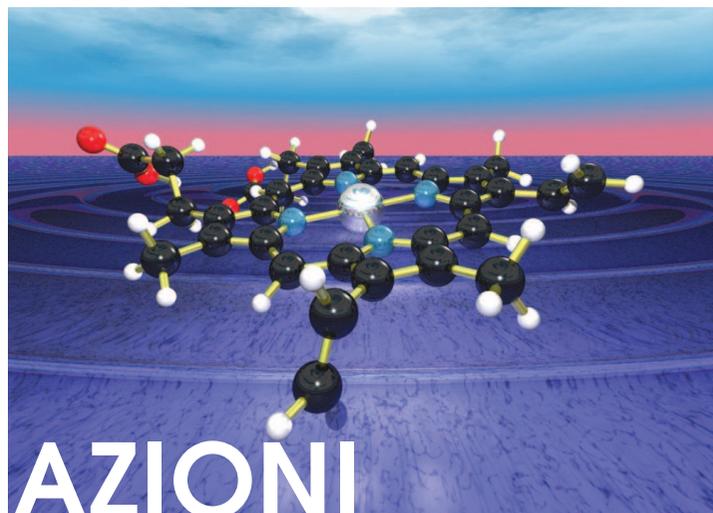


Stefano Colonna, Carlo Richelmi
 Istituto di Chimica Organica
 "Alessandro Marchesini" - Facoltà di Farmacia
 Università di Milano. stefano.colonna@unimi.it

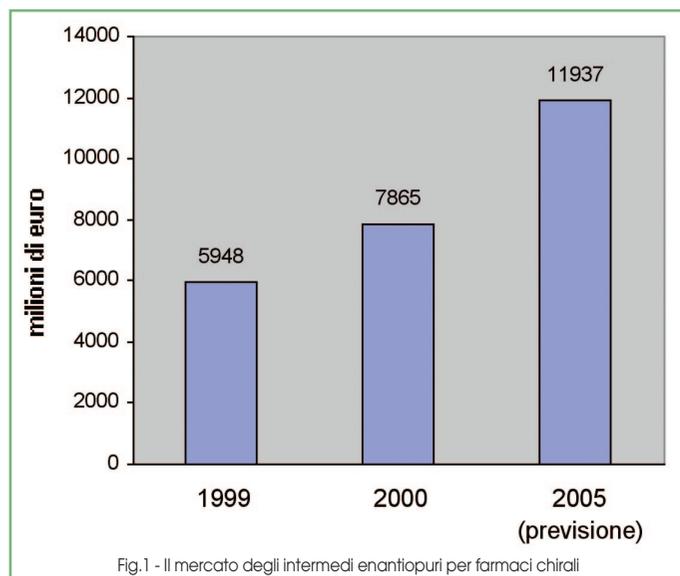


BIOTRASFORMAZIONI ORGANICHE

La biocatalisi trae indubbi vantaggi dalle proprietà tipiche delle reazioni catalizzate da enzimi, quali l'alta selettività, le condizioni blande e la minimizzazione dei reflui.

Vengono presentati vantaggi e svantaggi delle biotrasformazioni e i pro e i contro nell'uso di enzimi isolati e cellule intere. Viene discussa anche la risoluzione cinetica enzimatica in termini di rapporto enantiomerico (E), nonché la risoluzione dinamica e la asimmetrizzazione di composti meso.

Scopo della biocatalisi è lo sfruttamento delle speciali proprietà dei catalizzatori naturali, gli enzimi, grazie ai quali numerose reazioni di interesse industriale possono essere condotte con elevata selettività, minimizzazione dei reflui e condizioni blande, risolvendo in questo modo problemi di carattere chimico, ecologico e tecnologico. Da questo punto di vista, la biocatalisi non è solo un settore delle biotecnologie, ma costituisce un'area di grande interesse per lo sviluppo di altre discipline dell'ambito tecnico-scientifico come la chimica organica, la biochimica, la farmacologia, la chimica agraria e la medicina.



Non deve quindi sorprendere il fatto che ricerca e applicazioni nel campo delle reazioni biocatalizzate siano in continua crescita, in particolare per ciò che riguarda la produzione di intermedi enantiopuri per farmaci chirali (Figura 1) (1). Un'analisi degli aspetti favorevoli della biocatalisi evidenzia i seguenti punti di forza:

- 1) condizioni blande (la temperatura è spesso intorno ai 30 °C, non sono necessari ambienti fortemente acidi o basici), con una minore incidenza di reazioni collaterali;
- 2) elevata selettività: chemio-, regio-, diastereo- ed enantioselettività (a questo proposito, è assai significativo un esame delle pubblicazioni sulla sintesi asimmetrica di composti enantiopuri: la frequenza nell'uso di metodi biocatalitici è passata dallo 0% del 1970 all'attuale 15%);
- 3) vastissima gamma di reazioni catalizzabili: quasi tutto ciò che costituisce "l'arsenale" della sintesi organica è realizzabile in linea teorica anche con metodi biocatalitici (si può addirittura fare qualcosa in più, si veda in proposito l'idrossilazione degli alcani), con l'eccezione del riassetto di Cope e delle reazioni di Diels-Alder (in effetti per queste ultime è stato recentemente individuato almeno un enzima di origine fungina (2), del quale sono anche stati descritti i dettagli strutturali);
- 4) compatibilità reciproca di diversi enzimi: in una sola operazione si può realizzare un'intera sequenza di reazioni;
- 5) minor impatto ambientale (assenza di metalli pesanti, uso dell'acqua come solvente, basso consumo energetico).

Sono poi da sottolineare altri due aspetti, meno ovvi di quelli sopra menzionati, ma tali da allargare notevolmente gli ambiti applicativi della biocatalisi:

Vantaggi e svantaggi di enzimi isolati e cellule intere

Biocatal.	Forma	Vantaggi	Svantaggi
Enzimi isolati	Qualsiasi	Apparecchiatura semplice, work-up semplice, miglior produttività dovuta a maggiore tolleranza alla concentrazione	Necessità di riciclo dei cofattori
	Disciolti in acqua	Alta attività enzimatica	Possibilità di reazioni collaterali, insolubilità di substrati lipofili, necessità di estrazione in fase di work-up
	Sospesi in solventi organici	Facilità di esecuzione, solubilità di substrati lipofili, facilità di recupero dell'enzima	Bassa attività dell'enzima
	Immobilizzati	Facilità di recupero dell'enzima	Perdita di attività durante l'immobilizzazione
Cellule intere	Qualsiasi	Nessuna necessità di riciclo dei cofattori	Apparecchiatura costosa, work-up laborioso per i grandi volumi impiegati, bassa produttività dovuta a minor tolleranza alla concentrazione, bassa tolleranza ai solventi organici, reazioni metaboliche collaterali imprevedibili
	Colture in crescita	Attività enzimatica più elevata	Grande biomassa, maggior quantità di sottoprodotti, difficoltà di controllo del processo
	Cellule quiescenti	Work-up più facile, minor quantità di sottoprodotti	Minore attività enzimatica
	Cellule immobilizzate	Possibilità di reimpiego delle cellule	Minore attività enzimatica

1) possibilità di utilizzare solventi organici in sostituzione del naturale medium acquoso;

2) possibilità di operare anche su substrati sintetici, anziché sulle sole molecole naturali.

Non vanno comunque taciuti diversi problemi che ostacolano una più ampia diffusione delle tecniche biocatalitiche:

1) scarsa flessibilità dei parametri operativi;

2) diminuzione dell'attività catalitica in ambienti non acquosi;

3) frequenti fenomeni di inibizione (da substrato o da prodotto) dell'attività catalitica;

4) disponibilità di ciascun enzima naturale in una sola forma enantiomerica.

5) possibilità di allergie a carico degli operatori

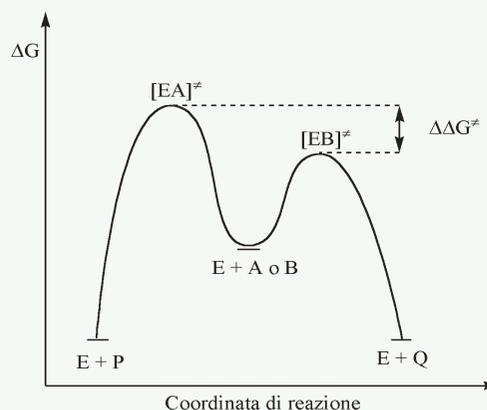
La forma fisica dei biocatalizzatori utilizzati in chimica organica può variare notevolmente: si va da enzimi isolati a cellule intere, e la scelta degli uni o delle altre dipende da vari fattori, tra cui il tipo di reazione e la scala con cui si intende condurre la trasformazione; un prospetto riassuntivo degli elementi da valutare è riportato in Tabella (3).

Metodologia

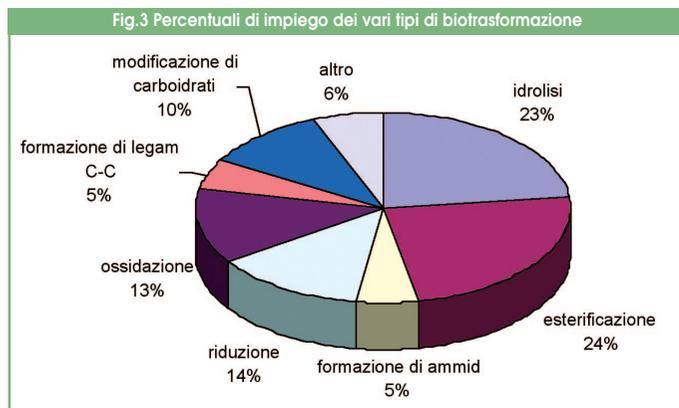
Come in qualunque altra reazione condotta in presenza di catalizzatori, anche nel caso di utilizzo degli enzimi l'aumento osservabile della velocità di reazione è attribuito a un abbassamento dell'energia di attivazione, grazie a una maggiore stabilità dello stato di transizione. È interessante notare come la stereoselettività delle reazioni enzimatiche venga spiegata sulla base di considerazioni analoghe: nel caso di due substrati enantiomeri i complessi attivati che hanno origine dal-

l'interazione con l'enzima sono in effetti strutture diastereoisomere e possiedono pertanto una diversa stabilità (ΔG^\ddagger nel grafico di Figura 2) che giustifica la formazione preferenziale di uno tra i due prodotti teoricamente possibili. Va sottolineato il fatto che già piccole differenze di stabilità dei complessi attivati diastereoisomeri permettono il conseguimento di elevati valori di purezza ottica: con ΔG^\ddagger pari a 1,74 kcal/mol l'e.e. raggiunge un valore del 90%. Si calcola che ad oggi siano più di 13.000 i lavori pubblicati sul tema delle biotrasformazioni organiche, 80% dei quali riferibili a risoluzioni cinetiche.

Figura 2 - Diagramma energetico per reazioni enantioselettive catalizzate da enzimi



E = enzima
A e B = substrati enantiomerici
P e Q = prodotti enantiomerici
[EA] ed [EB] = complessi enzima-substrato
‡ indica uno stato di transizione
 $\Delta\Delta G^\ddagger$ indica una differenza di energia libera



Non tutte le classi di enzimi disponibili sono sfruttate con la medesima frequenza, come dimostrato dal grafico (Figura 3), che si riferisce a dati raccolti nel corso del 1998 (4). La scelta più frequente è quella degli enzimi ad attività idrolitica: in effetti è disponibile in forma commerciale un gran numero di proteasi, esterasi e lipasi, che per l'impiego non necessitano di cofattori. Tra le diverse tipologie di biotrasformazione un'importanza crescente spetta però ai processi di ossidazione biocatalitica, specialmente a causa degli evidenti limiti delle metodologie tradizionali, che in qualche caso fanno uso di prodotti ad elevato impatto ambientale (ossidi dei metalli con alto numero di ossidazione), in altri semplicemente non esistono. Dato che l'uso di ossigenasi in forma isolata sarà sempre ostacolato dalla necessità di provvedere al riciclo di NAD(P)H, è probabile che reazioni di indubbia utilità come le mono- e le di-idrossilazioni, le epossidazioni, le solfossidazioni e le reazioni di Baeyer-Villiger continueranno anche in futuro ad essere realizzate con l'ausilio di cellule intere.

Un'alternativa promettente, in quanto non bisognosa di cofattori, è rappresentata dall'impiego di perossidasi perossido-dipendenti. L'uso di enzimi in solventi non acquosi costituisce ormai una metodologia standardizzata, con la quale è stata resa possibile la sintesi biocatalitica di un gran numero di esteri, lattoni, ammid, peptidi e peracidi. Un ulteriore sviluppo di questo settore è costituito da forme di vero e proprio "medium engineering": ci si basa sul principio per cui attraverso la scelta del solvente è possibile influire sull'efficienza dell'enzima (misurata dal suo numero di turnover) ma anche sulla sua selettività (in alcuni casi è addirittura possibile invertire le preferenze enantiomeriche dell'enzima). Al momento, il limite più evidente di questo approccio è l'assenza di una teoria generale che spieghi i fenomeni osservati e permetta di formulare previsioni sull'esito delle reazioni.

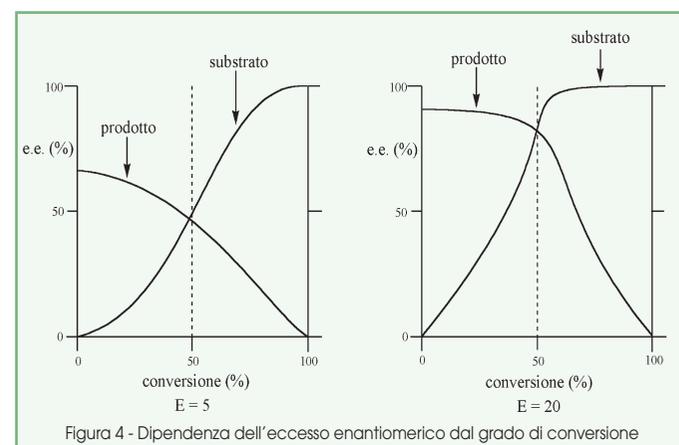
Per quanto riguarda la ricerca di enzimi con proprietà diverse da quelle dei biocatalizzatori noti, sono stati effettuati sforzi ingenti nel campo dell'ingegneria genetica (ad esempio mediante mutagenesi sito-specifica o per evoluzione diretta), ma è evidente che per ora la via più pratica per l'individuazione di nuove molecole con proprietà promettenti resta l'ampliamento delle tecniche di screening, alla ricerca di ciò che già esiste in natura: si stima che circa il 90% degli enzimi sia

ancora da scoprire, e la clonazione e la superespressione di biocatalizzatori disponibili anche solo in tracce può rendere disponibili quantità di enzima adeguate anche per operazioni su scala sintetica.

Risoluzione cinetica enzimatica

Tra le metodologie attualmente impiegate nel settore della biocatalisi un posto primario spetta alle risoluzioni cinetiche enzimatiche, che pur essendo particolarmente diffuse sono caratterizzate da alcuni svantaggi, particolarmente evidenti in operazioni di carattere preparativo, specie se su scala industriale:

- 1) ciascun enantiomero può essere ottenuto con una resa massima del 50%;
- 2) la separazione del prodotto dal substrato non reagito può essere complessa;
- 3) la purezza ottica del prodotto e/o del substrato può per ragioni cinetiche risultare insoddisfacente.



In effetti soltanto in casi ideali la differenza tra le velocità di reazione dei due enantiomeri è così marcata che solo l'enantiomero "buono" va incontro a rapida trasformazione, mentre l'altro non reagisce assolutamente. In una situazione del genere la reazione cesserebbe automaticamente al raggiungimento di un grado di conversione del 50%, in corrispondenza della completa scomparsa dell'enantiomero più reattivo. In pratica nella maggior parte dei casi la differenza tra le velocità di conversione dei due enantiomeri non è infinita, ma misurabile. Uno studio quantitativo dei parametri che caratterizzano la risoluzione cinetica enzimatica è stato sviluppato da Sih, e descrive in termini quantitativi il rapporto tra il grado di conversione (c) e l'eccesso enantiomerico di substrati (e.e._s) e prodotti (e.e._p). Il parametro che descrive la selettività della risoluzione è il "rapporto enantiomerico" (E), che dipende dal rapporto tra le velocità dei due processi in competizione, rapporto che rimane costante nel corso della reazione. Per reazioni irreversibili la relazione tra selettività e grado di conversione è descritta nelle seguenti equazioni:

per il prodotto

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + e.e.p)]}{\ln[1 - c(1 - e.e.p)]}$$

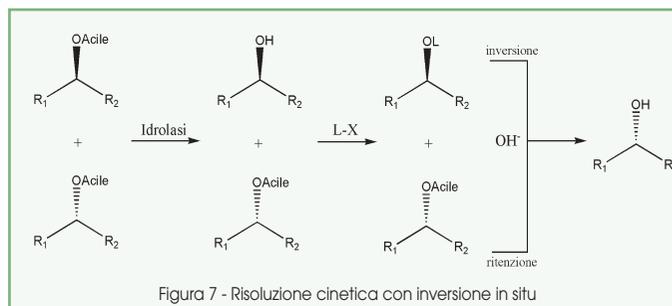
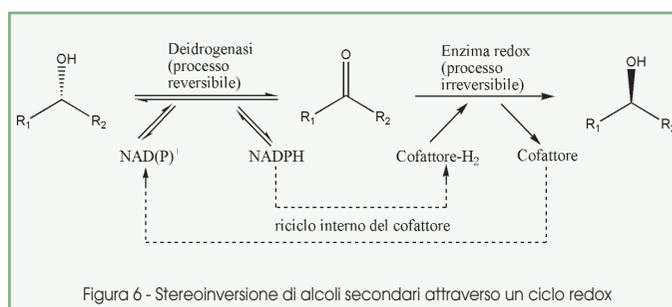
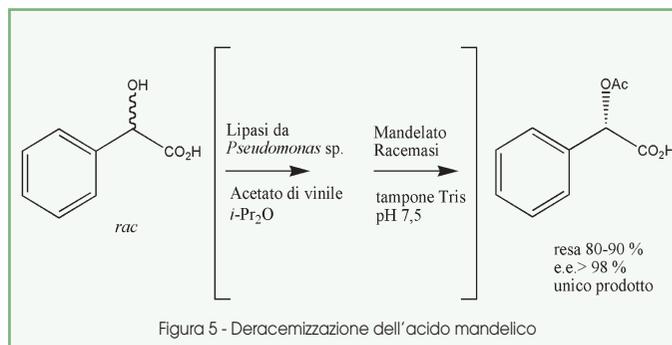
per il substrato:

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - e.e.s)]}{\ln[(1 - c)(1 + e.e.s)]}$$

in cui c = conversione; $e.e.p$ ed $e.e.s$ = rispettivamente, eccesso enantiomerico del prodotto e del substrato; E = rapporto enantiomerico. Con le equazioni indicate sopra, una volta scelto un determinato grado di conversione è possibile conoscere la purezza ottica ottenibile per substrati e prodotti, oppure dai dati empirici di conversione e purezza ottica calcolare E . In linea di massima, E si considera non accettabile per valori inferiori a 15, da discreto a buono tra 15 e 30, eccellente al di sopra di questi valori. Nella Figura 4 sono riportati due esempi di risoluzione cinetica enzimatica, caratterizzati rispettivamente da $E=5$ ed $E=20$. Un esame delle curve rappresentate mostra come per i prodotti valori elevati di purezza ottica siano raggiunti con gradi di conversione inferiori al 50%. Anche per i substrati la purezza ottica raggiunge buoni risultati già per conversioni intorno al 50%, e addirittura eccellenti intorno al 60%.

Risoluzione dinamica

Un approccio molto più elegante è rappresentato dalla cosiddetta risoluzione dinamica. Un processo di questo tipo si presenta come una risoluzione classica, con una caratteristica aggiuntiva: si opera in condizioni nelle quali i due enantiomeri del substrato stabiliscono un rapido equilibrio (racemizzano). Di conseguenza, man mano che l'enantiomero accettato preferenzialmente dall'enzima viene consumato, si ristabilisce costantemente l'equilibrio attraverso la racemizzazione dell'enantiomero meno reattivo. Al momento, la maggior parte delle racemizzazioni di interesse sintetico si realizza mediante catalisi chimica, ma questo non esclude la possibilità di un approccio diverso, come dimostrato dalla deracemizzazione di un acido α -idrossicarbossilico citata da Faber: mediante un sistema accoppiato di due enzimi si effettuano una risoluzione cinetica con trasferimento del gruppo acile (catalizzata da una lipasi) e una racemizzazione (catalizzata dalla mandelato racemasi). È degno di nota il fatto che la risoluzione catalizzata da lipasi di *Pseudomonas* sp. procede con elevatissima enantioselettività ($E=200$); inoltre, la mandelato racemasi è in grado di interagire con diversi substrati non naturali; infine, in alternativa ad essa è possibile utilizzare anche la lattato racemasi. Un secondo esempio di racemizzazione biocatalitica si basa su un sistema redox ciclico.



La risoluzione dinamica di alcoli secondari mediante racemizzazione *in situ* catalizzata da alcol deidrogenasi è realizzata senza necessità di riciclo dei cofattori (uno dei principali problemi pratici nella realizzazione di ossidoriduzioni biocatalitiche), sfruttando il fatto che il meccanismo di racemizzazione prevede un primo stadio di ossidazione, seguito da riduzione del chetone intermedio ad alcol secondario. In questo modo gli equivalenti dei cofattori possono essere scambiati tra le due reazioni, realizzando un bilancio redox netto pari a zero.

Inversione in situ

Un'altra strategia è l'inversione *in situ*. In una normale risoluzione cinetica si ottiene necessariamente una miscela di prodotto e substrato che può essere difficile separare, come nel caso in cui siano presenti una funzione alcolica e il suo estere. Tuttavia, se la molecola possiede un solo stereocentro, l'alcol formatosi preferenzialmente grazie all'intervento dell'enzima idrolitico può essere convertito nel suo enantiomero prima di procedere all'isolamento dei prodotti.

