami kiralne molekule, no mogla bi predstavljati dodatnu komplikaciju prilikom organske sinteze u laboratoriju.

1.2. Važnost šikiminske kiseline

Kao što je ranije navedeno, šikiminska kiselina glavni je prekursor za biosintezu aromatskih spojeva kod biljaka i mikroorganizama s naglaskom na aromatske aminokiseline, L-tirozin, L-triptofan i L-fenilalanin. Metabolički put koji vodi od glukoze preko šikiminske kiseline do korizmata dobio je ime put šikiminske kiseline što dodatno naglašava njenu važnost. Osim putem šikiminske kiseline, biljke i mikroorganizmi aromatske spojeve mogu sintetizirati acetatnim putem (acilpolimalonatnim putem) kojem je osnova acetat.³ Važnost puta šikiminske kiseline upravo leži u činjenici da je njegovo odvijanje ograničeno na biljke i mikroorganizme odnosno biosinteza šikiminske kiseline *in vivo* u životinjskoj stanici nije moguća. Sukladno tome, svi organizmi koji se nalaze iznad biljaka i mikroorganizama u hranidbenom lancu aromatske aminokiseline moraju unijeti prehranom. Za ljude se one smatraju jednim od esencijalnih aminokiselina koje, za razliku od neesencijalnih aminokiselina moraju unijeti prehranom jer ih nisu u mogućnosti samostalno sintetizirati.

Kod biljaka su aromatske aminokiseline, osim za izgradnju proteina, također i prekursori za sintezu niza sekundarnih metabolita koji su potrebni za rast biljaka.⁷ Ti spojevi nazivaju se fenolni spojevi te po definiciji imaju bar jednu aromatsku jezgru na koju je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. U procesu regulacije rasta biljaka djeluju kao kemijski glasnici ili unutarnji fiziološki regulatori.⁸

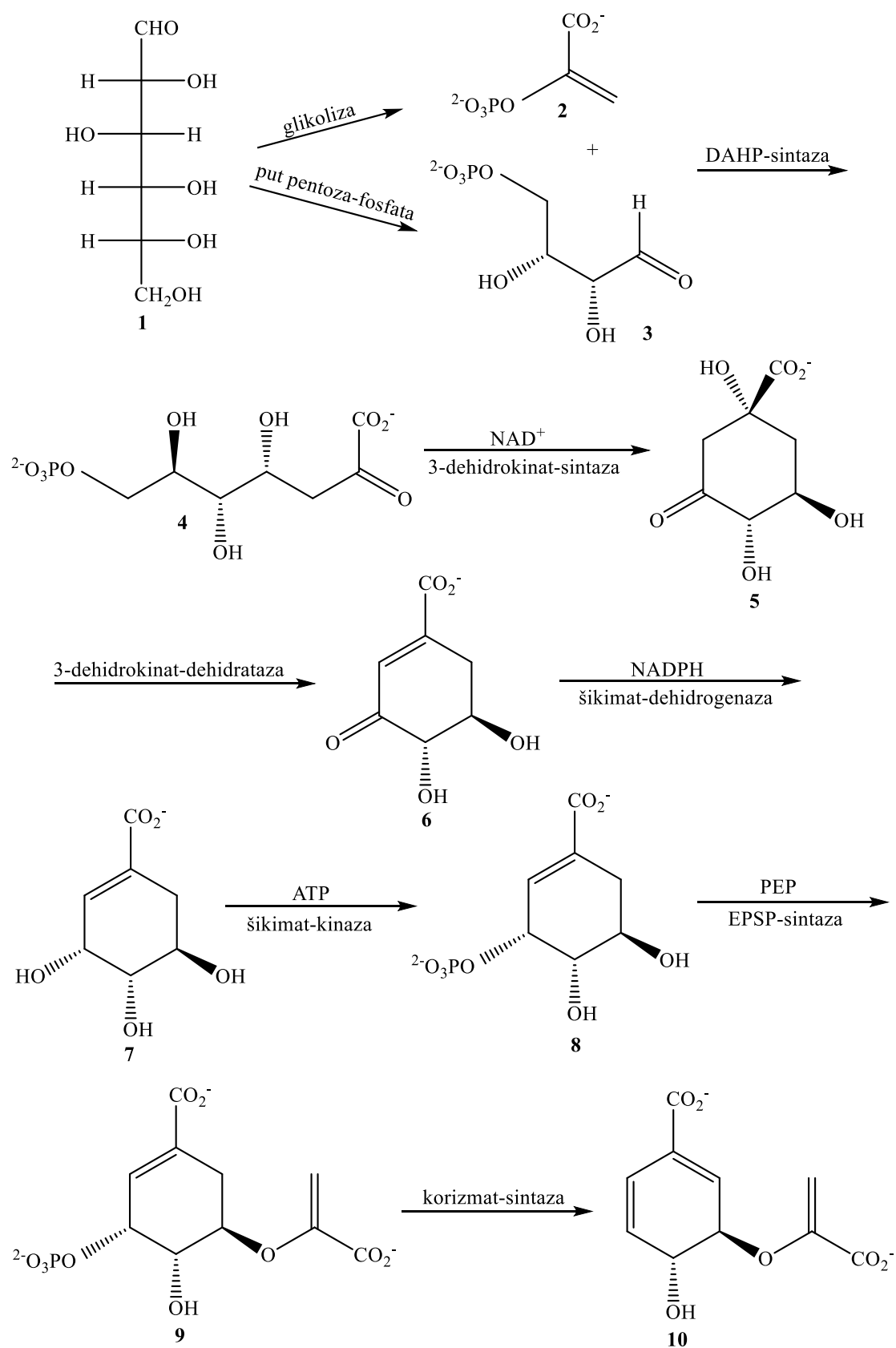
Također, razumijevanje puta šikiminske kiseline otvara mogućnost sinteze specifičnih inhibitora. Takvi se inhibitori mogu selektivno vezati za određeni enzim puta šikiminske kiseline i djelovati kao antibiotici ili herbicidi bez štetnog utjecaja na okoliš. Upravo je komercijalno dostupan herbicid Roundup® primjer takvog inhibitora. Njegov aktivni sastojak glifozat (*N*-fosfometil-glicin) inhibira enzim koji sudjeluje u dobivanju jednog od međuprodukata ovog puta, konkretno 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfata.^{2, 17}

§ 2. (BIO)SINTEZA ŠIKIMINSKE KISELINE

2.1. Put šikiminske kiseline

2.1.1. Reakcije puta šikiminske kiseline

Put šikiminske kiseline (slika 2) kreće od molekule glukoze (**1**). Glukoza se razgrađuje pomoću dva međusobno neovisna metabolička puta. Put pentoza-fosfata generira D-eritrozu-4-fosfat **3**, dok glikoliza daje fosfoenolpiruvat (PEP, **2**). Idući korak odvija se djelovanjem enzima DAHP-sintaze koja katalizira nastajanje 3-deoksi-D-arabinoheptulozanat-7-fosfata (DAHP, **4**) i fosfata iz fosfoenolpiruvata **2**, D-eritroze-4-fosfata **3** i molekule vode. Na DAHP **4** djeluje 3-dehidrokinat-sintaza koja uz pomoć NAD^+ daje 3-dehidrokinat **5** i fosfat. Dehidratiranjem 3-dehidrokinata **5** pomoću 3-dehidrokinat-dehidrataze nastaje 3-dehidrošikimat **6** i voda. Šikimat **7** nastaje redukcijom 3-dehidrošikimata **6** pomoću NADPH kataliziranom enzimom šikimat-dehidrogenaze. Fosforiliranjem šikimata **7** pomoću molekule ATP kataliziranim šikimat-kinazom nastaje šikimat-3-fosfat **8**. Fosfoenolpiruvat **2** u reakciji sa šikimat-3-fosfatom **8** kataliziranoj EPSP-sintazom daje 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat (EPSP, **9**) kao produkt. Posljedni korak u putu šikiminske kiseline je pretvorba EPSP **9** u korizmat **10** katalizirana korizmat-sintazom.

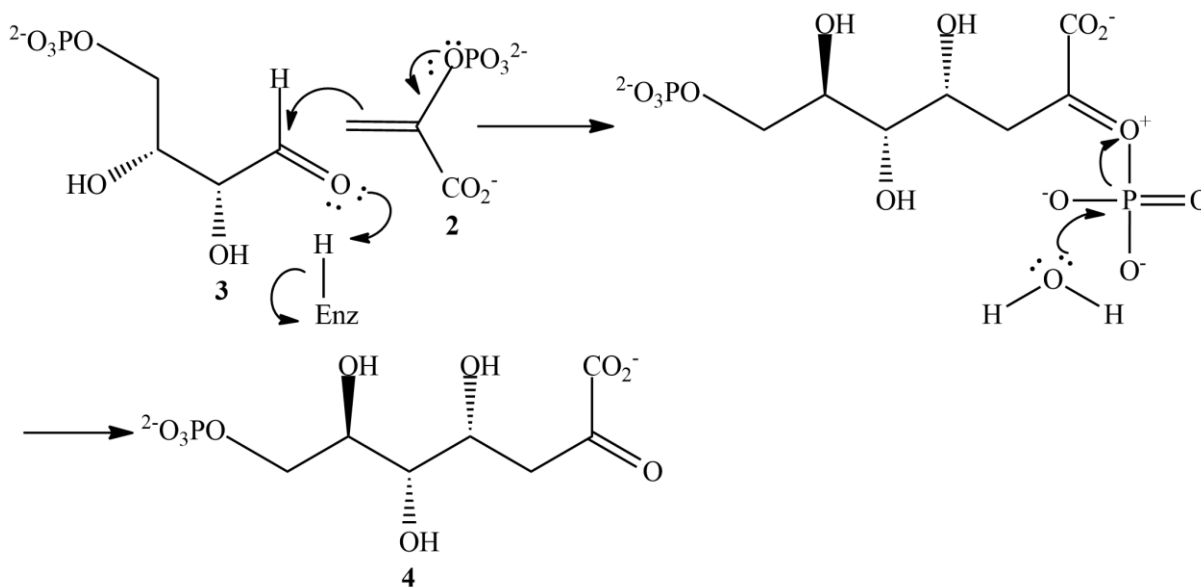


Slika 2. Shematski prikaz puta šikiminske kiseline¹

2.1.2. Sinteza 3-deoksi-D-arabinoheptulozarat-7-fosfata (DAHP)

U prvoj reakciji puta šikiminske kiseline dolazi do aldolne kondenzacije između fosfoenolpiruvata **2** i D-eritroza-4-fosfata **3** kojom nastaje DAHP **4**. Riječ je o reakciji nukleofilne adicije u kojoj fosfoenolpiruvat **2** ima ulogu nukleofila te napada karbonilni ugljikov atom molekule D-eritroza-4-fosfata **3** (slika 3). Nakon što karbonilna skupina D-eritroza-4-fosfata **3** oduzme proton enzimu, njenim protoniranjem povećava se elektrofilnost karbonilnog atoma ugljika i dolazi do kondenzacije nakon čega slijedi hidroliza fosfata čime nastaje DAHP **4**.

Navedeni reakcijski mehanizam primjer je aldolne kondenzacije katalizirane kiselinom, no aldolna kondenzacija također može biti katalizirana bazom. U prisutnosti baze nukleofil je enolatni anion dok je u kiselim uvjetima nukleofil enol. Nakon kondenzacije u kojoj nastaju β -hidroksikarbonilni spojevi vrlo često dolazi do eliminacije hidroksilne skupine na C_β atomu pri čemu nastaje stabilan sustav konjugiranih dvostrukih veza, α,β -nazasićeni karbonilni spoj. Kako bi se vjerojatnost eliminacije smanjila, potrebno je koristiti blage uvjete poput slabe kiseline i izbjegavati povišene temperature koje obično pogoduju eliminaciji.



Slika 3. Shematski prikaz mehanizma sinteze DAHP aldolnom kondenzacijom iz fosfoenolpiruvata i D-eritroza-4-fosfata kataliziranom DAHP-sintazom⁵

Ovaj reakcijski korak ključan je pri proučavanju regulacije puta šikiminske kiseline. Kod bioloških sustava regulacija je vrlo često usmjerena na inhibiciju enzima prvog reakcijskog koraka, u ovom slučaju DAHP-sintaze. Na taj način ne dolazi do nepotrebne potrošnje energije i supstrata tijekom ostatka reakcijskog puta. Najčešći mehanizam inhibicije kojim se to postiže je inhibicija povratnom spregom. Ona funkcionira na način da konačni produkti određenog biosintetskog puta inhibiraju enzim prvog koraka tog istog puta. Inhibicija DAHP-sintaze mehanizmom povratne sprege proučavana je zasebno kod mikroorganizama i biljnih vrsta te su uočene značajne razlike.

Izolacijom DAHP-sintaze iz raznih mikroorganizama uočeno je da određeni mikroorganizmi poput *Bacillus subtilis* i ostalih sojeva *Bacillus* imaju prisutan jedan izozim DAHP-sintaze, dok se kod *Saccharomyces cerevisiae* javljaju dva izozima, a kod *Escherichie coli* izolirana su tri izozima DAHP-sintaze. Kasnijim istraživanjima ustanovljeno je da većina mikroorganizama posjeduje tri izozima DAHP-sintaze. Izozimi *Escherichie coli* dobili su nazive DAHP-sintaza (phe), DAHP-sintaza (trp) te DAHP-sintaza (tyr) s obzirom na aminokiselinu koja ih inhibira. Tako L-fenilalanin inhibira DAHP-sintazu (phe) mehanizmom povratne sprege, dok L-tirozin na jednak način inhibira DAHP-sintazu (tyr). Kod inhibicije DAHP-sinteze (trp) ne radi se o mehanizmu povratne sprege pomoću L-triptofana, već se radi o represiji biosinteze DAHP-sintaze (trp) pod utjecajem L-triptofana. U slučaju *Bacillus subtilis* i ostalih sojeva *Bacillus* koje imaju jedan izozim, dolazi do inhibicije povratnom spregom pomoću korizmatske ili prefnatne kiseline. Njihova biosinteza je pak regulirana pomoću L-triptofana, L-tirozina i L-fenilalanina.¹⁹

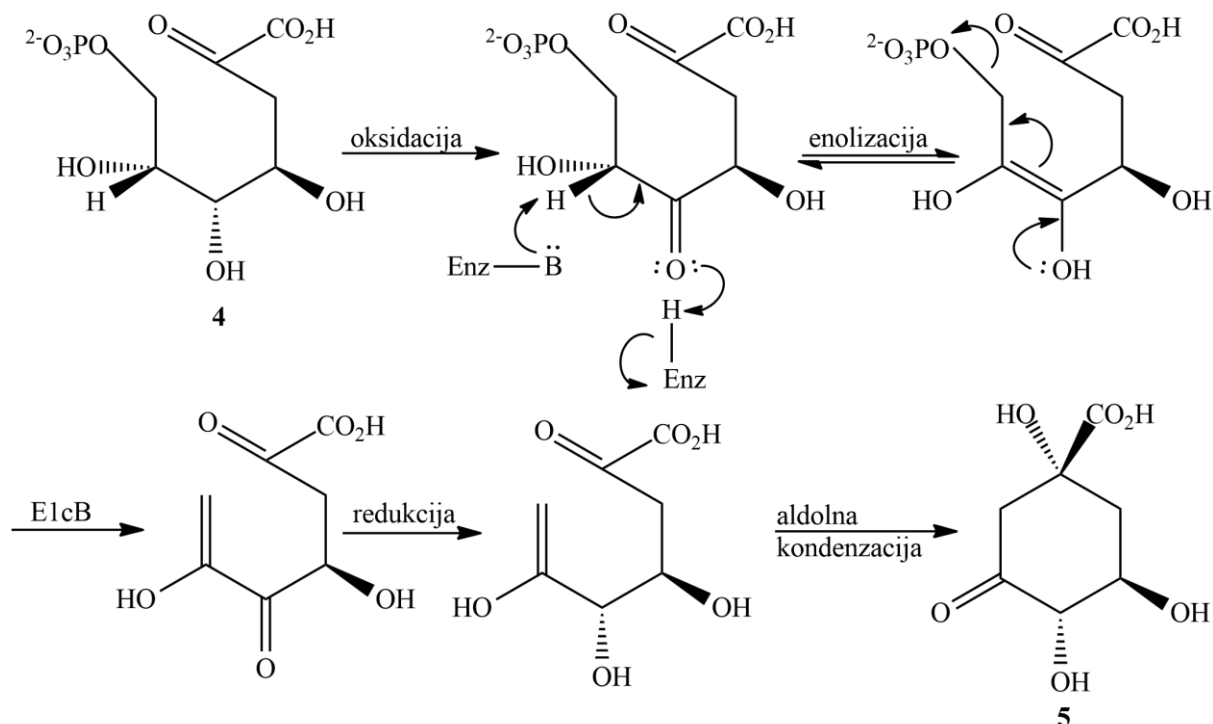
Za razliku od mikroorganizama, kod DAHP-sintaze biljnih vrsta, točnije one izolirane iz cvjetova cvjetače, nije uočen mehanizam regulacije povratnom spregom djelovanjem aromatskih aminokiselina. No, uočena je sličnost između DAHP-sintaze mikroorganizama i biljnih vrsta vezana uz njihovu aktivnost. Naime, sintaza izolirana iz mikroorganizama kao i ona izolirana iz biljnih vrsta pokazuje potrebu za dvovalentnim kationima poput Mn^{2+} i Co^{2+} za vlastitu aktivnost.²⁰

2.1.3. Sinteza 3-dehidrokinata

Drugi korak puta šikiminske kiseline, sinteza 3-dehidrokinata **5** iz DAHP-a **4** važan je jer je struktura navedenog produkta ovog koraka vrlo slična šikiminskoj kiselini. Točnije, ovim korakom nastaje cikloheksanski prsten koji u konačnici gradi molekulu šikiminske kiseline. U

suštini se radi o reakcijskom mehanizmu unutarmolekulske aldolne kondenzacije (slika 4). Prvo dolazi do oksidacije hidroksilne skupine na C₅ atomu DAHP-a **4** pomoću NAD⁺. U konvencionalnim uvjetima moglo bi doći do oksidacije sve tri hidroksilne skupine DAHP-a što bi stvaralo dodatne poteškoće. Ovom oksidacijom proton koji se nalazi na C₆ atomu postaje značajno kiselijši što omogućuje njegovo uklanjanje bazom, konkretno enzimom 3-dehidrokinat-sintazom, pri čemu dolazi do enolizacije.⁵ Isti proces u konvencionalnim uvjetima može biti i kiselo i bazno kataliziran, i premda u ravnotežnoj smjesi uglavnom prevladava keto-oblik, već mala količina enolnog oblika u smjesi osigurava napredovanje reakcije. Nakon enolizacije slijedi izlazak fosfatne skupine čime nastaje konjugirani sustav dvostrukih veza. Kako do eliminacije fosfata dolazi tek nakon uklanjanja protona koji se nalazi na C₆ atomu i nastanka konjugirane baze čiji je negativan naboj stabiliziran konjugacijom pomoću karbonilne skupine, riječ je o E1cB mehanizmu eliminacije. Nakon eliminacije slijedi redukcija keto-skupine na C₅ atomu pomoću NADPH. Najpoznatiji reducensi koji se koriste za redukciju karbonila u organskoj sintezi su iz skupine kompleksnih metalnih hidrida, poput litijeva aluminijhidrida (LiAlH₄) ili natrijeva borhidrida (NaBH₄). Hidrid je reducens i u biološkim uvjetima samo što su izvori hidrida NADH i NADPH, s tim da se NADPH većinom koristi u anaboličkim reakcijama jer je jači reducens od NADH. U konačnici dolazi do unutarmolekulske aldolne kondenzacije kojom nastaje 3-dehidrokinat **5**. Mehanizam aldolne kondenzacije analogan je onomu na slici 3 gdje nastaje DAHP, a glavna razlika između ove dvije reakcije je ta što je unutarmolekulska aldolna kondenzacija brža od međumolekulske.

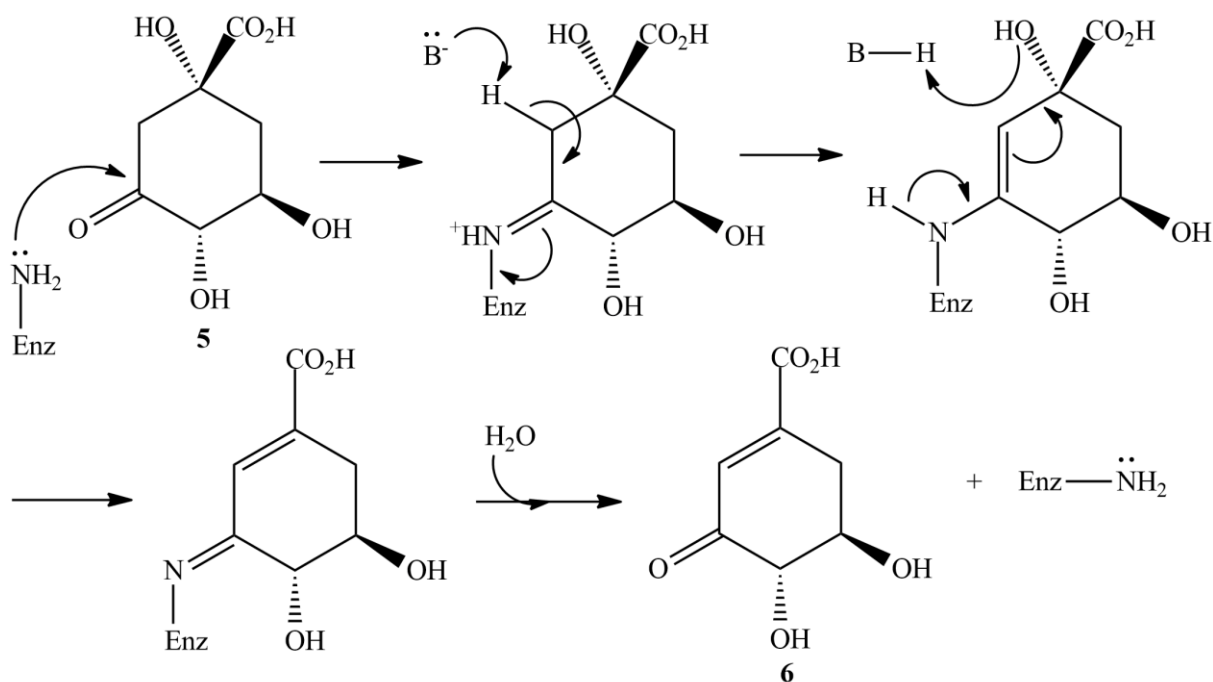
Enzim koji katalizira ovaj korak puta šikiminske kiseline, 3-dehidrokinat-sintaza ima vezane NAD⁺ i Co²⁺ kao kofaktore ključne za njegovu aktivnost.⁶



Slika 4. Shematski prikaz mehanizma sinteze 3-dehidrokinata iz DAHP-a katalizirane 3-dehidrokinat-sintazom⁵

2.1.4. Dehidratiranje 3-dehidrokinata

Nakon dobivanja 3-dehidrokinata **5** slijedi eliminacija vode katalizirana enzimom 3-dehidrokinat-dehidratazom. Taj je enzim dio bifunkcionalnog enzima 3-dehidrokinat-dehidrataza/šikimat-dehidrogenaza.⁶ Katalitički mehanizam dehidratiranja temelji se na nastajanju Schiffove baze između amino-skupine bočnog ogranka lizina (Lys-241) 3-dehidrokinat-dehidrataze i keto-skupine 3-dehidrokinata **5** (slika 5). Riječ je o reakciji nukleofilne adicije u kojoj je nukleofil atom dušika amino-skupine nakon koje slijedi dehidratiranje. Navedeni se mehanizam javlja kod biljaka i mikroorganizma koje posjeduju tip 1 3-dehidrokinat-dehidrataze. Uz tip 1, gljive imaju i tip 2 3-dehidrokinat-dehidrataze koji je, za razliku od tipa 1, stabilan pri višim temperaturama.



Slika 5. Shematski prikaz mehanizma dehidriranja 3-dehidrokinata u 3-dehidrošikimat preko Schiffove baze kataliziranog 3-dehidrokinat-dehidratazom¹²

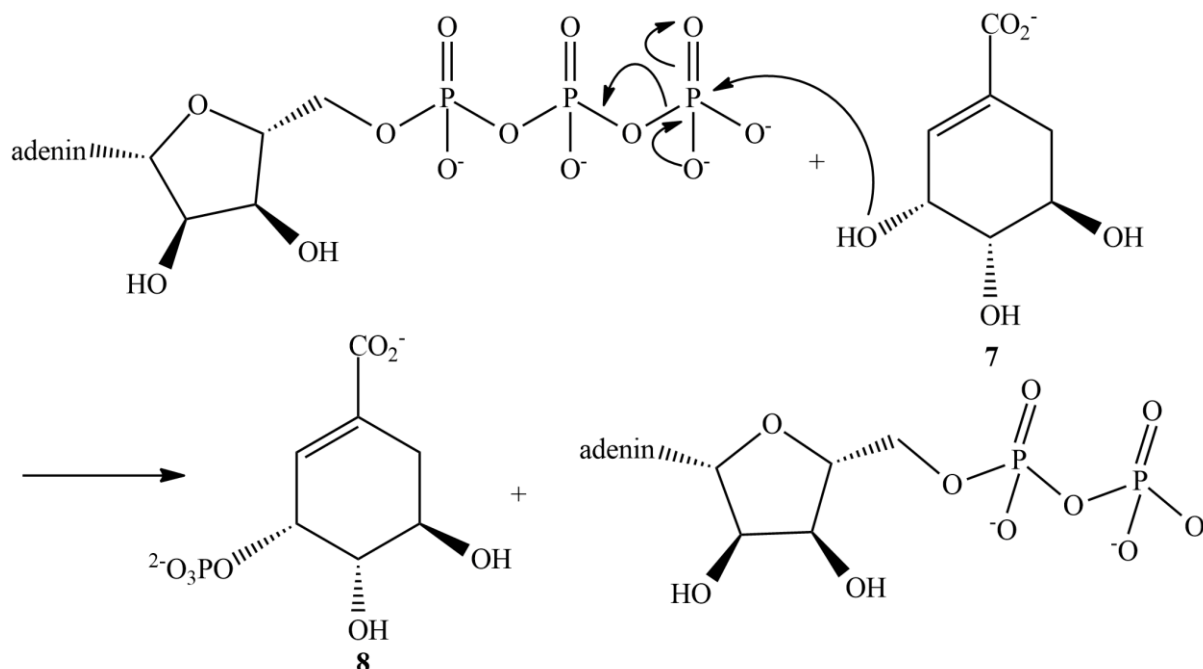
2.1.5. Redukcija 3-dehidrošikimata

Drugi dio bifunkcionalnog enzima 3-dehidrokinat-dehidrataza/šikimat-dehidrogenaza katalizira četvrti korak puta šikiminske kiseline, odnosno sintezu šikimata **7** iz 3-dehidrošikimata **6**. Radi se o reakciji redukcije keto-skupine na C₅ atomu 3-dehidrošikimata **6** pomoću NADPH kao kofaktora (slika 2).

2.1.6. Fosforilacija šikimata

U petom koraku puta šikiminske kiseline dolazi do stereoselektivne fosforilacije šikimata **7** ATP-om koju katalizira enzim šikimat-kinaza. Hidroksilna skupina vezana na C₅ atom šikimata **7** nukleofilno napada α -fosfatnu skupinu ATP-a (slika 6). Ovom reakcijom esterifikacije, odnosno nukleofilne supstitucije, uz ADP kao izlaznu skupinu u konačnici nastaje šikimat-3-fosfat **8** kao produkt. Reakcija bi u konvencionalnim uvjetima vjerojatno predstavljala izazov jer bi se moglo očekivati da bi reagirale i druge hidroksilne skupine prisutne u molekuli. Na ovom primjeru dolazi do izražaja svojstvo enzima da imaju sposobnost specifičnog vezanja supstrata čime je osigurana regioselektivnost reakcije. Kako bi moglo uopće doći do reakcije, u aktivnom mjestu enzima moraju se ostvariti točno određene međumolekulske interakcije

između enzima i supstrata. Ovo svojstvo enzima često se objašnjava na principu „ključa i brave“. Supstrat mora doći u optimalnu orijentaciju, a time je vjerojatnost nastajanja nepoželjnih nusprodukata svedena na minimum.



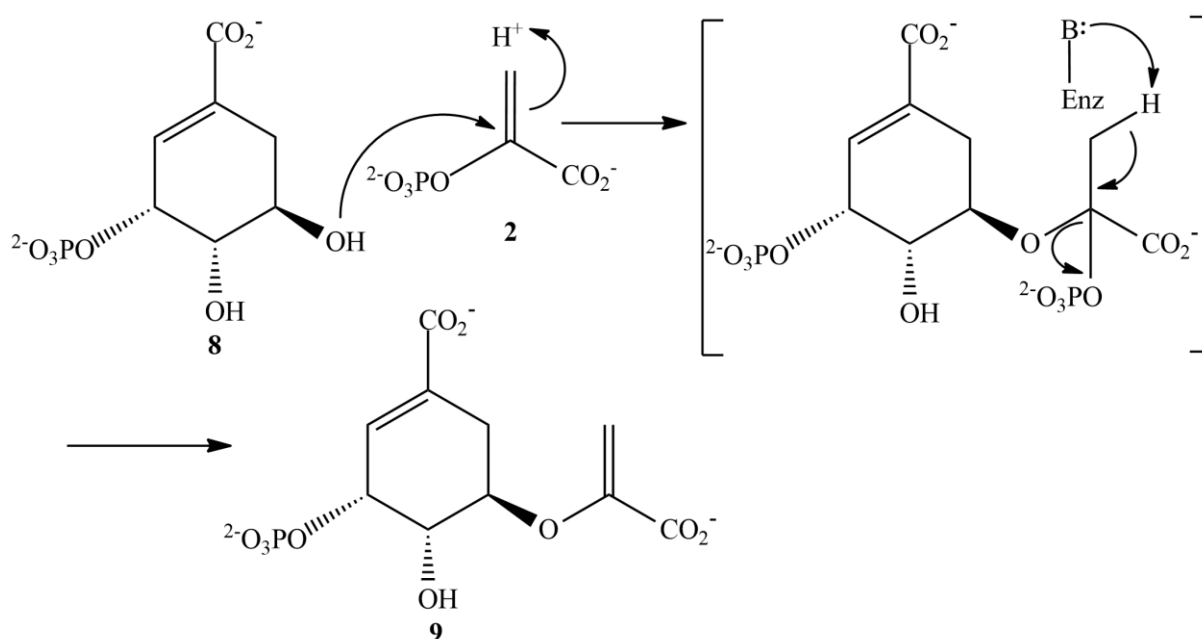
Slika 6. Shematski prikaz mehanizma fosforilacije šikimata u šikimat-3-fosfat pomoću ATP-a katalizirane šikimat-kinazom⁶

Kod proučavanja regulacije navedenog reakcijskog koraka u slučaju mikroorganizama, važno je spomenuti šikimat-kinazu izoliranu iz *Bacillus subtilis*. Nalazi se u sklopu trifunkcionalnog enzimskog kompleksa zajedno s DAHP-sintazom i korizmat-mutazom koja katalizira jednu od reakcija pri biosintezi L-fenilalanina i L-tirozina iz korizmata, što će biti naknadno obrađeno. Inhibicija navedenog enzimskog kompleksa još je jedan primjer inhibicije mehanizmom povratne sprege. Inhibitori su u ovom slučaju korizmatska kiselina, prefenatna kiselina, ADP i produkt navedenog reakcijskog koraka, šikimat-3-fosfat.²⁰ Kao što je ranije navedeno, biosinteza korizmatske i prefenatne kiseline regulirana je pomoću L-triptofana, L-tirozina i L-fenilalanina. U biološkim sustavima regulacija biosintetskih puteva često je povezana s omjerom koncentracija ATP-a i ADP-a/AMP-a u stanici. Visoka koncentracija ATP-a u stanici znak je da ima višak raspoložive energije, dok je visoka koncentracija ADP-a/AMP-a u stanici znak da ima manjak raspoložive energije. Kako je ADP/AMP produkt defosforilacije ATP-a, njihove koncentracije u stanici međusobno su ovisne. Za pretvorbu

šikimata u šikimat-3-fosfat potreban je ATP. Ako je u stanici prisutan manjak ATP-a, bit će povećana koncentracija ADP-a koji će pritom inhibirati šikimat-kinazu i spriječiti nastanak šikimat-3-fosfata. Time je ATP dostupan stanici sačuvan za važnije metaboličke puteve.

2.1.7. Sinteza 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfata (EPSP)

Dobiveni šikimat-3-fosfat **8** sudjeluje u reakciji kondenzacije u šestom koraku puta šikiminske kiseline. Do kondenzacije dolazi između šikimat-3-fosfata **8** i fosfoenolpiruvata **2**, a reakciju katalizira enzim EPSP sintaza. Mehanizam kreće nukleofilnim napadom atoma kisika hidroksilne skupine na C₅ položaju šikimat-3-fosfata **8** na fosfoenolpiruvat **2** (slika 7). Nastaje međuprodukt kojemu enzim u ulozi baze oduzima proton što je praćeno izlaskom fosfatne skupine. U konačnici nastaje 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat **9** (EPSP).

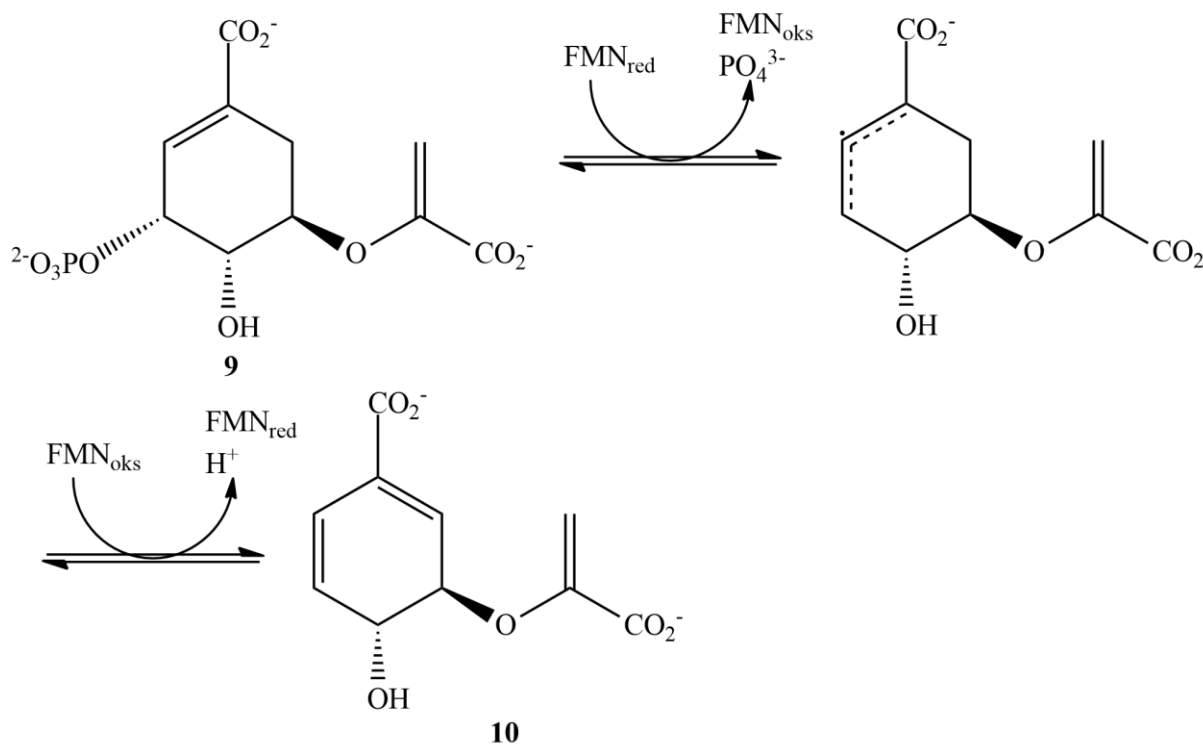


Slika 7. Shematski prikaz mehanizma sinteze 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfata (EPSP) kondenzacijom fosfoenolpiruvata i šikimat-3-fosfata kataliziranom EPSP-sintazom¹³

2.1.8. Sinteza korizmata

U sedmom i posljednom koraku puta šikiminske kiseline dolazi do sinteze korizmata **10** iz EPSP-a **9**. Sintezu katalizira korizmat-sintaza koja koristi reducirani oblik flavin-mononukleotida (FMNH₂) kao kofaktor. FMNH₂ služi za reverzibilni prijenos elektrona s EPSP-a **9** na radikalski međuprodukt koji nastaje prilikom eliminacije fosfata (slika 8). Postojanje

radikalskog međuprodukta potvrđeno je spektroskopskim tehnikama i kinetičkim izotopnim efektom.^{10, 11}



Slika 8. Shematski prikaz radikalskog mehanizma sinteze korizmata iz ESPS-a katalizirane korizmat-sintazom⁶

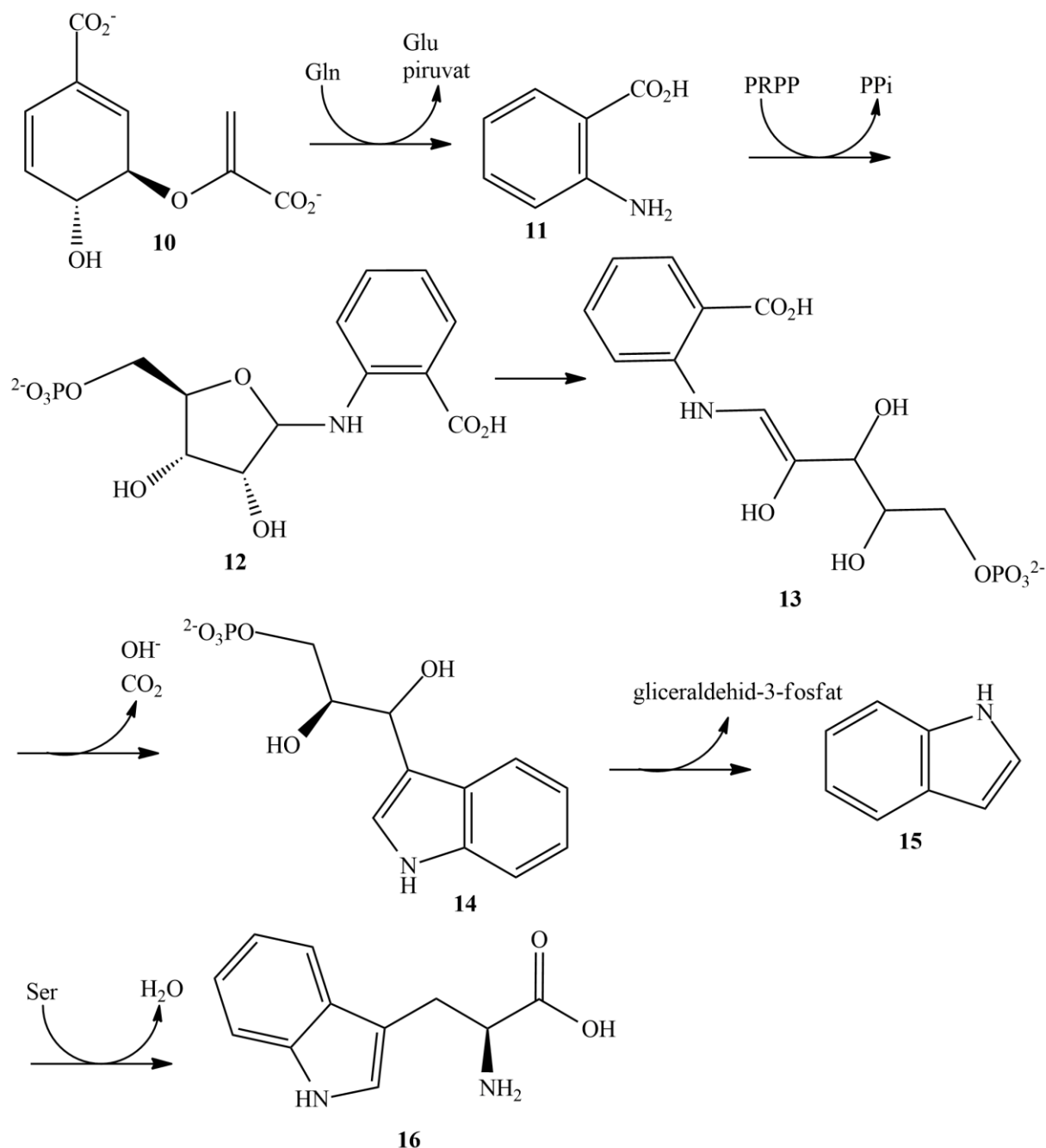
2.2. Biosinteza aromatskih aminokiselina

Konačni produkt puta šikiminske kiseline je korizmat **10**. Nakon nastanka korizmata slijedi grananje na putu prema aromatskim aminokiselinama.

2.2.1. Biosinteza L-triptofana

Razmotrimo najprije biosintezu L-triptofana iz korizmata. Aminacijom korizmata **10** glutaminom kataliziranom antranilat-sintazom nastaje antranilna kiselina **11** (slika 9). Slijedi kondenzacija antranilne kiseline **11** s 5-fosforibozil-1-pirofosfatom (PRPP) čime nastaje N-(5'-fosforibozil)-antranilat **12** uz otpuštanje i hidrolizu pirofosfata.¹⁷ PRPP kao aktivni oblik riboze omogućuje uvođenje riboznog prstena u molekulu antranilne kiseline **11** mehanizmom nukleofilnog napada amino-skupine antranilne kiseline na C₁ atom PRPP-a uz odlazak

pirofosfata. Slijedi hidroliza pirofosfata katalizirana anorganskom pirofosfatazom koja čini ovaj reakcijski korak ireverzibilnim. To je ujedino česta metoda kojom biološki sustavi postižu ireverzibilnost reakcija. Zatim slijedi otvaranje riboznog prstena katalizirano fosforibozilantranilat-izomerazom čime nastaje 1-(*o*-karboksifenilamino)-1-deoksiribuloza-5-fosfat **13**. Dekarboksilacijom 1-(*o*-karboksifenilamino)-1-deoksiribuloza-5-fosfat **13** kataliziranom indol-3-glicerol-fosfat-sintazom nastaje indol-3-glicerolfosfat **14**. Eliminacijom glicerladehid-3-fosfata nastaje indol **15** koji se kondenzira s L-serinom djelovanjem triptofan-sintaze i u konačnici daje L-triptofan **16**.



Slika 9. Shematski prikaz biosinteze L-triptofana iz korizmata – konačnog produkta puta šikiminske kiseline¹⁸

Triptofan-sintaza katalizira posljednja dva koraka biosinteze L-triptofana iz korizmata. Strukturno se radi o tetrameru sastava $\alpha_2\beta_2$ čije α podjedinice kataliziraju sintezu indola **15** iz indol-3-glicerol-fosfata **14**. Reakcijski mehanizam ovog koraka temelji se na tome da β podjedinice sadrže piridoksal-fosfat (PLP) u svom aktivnom mjestu koji stvara Schiffovu bazu

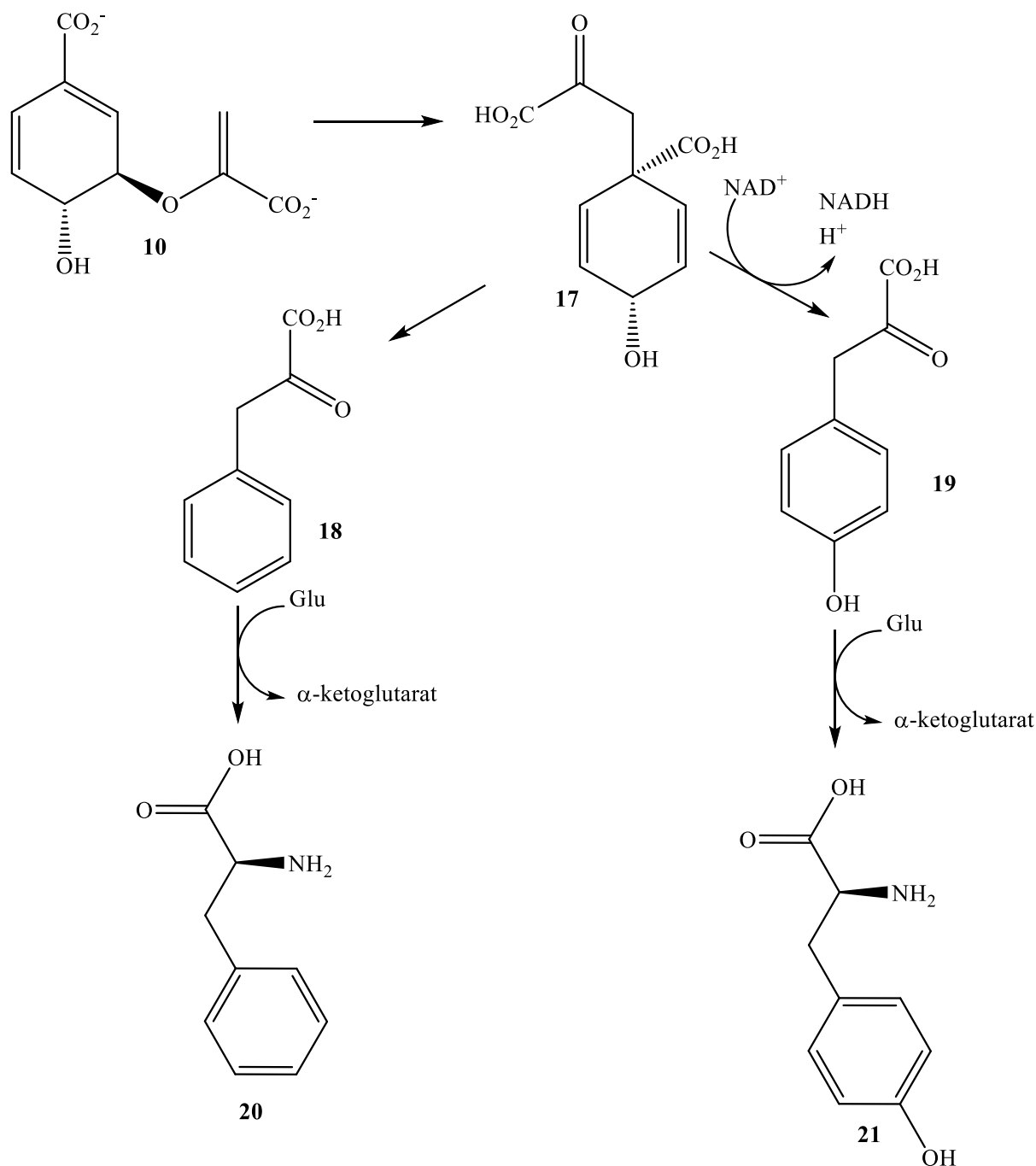
sa serinom. Serin otpušta molekulu vode pri čemu nastaje Schiffova baza aminoakrilata. Indol **15** nukleofilno napada nastali adukt, dolazi do otpuštanja PLP-a i nastanka L-triptofana **16**.¹⁷

Regulacija biosinteze L-triptofana ponovno je vezana uz mehanizam regulacije povratnom spregom. Aktivnost enzima koji katalizira prvi korak biosinteze L-triptofana iz korizmata, antranilat-sintaze, regulirna je povratnom spregom pomoću L-triptofana.²⁰

2.2.2. Biosinteza L-fenilalanina i L-tirozina

Claisenovom pregradnjom korizmata **10** kataliziranom korizmat-mutazom nastaje prefenatna kiselina **17** koja je zajednički prekursor L-tirozina **21** i L-fenilalanina **20** (slika 10). Claisenova pregradnja je periciklička reakcija, točnije [3,3]-sigmatropna pregradnja. Najčešće se odvija prilikom zagrijavanja aromatskih sustava, te nakon same pregradnje slijedi prijenos protona pomoću otapala kako bi se obnovila aromatičnost sustava. No, moguća je i kod sustava koji nisu aromatični poput korizmata **10** te se tada naziva alifatskom Claisenovom pregradnjom.⁵ Dekarboksilacijom prefenatne kiseline **17**, nakon koje slijedi dehidratiranje nastaje fenilpirogroždana kiselina **18**. Ovo je ključan korak biosinteze jer dolazi do nastanka aromatskog sustava. Transaminacijom fenilpirogroždane kiseline **18** uz glutamat kao izvor amino-skupine pomoću glutamat-aminotransferaze u konačnici nastaje L-fenilalanin **20**. Aminotransferaze su skupina enzima koji se u biološkim sustavima koriste za reverzibilnu reakciju pretvorbe između amino-skupine i keto-skupine. Njihov mehanizam djelovanja svodi se na to da vežu PLP kao prostetičku skupinu pomoću kojeg rade Schiffovu bazu sa supstratom.

Biosinteza L-tirozina **21** u suštini je vrlo slična biosintezi L-fenilalanina **20**. Glavna razlika je to što u prvom koraku biosinteze L-tirozina **21** dolazi do oksidativne dekarboksilacije prefenatne kiseline **17** katalizirane prefenat-dehidrogenazom, nakon koje ne slijedi dehidratiranje. Time nastaje *p*-hidroksifenilpirogroždana kiselina **19**. Reakcije oksidativne dekarboksilacije vrlo su česte u biološkim sustavima. Radi se o uklanjanju karboksilne skupine koja se pritom oksidira do ugljikovog dioksida. Transaminacijom *p*-hidroksifenilpirogroždane kiseline **19**, na isti način kao kod biosinteze L-fenilalanina **20**, nastaje L-tirozin **21**.



Slika 10. Shematski prikaz biosinteze L-fenilalanina i L-tirozina iz korizmata kao konačnog produkta puta šikiminske kiseline¹⁹

Osim regulacije mehanizmom povratne sprege kod biosinteze L-fenilalanina i L-tirozina iz korizmata javlja se i alosterička regulacija. Aktivnost korizmat-mutaze, enzima koji katalizira pretvorbu korizmata u prephenatnu kiselinu, regulirana je pozitivnom alosteričkom regulacijom pomoću korizmata. Alosterička regulacija vrsta je regulacije gdje se takozvani alosterički

modulator veže na alosteričko vezno mjesto enzima što dovodi do konformacijske promjene enzima kojom se povećava njegov afinitet za vezanjem supstrata. U navedenom slučaju korizmat ima ulogu supstrata te ujedino i alosteričkog modulatora.

2.3. Laboratorijska sinteza šikiminske kiseline

Kao što je ranije spomenuto, šikiminska kiselina ima važnu ulogu kako onu vezanu uz biosintezu aromatskih aminokiselina, tako i onu gdje poznavanje puta šikiminske kiseline otvara mogućnost sinteze specifičnih herbicida i antibiotika. Desetak godina nakon otkrića puta šikiminske kiseline tj. otkrića uloge šikiminske kiseline postavljeno je pitanje može li se do nje doći stereoselektivnom organskom sintezom u laboratoriju. Opisani su brojni postupci sinteze šikiminske kiseline kako u racemičnom obliku tako i u enantiomerno čistom obliku.² Mogu se podijeliti na postupke koji se temelje na Diels-Alderovoj reakciji te postupke koji kreću iz benzena i njegovih derivata. Za enantiospecifičnu sintezu šikiminske kiseline poznati su postupci koji polaze iz ugljikohidrata (arabinoza, manoza) i kininske kiseline. Neki od njih bit će obrađeni u sklopu ovog rada.

2.3.1. Sinteza racemata šikiminske kiseline temeljena na Diels-Alderovoj reakciji

Dvije međusobno neovisne skupine znanstvenika, R. McCridlea i E. E. Smismana su 1960-ih godina došle do prve sinteze racemata šikiminske kiseline koju su opisali kao „esencijalno identičan put“² s obzirom na sam put šikiminske kiseline. Dobiveni racemat bio je smjesa enantiomera šikiminske kiseline, (-)-šikiminske kiseline **7** odnosno (3*R*, 4*S*, 5*R*)-3,4,5-trihidroksicikloheks-1-enkarboksilne kiseline i (+)-šikiminske kiseline **29** odnosno (3*S*, 4*R*, 5*S*)-3,4,5-trihidroksicikloheks-1-enkarboksilne kiseline. Za dobivanje cikloheksanskog prstena šikiminske kiseline koristili su Diels-Alderovu reakciju. Kao dien za ovu reakciju izabrali su molekulu (1*E*, 3*E*)-1,4-diacetoksibuta-1,3-diena **22**, dok je kao dienofil skupina vođena McCridleom izabrala propensku kiselinu **23** (slika 11), a skupina vođena Smismanom metil-prop-2-enoat. Obje skupine ustanovile su da dolazi do *endo* **24** cikloadicije između diena i dienofila čime nastaje povoljna stereokemija za reakciju eliminacije koja slijedi.²

Nekoliko godina kasnije S. Balasubramanian i C. Abell ponovno su proučavali stereokemiju Diels-Alderove reakcije McCridlea i Smismana. Došli su do zaključka kako je nastali produkt smjesa diastereoizomera nastalih *egzo* **25** i *endo* **24** cikloadicijama u omjeru 1:4

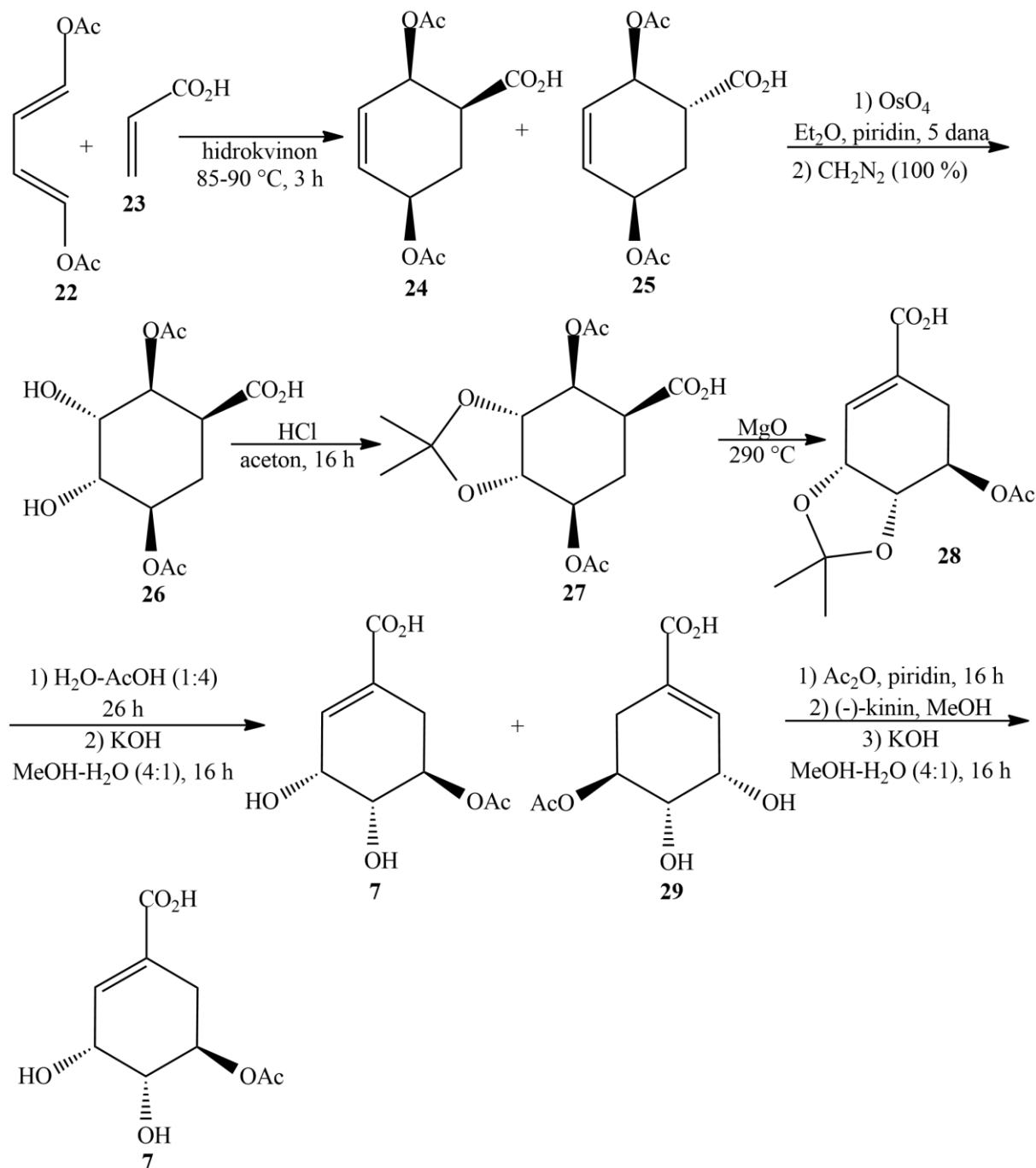
neovisno o tome koristi li se propenska kiselina ili metil-prop-2-enoat kao dienofil.² To objašnjava činjenicu da su Smissman i McCridle zaključili kako se radi o *endo* cikloadiciji.

U slijedećem reakcijskom koraku produkt Diels-Alderove reakcije **24** reagira s osmijevim tetroksidom i dolazi do oksidacije kojom nastaje *cis* vicinalni diol **26**. Kako bi se zaštitile hidroksilne skupine vicinalnog diola **26** od eliminacije u nadolazećem koraku, spoj **26** prevodi se u acetal uz dodatak acetona u kiselom mediju (suha HCl) pri čemu nastaje spoj **27**. Slijedi regioselektivna hidroliza jedne acetilne skupine pomoću jake baze praćena eliminacijom vode čime nastaje produkt **28** koji je vrlo sličan šikiminskoj kiselini **7**. Preostaje ukloniti acetalnu zaštitnu skupinu hidrolizom u prisutnosti slabe kiseline pri čemu nastaje racemična smjesa (–)-šikiminske kiseline **7** i (+)-šikiminske kiseline **29**. U konačnici je iz racemata izolirana (–)-šikiminska kiselina **7** u reakciji s optički aktivnim reagensom (–)-kininom što je lijep primjer kemijske rezolucije enantiomera.

Kemijska rezolucija enantiomera je postupak odvajanja smjese enantiomernih produkata na pojedinačne enantiomere. Kako enantiomeri imaju identična fizikalna svojstva osim zakretanja ravnine polarizirane svjetlosti, nije ih moguće odvojiti standardnim laboratorijskim metodama odvajanja (filtracija, destilacija itd.). Za razliku od njih, dijastereoizomeri se razlikuju po svojom fizikalnim svojstvima te ih je moguće odvojiti standardnim metodama odvajanja. Upravo je to osnovna ideja postupka kemijske rezolucije enantiomera. Enantiomeri prisutni u smjesi u reakciji s optički aktivnim reagensom dat će smjesu dijastereoizomera koji se onda mogu odvojiti na temelju razlike u fizikalnim svojstvima. Često jedan dijastereoizomer kristalizira u otopini brže od drugog te ga se može ukloniti filtracijom. Kod navedene reakcije nakon dodatka anhidrida octene kiseline, karboksilna skupina (–)-šikiminske kiseline **7** i (+)-šikiminske kiseline **29** reagira s kiralnom amino-skupinom (–)-kinina pri čemu nastaje smjesa soli koje su sada dijastereoizomeri. Slijedi odvajanje dijastereoizomera na temelju razlike u njihovim fizikalnim svojstvima. Dijastereoizomer koji sadrži konjugiranu bazu (–)-šikiminske kiseline **7** podvrgava se hidrolizi pomoću kalijeve lužine u otopini metanola i vode kako bi se oslobodila (–)-šikiminska kiselina **7**. Nedostatak ove metode je to što prilikom kemijske rezolucije enantiomera ukupno iskorištenje sinteze značajno pada pri tom koraku jer drugi enantiomer nije dalje potreban. Taj problem riješavaju enantiospecifične sinteze tražene tvari.

Iskorištenje McCridleovog/Smismanovog sintetskog postupka iznosi ≤ 15 %. Nadolazećih godina bilo je nekoliko pokušaja optimizacije postupka kako bi se povećalo

konačno iskorištenje. Prvi koji su značajno povećali iskorištenje bili su M. Koreeda i M. A. Ciuofolini koji su kao dien koristili (1*E*,3*E*)-4-acetoksi-1-trimetilsilil-buta-1,3-dien. Time su značajno povećali omjer *endo* produkta u odnosu na *egzo* s 4:1 na 9:1. Uz neke manje preinake u ostatku sinteze, konačno iskorištenje njihovog postupka iznosilo je 29 %. Koreeda i suradnici par godina kasnije objavili su novi postupak sinteze temeljen na Diels-Alderovoj reakciji. Ovog puta su kao dien koristili 3,4-dibenziloksifuran čime je omjer *endo* produkta u odnosu na *egzo* porastao na 15,3:1. Ukupno iskorištenje ovog postupka iznosi 63,9 % te je to najveće dobiveno iskorištenje sinteze racemata šikiminske kiseline temeljeno na Diels-Alderovoj reakciji.

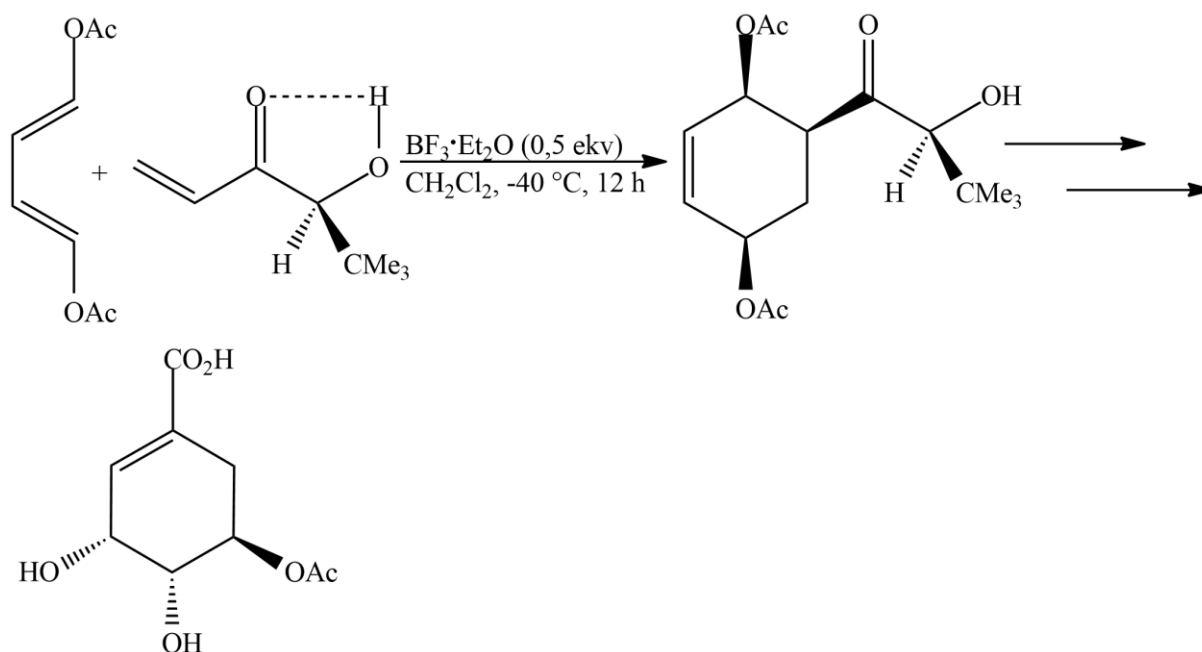


Slika 11. Shematski prikaz prve objavljene sinteze racemata šikiminske kiseline, temeljene na Diels-Alderovoj reakciji prema radu skupine znanstvenika vođenih R. McCridleom²

2.3.2. Sinteza (-)-šikiminske kiseline temeljena na Diels-Alderovoj reakciji

S. Masamune i suradnici objavili su 1983. godine prvu enantiospecifičnu sintezu (-)-šikiminske kiseline **7** odnosno (3*R*, 4*S*, 5*R*)-3,4,5-trihidroksicikloheks-1-enkarboksilne kiseline temeljenu na Diels-Alderovoj reakciji (slika 12). Kako bi u Diels-Alderovoj reakciji dobili isključivo *endo*

produkt koristili su (*S*)-4-hidroksi-5,5-dimetilheks-1-en-3-on kao dienofil. Zbog nastanka jake vodikove veze između hidroksilne skupine i keto-skupine dienofila ne dolazi do rotacije oko C₃–C₄ veze zbog čega se dvije diastereotopne strane dienofila lako međusobno razlikuju.² Uz BF₃·Et₂O kao katalizator, nastaje isključivo *endo* produkt cikloadicije. Reakcije u sintezi koje slijede nakon Diels-Alderove reakcije analogne su onima sinteze racemata šikiminske kiseline temeljene na Diels-Alderovoj reakciji prema radu skupine znanstvenika vođenih R. McCridleom (slika 10).



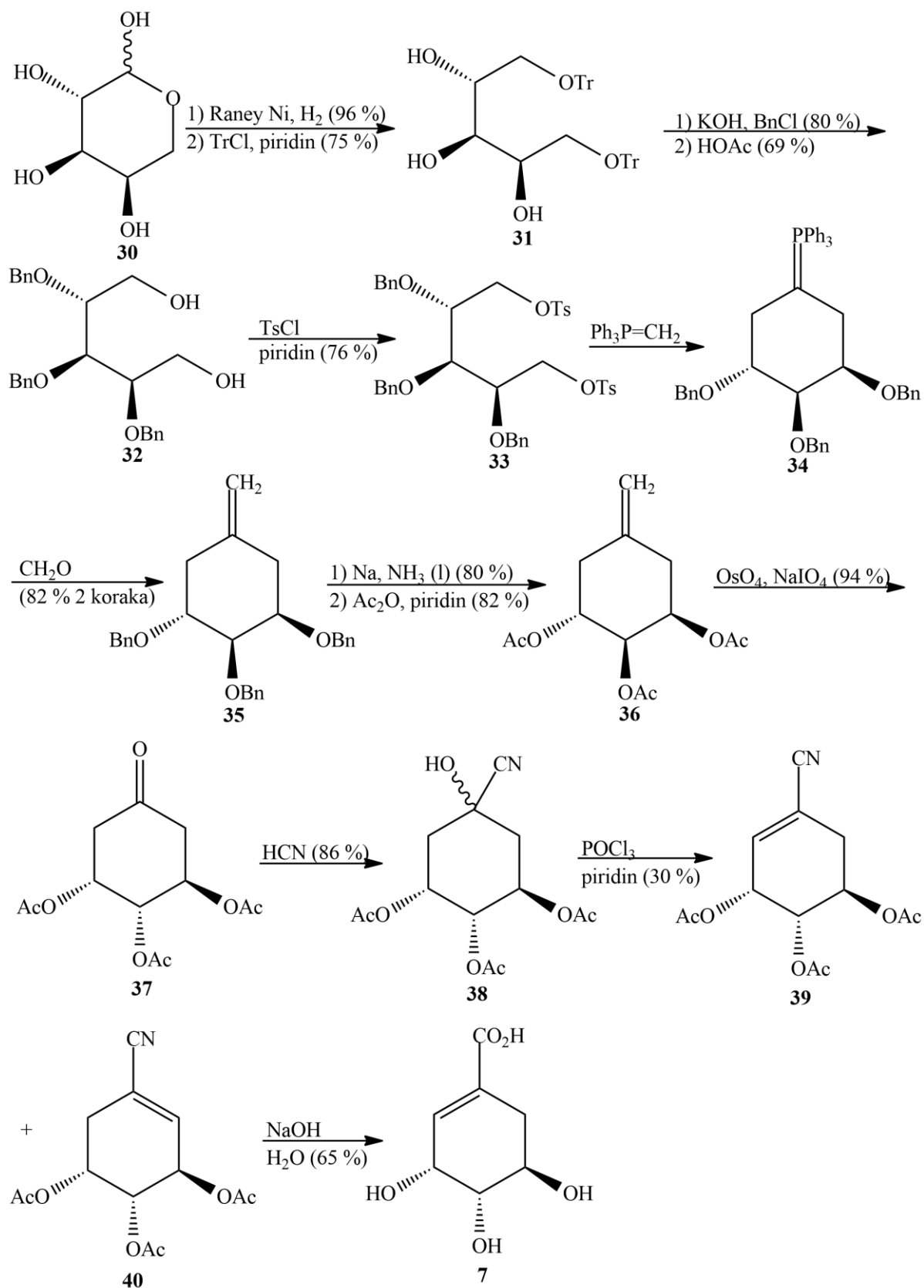
Slika 12. Shematski prikaz prve objavljene enantiospecifične sinteze (–)-šikiminske kiseline temeljena na Diels-Alderovoj reakciji prema radu S. Masamune i suradnika²

2.3.3. Sinteza (–)-šikiminske kiseline iz ugljikohidrata

Ugljikohidrati, točnije monosaharidi izvrsni su predlošci za sintezu prirodnih kiralnih spojeva poput šikiminske kiseline zbog velikog broja kiralnih centara koje sadrže.² H. J. Bestmann i H. A. Held koristili su D-arabinozu **30** kao ishodišnu molekulu za sintezu (–)-šikiminske kiseline **7** (slika 13). U prvome koraku katalitičkim hidrogeniranjem uz Raney-Ni D-arabinoza **30** prevodi se u arabitol. Arabitolu se zatim selektivno uvodi zaštita dviju primarnih hidroksilnih skupina na C₁ i C₅ atomu pomoću trifenilmetil-klorida (tritol-klorid, TrCl) u piridinu pri čemu nastaje djelomično zaštićeni međuprodukt **31**. Za zaštitu preostale tri sekundarne hidroksilne skupine na C₂, C₃ i C₄ atomima kako ne bi reagirale s *p*-toluensulfonil-kloridom u trećem

koraku, koriste benzilnu zaštitu. Obje zaštitne skupine spadaju u eterske zaštitne skupine i uvode se u uvjetima Williamsonove sinteze etera koja podrazumijeva S_N2 reakciju halogenalkana (u ovom slučaju $TrCl$ i $BnCl$) i alkohola u prisutnosti odgovarajućih baza (piridin, KOH). Razlog ovakvog odabira zaštitnih skupina leži u činjenici da se ove skupine uklanjaju u različitim uvjetima (tzv. ortogonalne zaštitne skupine), a to je upravo ono što je potrebno. Naime, tritilna eterska zaštita kiselo je labilna, a u blago kiselim uvjetima u kojim se uklanja ne dolazi do uklanjanja benzila čime nastaje međuprodukt **32**. Sada mogu isključivo hidroksilne skupine na položajima C_1 i C_5 reagirati s *p*-toluensulfonil-kloridom u piridinu (tosil-kloridom, $TsCl$) te Williamsonovom sintezom nastaje međuprodukt **33**. U iduća dva koraka dolazi do Wittigove reakcije međuprodukta **33** s formaldehidom pri čemu dolazi do zatvaranja šesteročlanog prstena te nastanka međuprodukata **34** i **35**. Slijedi uklanjanje benzilne zaštite hidroksilnih skupina u reduktivnim uvjetima (Na , $NH_3(l)$) i uvođenje acetilne zaštite na iste pozicije (međuprodukt **36**) kako bi se u konačnici zaštita mogla ukloniti pri blažim uvjetima koji neće naštetiti ostatku molekule. Acetilna zaštita hidroksilnih skupina esterski je tip zaštite koja se tipično uvodi dodatkom anhidrida octene kiseline u prisutnosti piridina koji u ovoj reakciji nukleofilne supstitucije veže izlaznu skupinu, octenu kiselinu dajući piridinijev-acetat. Kako bi uveli $-COOH$ skupinu koristili su oksidativno cijepanje s osmijevim tetroksidom uz dodatak natrijeva perjodata pri čemu najprije nastaje međuprodukt s keto-skupinom **37**. Reakcijom alkena s osmijevim tetroksidom, kako je već spomenuto, nastaje vicinalni diol kojem se zatim uz dodatak perjodata pocijepa $C-C$ veza i dobije se keton **37** i formaldehid. Reakcija je poznata kao Lemieux-Johnson oksidacija.²¹ Keton **37** cijanhidrijskom reakcijom prevodi se u hidroksinitril **38** nakon čega slijedi eliminacija vode uz dodatak fosforil-klorida kao sredstva za dehidriranje.

Zanimljivo je napomenuti kako su Bestmann i Held u vrijeme objave sinteze smatrali da je eliminacija vode u devetom koraku regiospecifična te da nastaje međuprodukt **39**. Kasnijim istraživanjima C. D. Snydera i H. Rapoportra dokazano je da kod navedenog koraka dolazi do nastanka smjese regioizomera **39** i **40** u omjeru 1:1.² Posljednji korak sinteze je istodobna hidroliza cijano-skupine u karboksilnu kiselinu i uklanjanje acetilnih esterskih zaštita na hidroksilnim skupinama C_2 , C_3 i C_4 atoma što se odvija zagrijavanjem u prisutnosti natrijeve lužine pri čemu nastaje (–)-šikiminska kiselina **7**.



Slika 13. Shematski prikaz sinteze (-)-šikiminske kiseline iz ugljikohidrata prema radu H.

J. Bestmanna i H. A. Helda²

2.4. Današnja proizvodnja šikiminske kiseline

Glavnina šikiminske kiseline danas se dobiva ekstrakcijom iz sjemenki kineskog zvijezdastog anisa (*Illicium verum*).⁴ Postoji još cijeli niz biljnih vrsta kao što su određene vrste bora, smreka i jela za koje je poznato da proizvode šikiminsku kiselinu. Provedeno je niz ekstrakcija iz raznih biljnih vrsta s različitim konačnim iskorištenjem postupka, no u konačnici je ustanovljeno da su biljke roda *Illicium* najbolji izvor šikiminske kiseline. Konačno iskorištenje postupka izolacije kod njih iznosi između 3 % i 7 %.¹⁴ Mnoge od njih su otrovne za konzumaciju stoga se najviše koristi kineski zvijezdasti anis koji je jestiv.

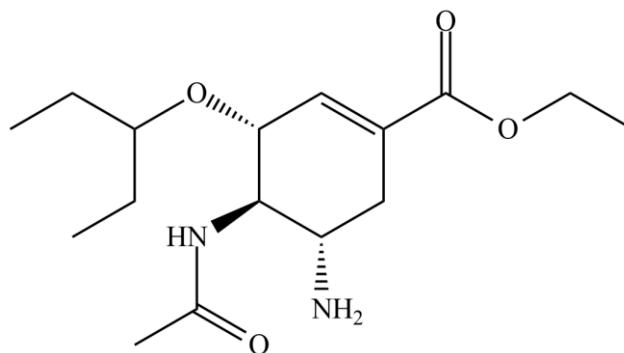
Šikiminska kiselina vrlo je dobro topljiva u vodi (180 g/L pri 20 °C), no slabo topljiva u nepolarnim otapalima.⁴ To je svojstvo iskorišteno za ekstrakciju – glavnina šikiminske kiseline za komercijalne svrhe ekstrahira se vrućom vodom iz usitnjenih sjemenki kineskog zvijezdastog anisa. Naravno, ovom metodom u ekstraktu zaostaju brojni biljni metaboliti topljivi u vodi te je potrebno daljnje pročišćavanje kako bi se došlo do čiste šikiminske kiseline.

Važan alternativni put proizvodnje je korištenje mikroorganizama, najčešće *Escherichia coli* za biosintezu putem šikiminske kiseline. Koriste se rekombinantne bakterije kod kojih su blokirani određeni metabolički putevi koji konzumiraju šikiminsku kiselinu, a povećana je sinteza enzima puta šikiminske kiseline.⁴

Kemijska sinteza šikiminske kiseline jednom od poznatih metoda sinteze je moguća, ali se ne koristi za komercijalne svrhe jer nije isplativa.⁴

2.4.1. Upotreba šikiminske kiseline

Šikiminska kiselina se koristi kao polazna molekula za sintezu oseltamivira (slika 14) poznatijeg pod komercijalnim nazivom Tamiflu®. Oseltamivir je antiviralni lijek koji se koristi za liječenje i prevenciju Influenzavirusa A i Influenzavirusa B odnosno gripe.¹⁵



Slika 14. Strukturna formula molekule oseltamivira

U farmaceutskoj industriji šikiminska kiselina također se koristi za proizvodnju (6S)-6-fluoršikiminske kiseline. Ona se koristi kao antibiotik koji inhibira biosintezu aromatskih aminokiselina, točnije sintezu *p*-aminobenzojeve kiseline iz korizmata. Često se koristi protiv *Plasmodium falciparum* koja se smatra uzročnikom malarije.¹⁶

2.5. Popis kratica

ADP - adenzin-difosfat

AMP - adenzin-monofosfat

ATP - adenzin-trifosfat

DAHP - 3-deoksi-D-arabinoheptulozanat-7-fosfat

EPSP - 5-enolpiruvilšikimat-3-fosfat

FMNH₂ - reducirani oblik flavin-mononukleotida

FMN_{oks} - oksidirani oblik flavin-mononukleotida

FMN_{red} - reducirani oblik flavin-mononukleotida

NAD⁺ - nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADPH - nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat

PLP - piridoksal-fosfat

PRPP - 5-fosforibozil-1-pirofosfat

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. M. M. Campbell, M. Sainsbury, P. A. Searle, *Synthesis* **1993** (1993) 173-193.
2. S. Jiang, G. Singh, *Tetrahedron* **54** (1998) 4697-4753.
3. M. Šimunić, *Kvalitativna i kvantitativna analiza polifenola vrsta Geranium macrorrhizum L. i G. dalmaticum (Beck) Rech. f., Geraniaceae*, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016, str. 5.
4. S. Ghosh, Y. Chisti, U. C. Banerjee, *Biotechnol. Adv.* **30** (2012) 1425-1431.
5. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic chemistry*, Oxford University Press, USA 2012, str. 910-911, 1154-1156.
6. <https://www.intechopen.com/books/plant-physiological-aspects-of-phenolic-compounds/shikimic-acid-pathway-in-biosynthesis-of-phenolic-compounds> (datum pristupa 23. srpnja 2020.)
7. T. Vered, G. Gad, *Mol. Plant* **3** (2010) 956-972.
8. A. Pažur, *Određivanje količine flavonoida i fenolnih kiselina te antioksidacijskog učinka u vrstama Salvia brachyodon Vand. i Salvia officinalis L.*, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017, str. 11.
9. J. Schmid, N. Amrhein, *Phytochemistry* **39** (1995) 737-749.
10. S. Bornemann, M. Theoclitou, M. Brune, M. R. Webb, R. N. F. Thorneley, C. Abell, *Bioorg. Chem.* **28** (2000) 191-204.
11. A. Osborne, R. N. F. Thorneley, C. Abell, S. Bornemann, *J. Biol. Chem.* **275** (2000) 35825-35830.
12. S. A. Singh, D. Christendat, *Cryst. Growth Des.* **7** (2007) 2153-2160.
13. J. Lewis, K. A. Johnson, K. S. Anderson, *Biochemistry* **38** (1999) 7372-7379.
14. https://en.wikipedia.org/wiki/Shikimic_acid (datum pristupa 31. srpnja 2020.)
15. <https://en.wikipedia.org/wiki/Oseltamivir> (datum pristupa 31. srpnja 2020.)
16. [https://en.wikipedia.org/wiki/\(6S\)-6-Fluoroshikimic_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/(6S)-6-Fluoroshikimic_acid) (datum pristupa 31. srpnja 2020.)
17. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, 2013., str. 679-709.
18. <https://en.wikipedia.org/wiki/Tryptophan>
19. F. Gibson, J. Pittard, *Bacteriol. Rev.* **32** (1968) 465-492.

20. D. G. Gilchrist, T. Kosuge, *Amino Acids and Derivatives*, Academic Press, 1980, str. 507-531.
21. R. Pappo, D. S. Allen, Jr., R. U. Lemieux, W. S. Johnson, *J. Org. Chem.* **21** (1956) 478-479.