

I microrganismi come biocatalizzatori

Esempi di bioconversione

di Enrica Galli, Andrea Colmegna, Fulvia Orsini, Guido Sello, Giuseppina Bestetti e Patrizia Di Gennaro

Le nuove biotecnologie, oltre a costituire uno degli strumenti fondamentali per l'avanzamento della conoscenza scientifica dei fenomeni biologici, possono sul piano applicativo offrire soluzioni alternative e migliorare processi di trasformazione nei più diversi ambiti produttivi. In questo contesto le bioconversioni costituiscono un esempio di interesse nel campo della biocatalisi e si presentano come una valida e competitiva alternativa alla sintesi chimica nella produzione di numerosi composti di interesse industriale.

Le bioconversioni sfruttano l'enorme varietà di reazioni esistenti nel mondo microbico attraverso l'utilizzo di enzimi o cellule intere, per modificare in modo selettivo e con buone rese la struttura di molecole di partenza per ottenere prodotti utili con caratteristiche migliori rispetto agli analoghi già conosciuti. È particolarmente importante sottolineare che le reazioni catalizzate da questi enzimi rendono le bioconversioni migliori rispetto alle sintesi chimiche per la specificità nel riconoscimento del substrato, per la regio e stereospecificità della reazione in cui viene in genere prodotto uno solo dei due enantiomeri e infine per le condizioni di reazione blande ed ecocompatibili. La via biologica offre inoltre il vantaggio di poter ottenere prodotti otticamente attivi evitando così il ricorso a processi di risoluzione delle miscele racemiche che potrebbero rivelarsi costosi e provocare la perdita di una parte del prodotto di partenza. Le bioconversioni rappresentano sicuramente un esempio di applicazione biotecnologica anche di interesse ambientale, quando vengono utilizzate per la trasformazione di composti, come idrocarburi aromatici, che costituiscono una delle fonti

E. Galli, A. Colmegna, Dipartimento di Genetica e di Biologia dei Microrganismi - Università di Milano - Via Celoria, 26 - 20133 Milano; F. Orsini, G. Sello, Dipartimento di Chimica Organica e Industriale - Università di Milano - Via Golgi, 19 - 20133 Milano; G. Bestetti, P. Di Gennaro, Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio - Università di Milano-Bicocca - Piazza delle Scienze, 1 - 20125 Milano. enrica.galli@unimi.it



principale di contaminazione ambientale sia come tali sia come derivati di sintesi. Infatti l'ossidazione di idrocarburi mediata da ossigenasi di origine microbica per la produzione di derivati ossidrilati può rappresentare una valida alternativa alla sintesi chimica; tali derivati sono composti otticamente attivi, con una stereochimica determinata, di grande interesse industriale nel campo della sintesi di farmaci, polimeri, coloranti, aromi ecc. (Tabella).

Questo tipo di tecnologia può essere giustamente considerata a basso impatto ambientale e rientrare nella definizione di "green chemistry", in quanto permette l'ottenimento di composti utili mediante l'uso di elementi biocompatibili e di facile contenimento come i biocatalizzatori cellulari.

Tra i batteri, particolarmente interessanti per lo sviluppo di biocatalizzatori troviamo quelli appartenenti al genere *Pseudomonas*, dotati di un ampio patrimonio enzimatico, spesso caratterizzato da una specificità di substrato ad ampio spettro che li rende capaci di convertire idrocarburi aromatici variamente sostituiti in intermedi ossidrilati di interesse industriale per la sintesi di polimeri e di prodotti farmaceutici.

Le ossigenasi

I composti ossigenati (dioli, catecoli ed epossidi) possono essere prodotti biologicamente mediante reazioni di ossigenazione catalizzate da ossigenasi che prevedono l'introduzione di uno o due atomi di ossigeno.

Tabella - Derivati aromatici ossidrilati e loro utilizzo

Composto	Utilizzo
D-4-Ildrossifenilglicina	Precursore per antibiotici
Acido 4-Ildrossifenilacetico	Precursore per antibiotici e composti farmaceutici
L-3,4-Diidrossifenilalanina	Industria farmaceutica
Indaco	Coloranti
Catecoli sostituiti	Precursore per aromi sintetici
4,4-Diidrossibifenili	Monomero per polimeri
Acido diidrossifenilacetico	Sintone per composti farmaceutici e coloranti
5-Ildossitriptofano	Industria farmaceutica
4-Ildrossistirene	Aromi
α -Tetralolo	Aromi
Ildrossibenzaldeide	Sintone per composti farmaceutici

Monoossigenasi

Catalizzano l'incorporazione di un solo atomo di ossigeno molecolare nella molecola del substrato:

- 1) ossidrilasi aromatiche (toluene e fenolo monoossigenasi);
- 2) ossidrilasi di gruppi alchilici (xilene monoossigenasi, alcani monoossigenasi).

Diossigenasi

- 1) catalizzano l'incorporazione di entrambi gli atomi di una molecola di ossigeno sull'anello aromatico. Esempio: benzene-1,2-diossigenasi;
- 2) catalizzano l'incorporazione dei due atomi di una molecola di ossigeno su due carboni adiacenti di un difenolo, provocando l'apertura dell'anello aromatico. Esempi: catecolo 1,2-diossigenasi e catecolo 2,3-diossigenasi.

Alcune monoossigenasi sono molto specifiche e ossidano soltanto alcuni composti con l'introduzione del gruppo ossidrilico in una particolare posizione. La-3,4-diidrossifenilalanina (L-Dopa), un farmaco utilizzato nel trattamento del morbo di Parkinson, viene sintetizzato mediante una reazione di ossidrilazione della L-tirosina in posizione *meta* da parte di diversi ceppi di *Pseudomonas*. Al contrario altre monoossigenasi sono dotate di una ridotta specificità, come la xilene monoossigenasi coinvolta nel metabolismo di toluene e xilene.

Produzione di biocatalizzatori

La produzione per via biologica di intermedi di interesse industriale è possibile mediante il clonaggio di specifici geni di *Pseudomonas* che codificano enzimi responsabili della produzione del prodotto desiderato, in ospiti come *E. coli* per la produzione di molecole utili; emerge quindi la necessità di isolare e clonare geni di interesse al fine di ottenere ceppi in grado di produrre con buone rese i prodotti desiderati.

Qui di seguito vengono descritti due esempi di biocatalizzatori sviluppati nei nostri laboratori (Figura 1).

Il primo si riferisce al biocatalizzatore ottenuto mediante clonaggio in *E. coli* dei geni StyA e StyB di *Pseudomonas fluorescens* St codificanti la stirene-monoossigenasi che converte lo stirene nel corrispondente epossido in forma S enantiomericamente pura [1-3].

Il ceppo ricombinante di *E. coli* JM109 (pTAB19) si è dimostrato in grado di trasformare differenti composti arilvinilici ed aril

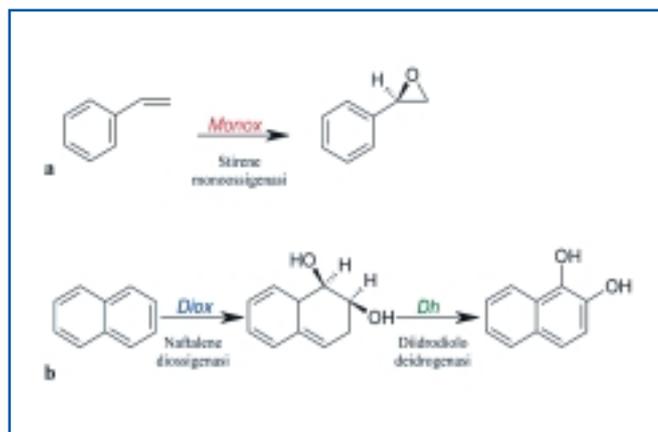


Figura 1 - Reazioni di bioconversioni: a) conversione di stirene in epossistirene; b) conversione di naftalene in diidrodiolo e del diidrodiolo in 1,2-diidrossinaftalene

etenilici nei corrispondenti epossidi otticamente puri con rese di bioconversione molto elevate, da utilizzare come precursori nella sintesi di composti otticamente attivi.

L'ampia specificità di substrato mostrata dalla stirene monoossigenasi, rende questo sistema ancora più interessante dal punto di vista biotecnologico, ipotizzando l'utilizzo della stirene monoossigenasi, sia con ceppi ricombinanti sia come enzima immobilizzato, per la produzione di numerosi composti epossidici ad alto valore aggiunto [4] (Figura 2a).

Alcune bioconversioni sono state condotte in ambiente bifasico a causa della tossicità e dell'idrofobicità di alcuni substrati. L'utilizzo del cosolvente comporta una differente ripartizione del substrato e dei prodotti; infatti questi composti altamente idrofobici si dissolvono completamente nel solvente organico, determinando un rilascio continuo e moderato del substrato, oltre che un sequestro dell'eossido prodotto, evitandone fenomeni di tossicità e l'idrolisi in ambiente acquoso. I substrati saggiati, nella maggior parte dei casi, sono stati trasformati nei relativi epossidi dimostrando, oltre alla già nota stereospecificità, anche un'importante regioselettività.

In particolare, i risultati ottenuti suggeriscono la necessità di una risonanza tra il gruppo vinilico e l'anello aromatico per il riconoscimento dell'enzima. Questa ipotesi è supportata dalla trasformazione ad alte rese del beta-metilstirene (60%) e del cinnamilalcolool (100%).

Il secondo biocatalizzatore sviluppato porta i geni codificanti per una naftalene diossigenasi e una diidrodiolo deidrogenasi clonati dal plasmide pN3 di *Pseudomonas fluorescens* N3, nel ceppo di *E. coli* JM109 [5-8] (Figura 2b). Il primo enzima catalizza l'ossidrilazione dei naftaleni nei corrispondenti 1,2-diidro-1,2-diidrossinaftaleni, che vengono successivamente ossidati dal secondo enzima nei derivati 1,2-diidrossinaftaleni. La prima reazione richiede la presenza di ossigeno, la seconda al contrario richiede condizioni di anaerobiosi per evitare un'ulteriore ossidazione dei prodotti di bioconversione. È stato pertanto sviluppato un biocatalizzatore che porta entrambi i geni inducibili alternativamente in condizioni aerobiche e anaerobiche; in particolare la diidrodiolo deidrogenasi è inducibile da nitrito in atmosfera di azoto, al fine di ottenere un sistema biologico in grado di controllare l'espressione dei geni clonati mediante uno shift da condizioni aerobiche in cui vengono prodotti i diidrodioli a condizioni anaerobiche in cui i diidrodioli vengono ossidati a 1,2-diidrossinaftaleni [9].

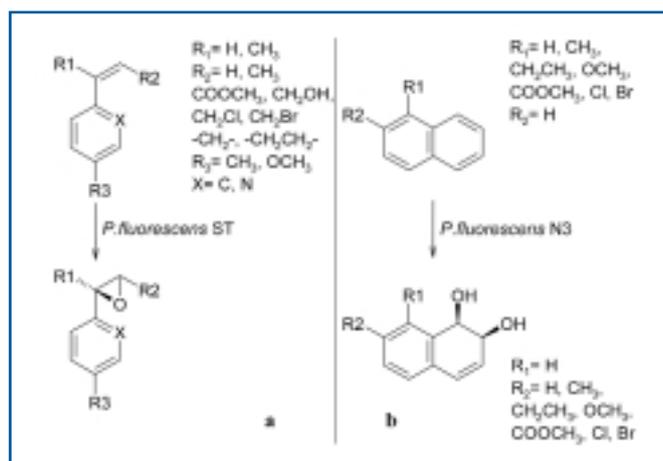


Figura 2 - Substrati di biotrasformazione: a) stireni sostituiti; b) naftaleni sostituiti

Tali composti sono stati poi utilizzati per sviluppare processi stereoselettivi per la preparazione di amminoalcoli e diammine enantiopure da usare come ausiliari chirali in vari tipi di trasformazioni sintetiche, con particolare riferimento alla sintesi di idrossi e ammino fosfonati.

Infatti successivamente alla fase di bioconversione la trasformazione selettiva dei composti ottenuti permette l'estensione della produzione di molecole di interesse industriale mediante pochi passaggi, usualmente ad alta resa e, soprattutto, potendo utilizzare prodotti di partenza inusuali e/o non facilmente disponibili per altra via. Contrariamente a quanto si ritiene comunemente, questi composti non sono solo quelli enantiomericamente puri, ma anche composti la cui produzione per vie classiche presenta ostacoli legati alla loro reattività (sia elevata e perciò sintomo di instabilità, sia scarsa e perciò richiedente condizioni particolarmente drastiche). Lo sviluppo di nuove metodiche capaci di sfruttare al meglio le caratteristiche dei composti disponibili porta alla realizzazione di brevi serie di reazioni con il conseguente ottenimento dei prodotti desiderati in alte rese.

Prospettive

La ricerca svolta risulta interessante e innovativa per lo sviluppo di biocatalizzatori portatori di ossigenasi in grado di produrre molecole ossigenate difficilmente ottenibili per via chi-

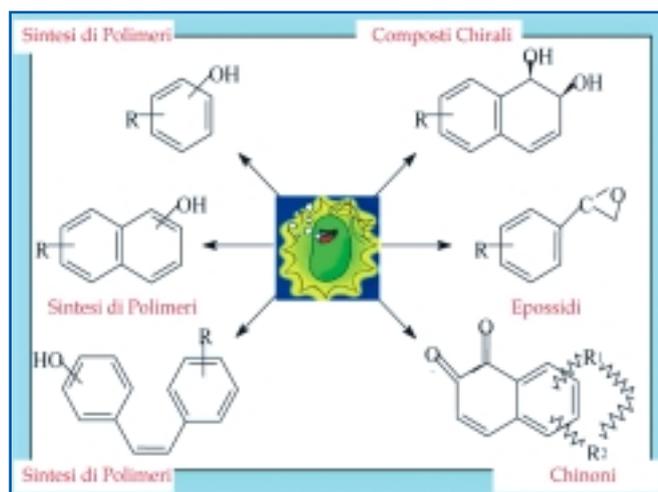


Figura 3 - Produzione di derivati ossidrilati per sintesi chimiche

mica ed il loro impiego nella sintesi di ausiliari e sintoni chirali (Figura 3 - Schema applicazioni).

Un altro aspetto molto rilevante dal punto di vista applicativo, è legato alla possibilità di incorporare cellule batteriche o solubilizzare enzimi purificati in microemulsioni, nelle quali il contenuto acquoso è capace di mantenere vitali le cellule e dall'altra la componente non acquosa consente di avviare la catalisi in maniera efficace in presenza di substrati idrofobici come gli idrocarburi aromatici [10].

Nonostante la sempre maggior diffusione delle bioconversioni, permangono alcuni problemi inerenti sia gli aspetti di produzione di quantità significative di composti, sia le metodiche trasformative. Nel primo caso le difficoltà di scale-up delle quantità sono principalmente collegate alla possibile instabilità dei composti, alla loro tossicità nei confronti dei sistemi biologici produttori, all'isolamento e alla purificazione. Il secondo problema concerne invece lo studio e l'ottimizzazione dei passaggi reattivi sia per quanto concerne la resa chimica, sia, soprattutto, per il livello di stereoselezione indispensabile al mantenimento e al trasferimento totale della chiralità per sfruttare completamente i risultati delle bioconversioni.

La possibilità di ottenere per via biocatalitica composti chimici ad alto valore aggiunto rappresenta un'evoluzione significativa della tecnologia chimica industriale in termini di sviluppo di processi sempre più ecocompatibili.

Bibliografia

- [1] A.M. Marconi *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62**, 121.
- [2] F. Beltrametti *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**, 2232.
- [3] P. Di Gennaro *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 2794.
- [4] S. Bernasconi *et al.*, *Tetrahedron*, 2000, **41**, 9157.
- [5] G. Bestetti *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, **44**, 306.
- [6] P. Di Gennaro *et al.*, *Res. Microbiol.*, 1997, **148**, 355.
- [7] P. Di Gennaro *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 6267.
- [8] F. Orsini *et al.*, *Tetrahedron*, 1999, **55**, 4467.
- [9] P. Di Gennaro *et al.*, *Res. Microbiol.*, 2000, **151**, 383.
- [10] F. Briganti *et al.*, *J. Mol. Catal. B. Enzymatic*, 1999, **7**, 263.

Schema - Applicazioni

1,2-Diidrodiidrossinaftaleni:

- sintoni per la produzione di polimeri
- precursori per l'industria farmaceutica
- precursori per farmaci anti-Parkinson

Chinoni:

- fungicidi
- composti antitumorali

1,2 Diidrossiderivati:

- inibitori dell'HIV-1 proteasi

Epossidi:

- farmaci antiaritmici