

Lezione 9

Le Ossidoriduttasi

Le ossidoriduttasi sono enzimi interessanti da un punto di vista industriale. Le reazioni di ossidoriduzione sono efficienti anche con metodi chimici, se non ci sono problemi di stereochimica. Queste però sono molto inquinanti. Gli ossidanti chimici sono generalmente Sali di Cromo, che sono tossici e prevedono dei trattamenti di disattivazione e smaltimento speciale, con costi.

Avere a disposizione dei biocatalizzatori che operano reazioni di ossidoriduzione è particolarmente utile.

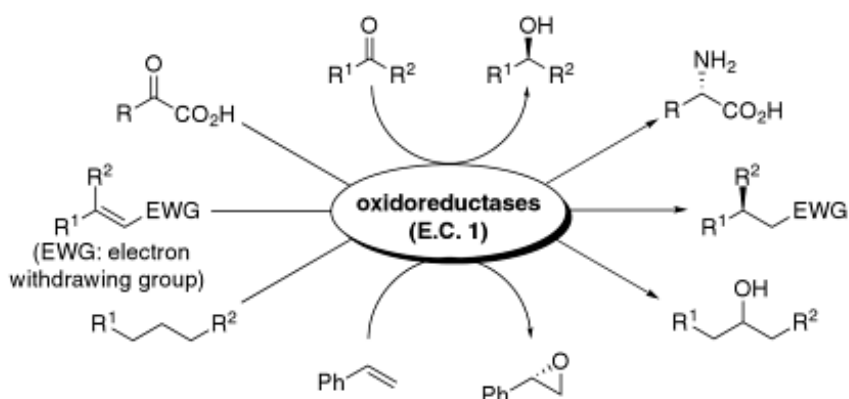
Vedremo la *alcol deidrogenasi* e la *leucina deidrogenasi*.

Considerazioni generali

Le ossidoreduttasi catalizzano *in vivo* reazioni di ossidoriduzione che possono essere usate per la sintesi di diversi composti organici. Tra le reazioni possibili troviamo:

- Trasformazione di α -chetoacidi in α -aminoacidi.
- Trasformazione di composti carbonilici in alcoli e viceversa.
- Trasformazione di doppi legami in epossidi (per mezzo di epossidasi).

Gli epossidi sono ottimi intermedi per reazioni di polimerizzazione. Nella sintesi del colesterolo la *squalene epossidasi* (monoossigenasi) effettua una reazione di epossidazione sullo squalene.



Scheme 1.1 Overview of selected reactions catalyzed by enzymes from EC 1 (oxidoreductases).

Leggi: *Anti-Markovnikov alkene oxidation by metal-oxo-mediated enzyme catalysis*. Stephan C. Hammer, Grzegorz Kubik, Ella Watkins, Shan Huang, Hannah Minges, Frances H. Arnold*

Da poco è apparso in letteratura il ritrovamento di un enzima promiscuo che è in grado di degradare la lignina per ottenere in maniera relativamente efficiente molecole aromatiche utili all'industria chimica.

La lignina è uno dei prodotti di scarto della lavorazione delle biomasse, e da queste si possono ottenere, con catalizzatori opportuni, una serie di composti aromatici attualmente ottenibili solo dal petrolio. Questi composti sono estremamente utili per l'industria chimica, per questo molte aziende stanno studiando soluzioni biocatalitiche per la processazione della lignina.

Leggi: *A promiscuous cytochrome P450 aromatic O-demethylase for lignin bioconversion*. Sam J.B. Mallinson, John E. McGeehan

Cofattori degli enzimi ossidoriduttivi

Gli enzimi ossidoreduttivi necessitano di cofattori per svolgere l'attività catalitica. I principali sono il NAD(P)H ed il FADH₂.

Dobbiamo conoscere la reattività di questi cofattori.

NAD⁺ e NADH

Il Nicotinamide Adenin Dinucleotide è formato dalla condensazione di due nucleotidi, dove il nucleotide è una struttura formata da una base azotata, uno zucchero ed almeno un gruppo fosfato.

Il NAD ha due basi azotate: l'adenina da una parte e la nicotinammide dall'altra. La nicotinammide è una base azotata, non facente parte delle basi azotate degli acidi nucleici.

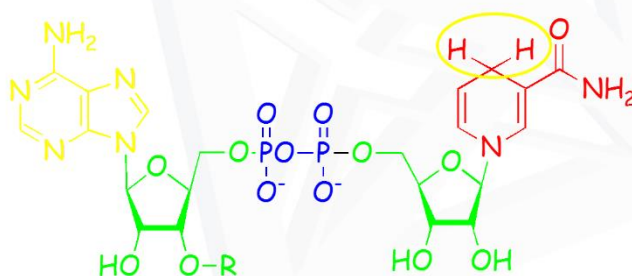
Abbiamo quindi le basi azotate adenina e nicotinammide, i due zuccheri entrambi ribosio, di cui quello legato all'adenina può essere fosforilato, e due gruppi fosfato che fanno da ponte tra gli zuccheri.

La nicotinammide si chiama così perché è stata caratterizzata per la prima volta dal signor Nicot, che è lo stesso che ha dato il nome alla nicotina, che però è strutturalmente diversa...

(**da wikipedia:** Nicotine is named after the tobacco plant *Nicotiana tabacum*, which in turn is named after the French ambassador in Portugal, Jean Nicot de Villemain, who sent tobacco and seeds to Paris in 1560, presented to the French King, ^[149] and who promoted their medicinal use. Smoking was believed to protect against illness, particularly the plague).

La parte reattiva dell'anello nicotinamidico è quella cerchiata in figura. Il carbonio sp³ porta due atomi di idrogeno.

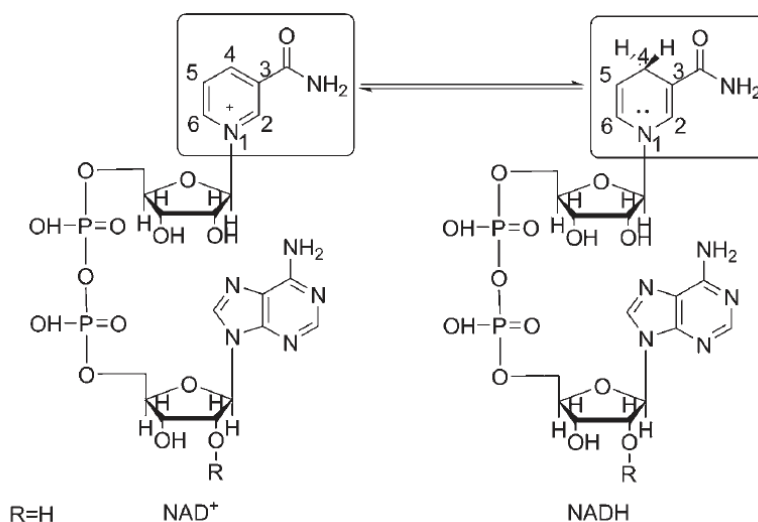
NAD(P)H = Nicotinammide Adenin Dinucleotide
(coenzima delle deidrogenasi)



Nell struttura vediamo che l'atomo di carbonio 4 dell'anello aromatico è ibridato sp^3 , e lega due idrogeni.

Da questa condizione il carbonio 4 perde uno ione idruro (H^- , che ha preso gli elettroni di legame), e si trasforma nella forma ossidata in cui sul carbonio 4 c'è un solo atomo di idrogeno.

Il resto della struttura del FAD resta inalterata. Il resto della struttura è importante perché senza quella la nicotinammide non sarebbe solubile in acqua.



Vediamo i passaggi per passare da una forma all'altra. Disegniamo solo la parte reattiva del NADH.

In presenza di un accettore di idruro, quale ad esempio una forma carbonilica.

La forma carbonilica avrà un O elettronricco ed un C elettronpovero.

Sull'azoto della nicotinammide c'è un doppietto libero. Grazie a questo il NADH può cedere uno ione idruro in presenza di un accettore di uno ione idruro, nell'esempio il carbonile del chetone.

L'azoto elettronricco dell'anello può utilizzare il doppietto in strutture di risonanza, e quindi delocalizzato, che favoriscono la fuoriuscita di un atomo di idrogeno dall'anello.

Se il doppietto dell'N si sposta sul carbonio adiacente, si rompe il legame π che si sposta sul carbonio adiacente, che però è sp^3 e lega 2 idrogeni. Affinche quel carbonio possa accettare gli elettroni deve rompere un legame, che sarà quello con uno degli H. L'H uscirà come ione idruro H^- , portandosi gli elettroni di legame.

L'idruro in uscita viene ceduto al gruppo carbonile accettore.

I prodotti sono il NAD in forma ossidata NAD^+ e un chetone in forma ridotta, che è un alcolato che verrà protonato dal mezzo di reazione, per arrivare all'alcol, che è il prodotto finale (ad esempio nelle alcol deidrogenasi).

Il sistema $NADH / NAD^+$ è all'equilibrio, può essere quindi utilizzato sia per reazioni di riduzione che di ossidazione del substrato. Questa proprietà deriva dalla presenza di N nell'anello della nicotinammide.

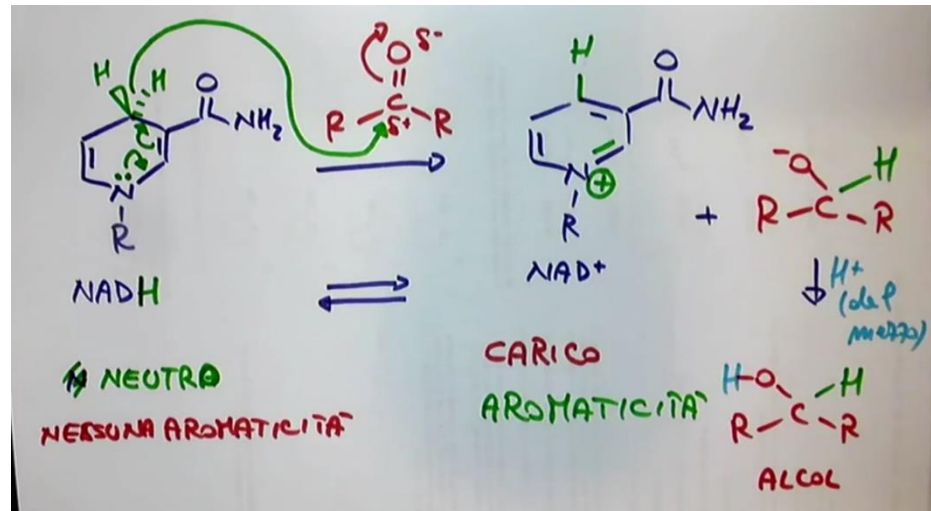
Sia la forma ridotta che quella ossidata hanno dei fattori stabilizzanti, e questo permette la facilità di conversione tra le due forme.

Il NADH è stabile perché non possiede cariche, è una struttura neutra che lo rende stabile. Il NADH non è aromatico, quindi meno stabile, perché il carbonio 4 che è ibridato sp^3 interrompe la delocalizzazione degli elettroni sull'anello.

Il NAD^+ ha una carica positiva sull'N che ha ceduto il doppietto elettronico. Questo è un effetto destabilizzante. Il NAD^+ è stabilizzato dall'aromaticità, quindi doppi legami e risonanza sull'anello.

Le condizioni necessarie per l'aromaticità sono:

- Sistema ciclico
- Sistema planare
- Tutti gli atomi devono essere ibridati sp^2 ed avere un doppietto elettronico nell'orbitale p.
- Gli elettroni π di un sistema aromatico devono essere $4n + 2$ (????)



FAD

In base alla ossidoriduttasi in esame si può avere la presenza di un cofattore alternativo al NAD, e questo è il FAD, acronimo di Flavin Adenin Dinucleotide. L'enzima è fortemente specifico per il cofattore.

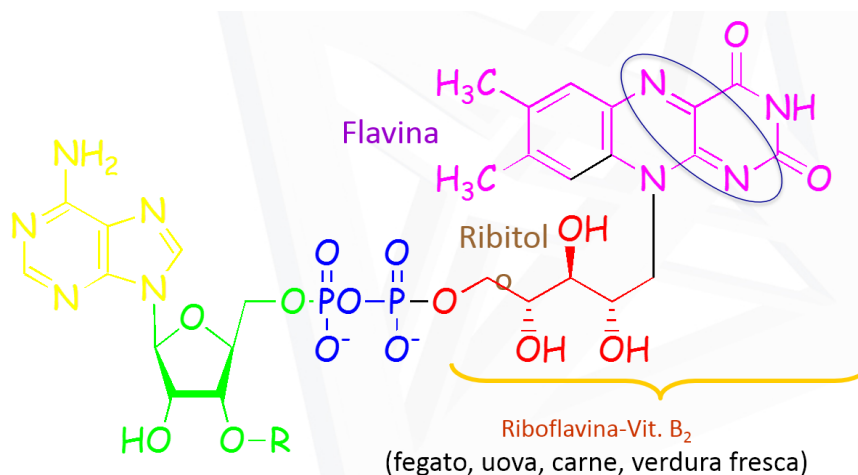
La struttura del FAD si compone di due basi azotate: l'adenina e la flavina. La flavina è una base azotata a tre cicli aromatici.

Oltre alle due basi azotate troviamo due residui di carboidrati, il ribosio ed il ribitolo e due gruppi fosfato che fanno da ponte tra le due unità nucleotidiche.

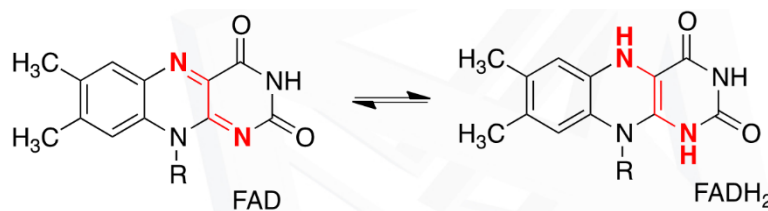
Il ribitolo è la forma ridotta del ribosio, che in ambito nutrizionale è definito riboflavina o vitamina B₂ quando legato alla flavina.

La riboflavina è particolarmente abbondante nel fegato, nelle uova, nella carne e nelle verdure fresche.

La parte reattiva del cofattore FAD è l'anello flavinico, nello specifico la parte cerchiata nell'immagine.



La forma ridotta è il FADH₂, la cui struttura prevede che i due atomi di N legati con carboni sp² tramite doppio legame, vengano idrogenati e trasformati in gruppi NH. I due doppi legami inizialmente presenti diventano legami semplici ed il legame doppio viene spostato tra i due atomi di C che fanno da giunzione tra i due anelli aromatici.



Il meccanismo di reazione del FAD è variabile. Nel NAD abbiamo sempre il legame o il distacco di uno ione idruro. Nel FAD, che accetta 2 H e 2 e⁻, questi possono essere trasferiti con varie modalità, a seconda della reazione. Ad esempio si possono trasferire un idruro H⁻ ed un idrone H⁺, oppure due atomi di H, ciascuno con un e⁻, a seconda della reazione in cui il FAD partecipa.

Al livello industriale quando sono necessari i cofattori, si tende ad usarli in quantità catalitiche, non in quantità stechiometriche, perché altrimenti sarebbe troppo costoso. Il cofattore usato in quantità catalitiche va necessariamente rigenerato in maniera efficiente.

Le alcol deidrogenasi (ADH)

Considerazioni generali

Le **alcol deidrogenasi** normalmente lavorano su substrati che sono *gruppi carbonilici* chetonici o aldeidici che possono essere ridotti ai corrispondenti alcoli, oppure viceversa possono catalizzare la reazione opposta in cui l'alcol può essere ossidato al corrispondente chetone o aldeide.

Nella reazione di riduzione si passa da un carbonio sp² prostereogenico del carbonile ad un carbonio ibridato sp³, che a seconda dei sostituenti può diventare uno stereocentro.

Viceversa nella reazione di ossidazione si parte da un atomo di carbonio ibridato sp³ che potrebbe essere uno stereocentro, che viene trasformato in un C sp² che non è stereogenico.

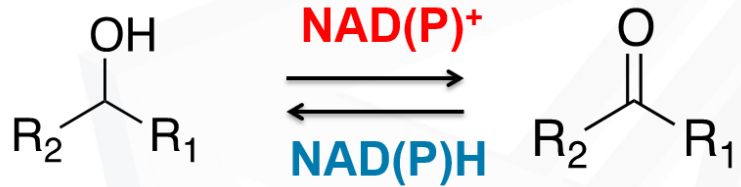
Se si lavora in riduzione del substrato, la riduzione di aldeidi o chetoni sarà stereoselettiva, darà quindi un solo enantiomero dell'alcol. Questo è molto interessante nella produzione industriale di alcol chirali enantiomericamente puri, che sono intermedi importanti nella chimica fine.

L'ossidazione stereoselettiva di un alcol ad aldeide o chetone permette la risoluzione dei racemi, perché l'enzima catalizzerà la conversione di un solo enantiomero nel relativo prodotto.

Le reazioni catalizzate dalle alcol deidrogenasi sono utili sia nella riduzione che nell'ossidazione. La riduzione da aldeidi e chetoni ad alcol è stereoselettiva, produrrà quindi un solo enantiomero dell'alcol. L'ossidazione dell'alcol ad aldeide o chetone è stereoselettiva, perché solo uno dei due enantiomeri dell'alcol è substrato dell'enzima, e permette la risoluzione del racemo.

Nelle alcol deidrogenasi il cofattore usato è generalmente il NAD^+/NADH e $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. Questo cofattore deve essere rigenerato. Le alcol deidrogenasi sono in genere specifiche per il cofattore, una ADH che lavora col NAD^+

generalmente non lavora con NADP^+ . In alcuni microorganismi, tra cui il *Lactobacillus*, lavorano entrambe le forme di cofattore.



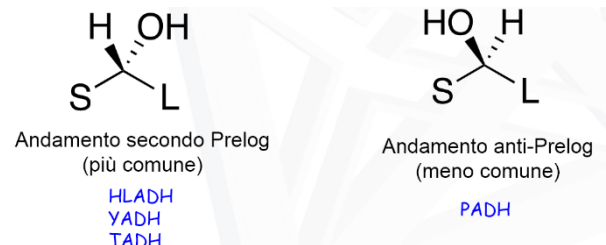
Il NAD^+ è molto più conveniente del NADP^+ , perché quest'ultimo è meno stabile. Inoltre la forma ossidata è sempre più economica della forma ridotta, perché più stabile *ex-vivo*.

Stereoselezione e specificità di substrato

In genere alcoli e chetoni con entrambi i sostituenti ingombranti sono pessimi substrati (tranne per le idrogenasi di *Lactobacillus*).

Le alcol deidrogenasi sono stereoselettive, e la stereoselezione dipende da quale ADH stiamo analizzando.

Alcune alcol deidrogenasi lavorano con andamento Prelog, altre con andamento anti-Prelog. Questa conoscenza ci permette di dare indicazioni sulla selettiva ad un enantiomero.



La capacità di stereoselezione del substrato dipende dal sito attivo dell'enzima. L'enzima avrà coordinato il

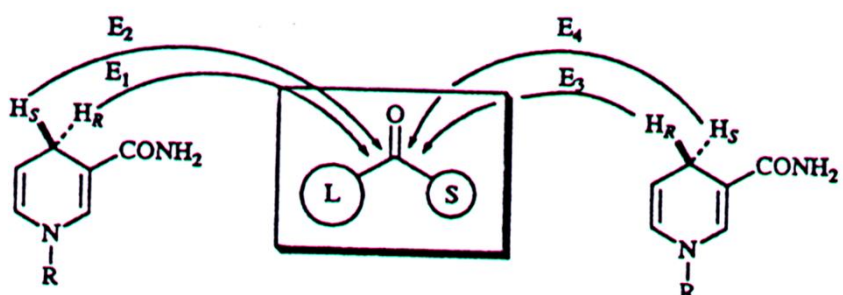
cofattore nei pressi del sito attivo. Quando l'enzima coordina anche il substrato, questo si troverà già in posizione, quindi la reazione avverrà in modo stereoselettivo, secondo disposizioni spaziali ben definite.

Il substrato entra nel sito attivo orientato in un certo modo, perché guidato dai residui aminoacidici del sito attivo dell'enzima.

Il substrato legato al sito attivo verrà quindi attaccato dal cofattore in una posizione specifica, che dipenderà dal posizionamento del cofattore rispetto al substrato. Il posizionamento dipende dalla struttura della alcol deidrogenasi, e varierà in base all'enzima specifico. La disposizione relativa di substrato e cofattore sarà quella che darà la specificità nella stereoisomeria del prodotto.

Immaginando la reazione in cui il NADH riduce il suo substrato vediamo che il C4 della nicotinammide lega 2 H. Questi atomi di idrogeno sono tra loro in relazione diastereoisomerica. Se si modifica uno di questi con un altro sostituyente si darà luogo a due diastereoisomeri.

L'ADH sceglie in maniera specifica uno dei due H sulla nicotinammide da cedere al substrato. In ogni caso l'H scelto dall'enzima non influenza la



stereochemica del prodotto finale.

Si conoscono ADH che svolgono 3 delle 4 combinazioni possibili di trasferimento-attacco dell'idrogeno.

E1 trasferisce l'H pro R sulla faccia Si del carbonile

E2 trasferisce l'H pro S sulla faccia Si del carbonile

E3 trasferisce l'H pro R sulla faccia Re del carbonile

Non si conoscono enzimi ADH che catalizzano il trasferimento dell'H pro S sulla faccia Re del carbonile.

Regioselezione

Le ADH sono in grado di lavorare su dei dioli. Su questi substrati l'enzima è in grado di catalizzare una reazione di ossidazione stereoselettiva ed allo stesso tempo di selezionare lo stereoisomero con una configurazione specifica dello stereocentro. Effettua quindi allo stesso tempo una risoluzione ed una ossidazione regioselettiva.

Specificità di substrato

Le HL-ADH (Horse Liver) lavorano bene su chetoni ciclici e su 2- o 3- chetoesteri.

Le TB-ADH (*Thermoanaerobacter brockii*) lavorano bene su metil ed etilchetoni

Le ADH da *Lactobacillus* riducono una vasta gamma di chetoni, con bassa specificità di substrato.

Rigenerazione di cofattore

Il cofattore deve essere rigenerato, perché i costi di una continua immissione di nuovo cofattore non sono sostenibili dal punto di vista economico.

Abbiamo diversi metodi per la rigenerazione, distinguibili in metodi enzimatici, chimici, elettrochimici e fotochimici.

I **metodi fotochimici** consentono di utilizzare fotoni per la rigenerazione, hanno bassi costi. Sono però mezzi poco efficienti, specialmente nella regione della radiazione elettromagnetica del visibile. Servono inoltre biosensibilizzatori, che permettono di trasferire l'energia dalla radiazione elettromagnetica al cofattore. Inoltre aggiungendo altri elementi alla miscela si deve poi purificare ulteriormente.

I **metodi elettrochimici** richiedono energia elettrica per il funzionamento. Il sistema ha un basso numero di turnover del cofattore, si riesce a rigenerare il cofattore per un basso numero di cicli. Gli elettrodi vanno puliti nel tempo per mantenerne l'efficienza. Anche qui servono molecole che mediano il trasferimento di energia elettrica al cofattore.

Nei **metodi chimici** si utilizzano spesso sali inorganici, H_2 (idrogeno molecolare), specie ossidanti come O_2 . I costi sono generalmente bassi, ma il numero di turnover è basso e la selettività è bassa. In ambiente

ossidante ad esempio si può avere sia l'ossidazione del cofattore che del substrato. I reagenti chimici vanno purificati dalla miscela e smaltiti successivamente. Low Atom Economy, nel senso che utilizzo solo pochi dei reagenti in miscela per ottenere i prodotti, gli altri vanno smaltiti.

I **metodi enzimatici** utilizzano biocatalizzatori per la rigenerazione dell'enzima. Hanno il vantaggio di essere sostenibili, hanno un elevato numero di turnover, la selettività è molto alta e possono essere combinati in situ con la reazione di interesse. Gli svantaggi sono che a volte i biocatalizzatori sono instabili e costosi. La miscela va purificata, il che può essere complesso.

Metodi enzimatici

Abbiamo essenzialmente tre sistemi che ci permettono di rigenerare il cofattore attraverso metodi enzimatici:

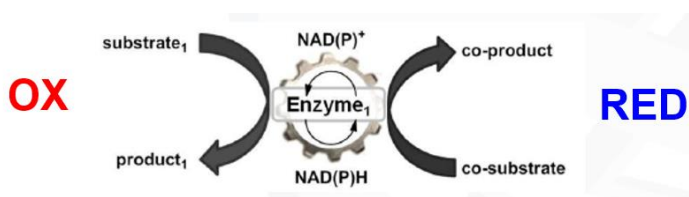
- Sistemi multisubstrato

I sistemi multisubstrato prevedono di avere il substrato di interesse che viene ossidato o ridotto al prodotto di interesse attraverso cofattore ed enzima. Se il substrato viene ossidato

si avrà un trasferimento di uno ione idruro dal substrato al NAD⁺ che diventa NADH.

Per rigenerare il NADH in NAD⁺ si inserisce un co-substrato che viene ridotto nel coprodotto.

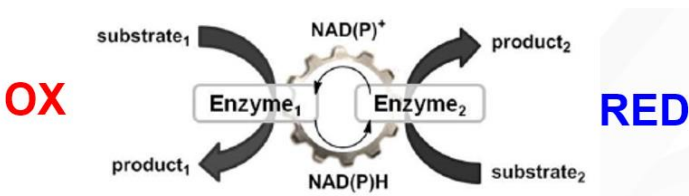
Si ha quindi un substrato per la reazione, un co-substrato per la rigenerazione del cofattore ed un enzima per lo svolgimento della redox.



- Sistemi multienzimatici

Nei sistemi multienzimatici la reazione di interesse, ad esempio una ossidazione che utilizza un substrato, un cofattore ed un enzima per dare un prodotto, viene accoppiata ad una seconda reazione nel senso opposto, quindi riduzione, che avviene su un altro substrato, è catalizzata da un altro enzima ma utilizza lo stesso cofattore facendo fare il processo inverso alla prima reazione.

In questo modo il cofattore viene rigenerato dal secondo enzima nella seconda reazione.



- Cellule intere

È spesso il metodo più conveniente.

La scelta del metodo enzimatico per la rigenerazione del cofattore dipende dalla reazione di interesse. A priori l'ideale potrebbe essere il sistema a cellule intere, ma gli altri sistemi sono molto utili in alcune condizioni.

Sistema multisubstrato

Il cofattore viene rigenerato da una reazione complementare da parte della stessa deidrogenasi che effettua la trasformazione sul substrato di interesse.

Uno dei vantaggi del sistema multisubstrato è proprio avere un solo enzima. L'equilibrio si sposta verso la produzione del prodotto di interesse quando si ha un eccesso di co-substrato per la reazione di rigenerazione del cofattore.

L'eccesso di co-substrato potrebbe portare ad inibizione da co-substrato. Il co-substrato è in genere un alcol o un chetone a basso peso molecolare, quindi acetone o isopropanolo. Questi sono solventi organici, quindi la ADH deve essere stabile in condizioni operative.

La forma ridotta del cofattore è sempre meno stabile di quella ossidata.

I cosubstrati spesso utilizzati sono 2-propanolo o etanolo, che spesso disattivano gli enzimi. La HL-ADH e la ADH da *Lactobacillus* sono resistenti a queste condizioni, e mantengono circa l'80% di attività.

Il cofattore ha un turnover di circa 20.000 cicli, dopo i quali va sostituito.

Alcune ADH sono state ingegnerizzate per essere resistenti all'isopropanolo.

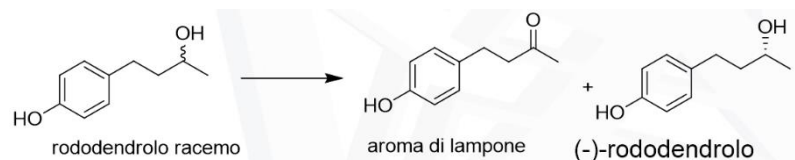
Ossidazione

Quando utilizziamo sistemi multisubstrato per ossidare il composto di interesse si sta facendo un processo di risoluzione. L'ossidazione funziona bene quando nello stereocentro sp³ uno dei sostituenti è grande (sostituenti ciclici, aromatici, catene sature o insature fino a 10C), mentre l'altro è piccolo (Metil, etil).

L'acetone viene spesso utilizzato come co-substrato per rigenerare il cofattore, e viene ridotto ad isopropanolo. L'acetone funge anche da co-solvente per solubilizzare i prodotti.

Un esempio di processo è la sintesi dell'aroma di lampone e del (-)-rododendrolo.

L'aroma di lampone può essere ottenuto per via sintetica in due modi diversi.

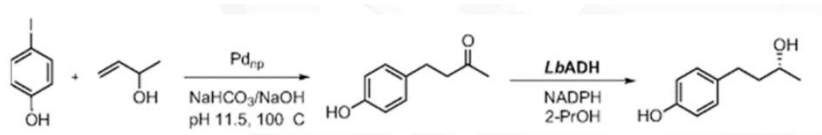


Un metodo è partire dal rododendrolo racemo, che viene ossidato da una ADH che agisce in maniera regioselettiva sull'ossidrile secondario, lasciando inalterato l'ossidrile fenolico.

Partendo da racemo si ottiene l'aroma di lampone e il (-)-rododendrolo. Quest'ultimo è un intermedio per l'industria farmaceutica e cosmetica.

Un altro metodo per la sintesi del (-)-rododendrolo è un processo chemoenzimatico che prevede due stadi sintetici.

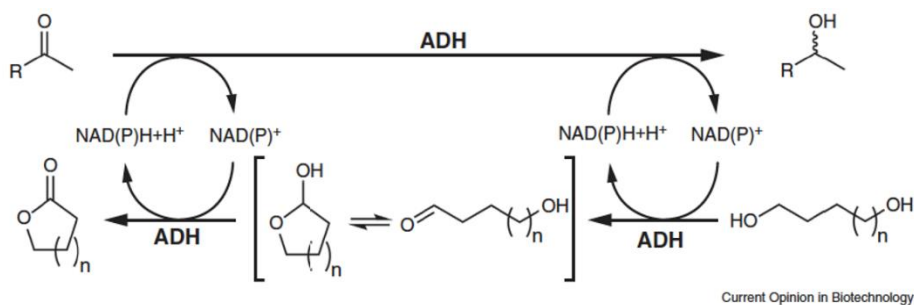
In una prima fase si sintetizza per via chimica l'aroma di lampone con una reazione di accoppiamento aromatico. Si ottiene il chetone che viene ridotto da Lb-ADH che produce (-)-rododendrolo con una resa del 90% ed un eccesso enantiomerico del 99%.



Riduzione

Un ulteriore utilizzo del sistema multisubstrato è il seguente esempio, in una reazione di riduzione del substrato.

Come co-substrato è possibile usare un diolo invece di un alcol semplice, che porta due gruppi OH. Questo permette di ridurre due moli di cofattore con una mole di co-substrato, con aumento dell'efficienza e riduzione dei costi.



Se il diolo usato è a basso peso molecolare si troverà in fase liquida, fungerà sia da co-substrato che da solvente.

Il primo intermedio dell'ossidazione del diolo co-substrato darà una idrossiadeide, che non sarà stabile nelle condizioni di reazione e ciclizzerà dando luogo ad un emiacetale. L'emiacetale viene nuovamente ossidato sul secondo ossidrile, portando ad un estere ciclico che prende il nome di lattone.

Il lattone è una molecola molto stabile, specialmente se il ciclo è a 5 termini. La produzione di un prodotto così stabile sposta la reazione verso la produzione dei prodotti, rendendola di fatto irreversibile.

Sistemi Multienzimatici

Nei sistemi multienzimatici la reazione di interesse procede con substrato, enzima e cofattore. Per rigenerare il cofattore si accoppia una seconda reazione che effettua la redox nel senso opposto alla reazione principale. Nella seconda reazione si usa un secondo enzima, detto co-enzima, il suo substrato e lo stesso cofattore della prima reazione, che catalizzerà la reazione opposta a quella della reazione di interesse, rigenerando il cofattore.

La scelta del co-enzima è molto delicata per il buon esito della reazione.

Il fatto di avere due enzimi aumenta sicuramente i costi e la complessità del processo. Si deve sempre prestare attenzione al fatto che i due enzimi che operano nelle due reazioni abbinate siano specifici per la stessa forma del cofattore (fosforilata o meno), altrimenti quest'ultimo non potrà essere rigenerato.

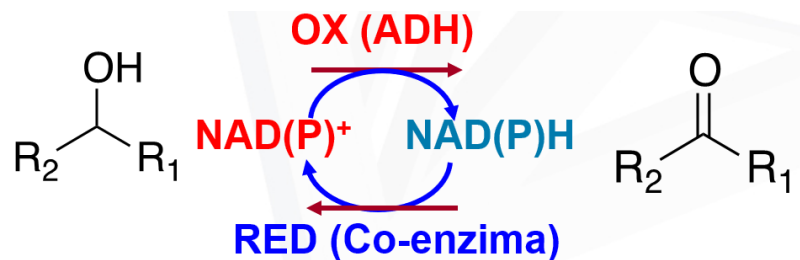
Reazioni di Ossidazione

Se la reazione di interesse prevede l'ossidazione del substrato il cofattore verrà ridotto nella reazione.

Per essere rigenerato, il cofattore dovrà quindi essere a sua volta ossidato nella reazione abbinata.

Pochi enzimi sono in grado di convertire NAD(P)H in NAD(P)^+ e di effettuare quindi l'ossidazione del cofattore. La *glutammato deidrogenasi* accetta sia NADPH che NADH . La *lattato deidrogenasi* accetta solo NADH .

Per convertire NAD(P)^+ in NAD(P)H , e quindi ridurre il cofattore, abbiamo una scelta più ampia di enzimi tra cui scegliere. Glc DH (glucosio), Glc-6P DH e ADH da *Lactobacillus* accettano sia NADP^+ che NAD^+ . La *formiato deidrogenasi* FDH accetta solo NAD^+ .



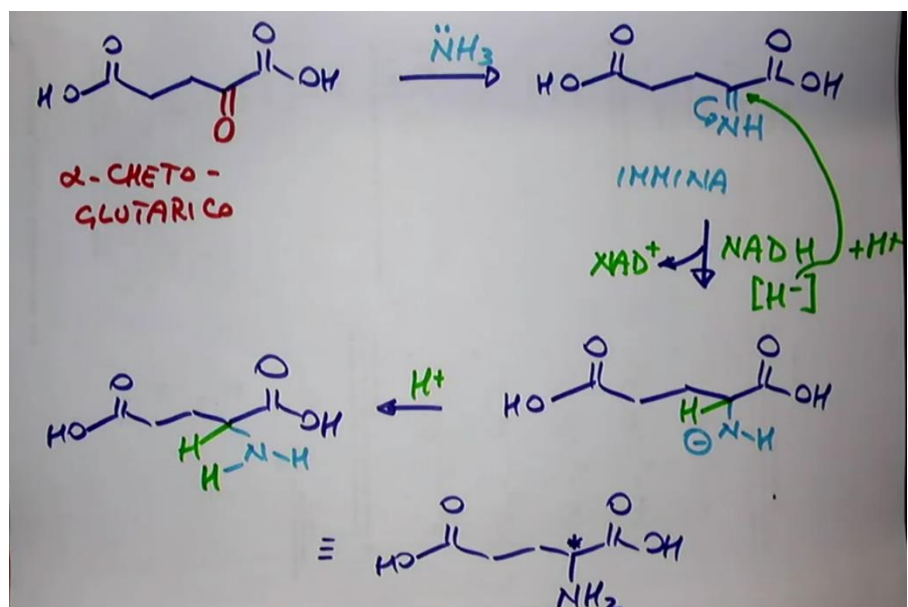
La FDH è molto interessante perché la reazione che catalizza produce come sottoprodotto CO_2 , che essendo gassosa si allontana dal mezzo di reazione. Questo semplifica il processo di purificazione, ed inoltre sposta la reazione verso i prodotti.

Esempio glutammato deidrogenasi come enzima accoppiato (OSSIDAZIONE DEL SUBSTRATO)

La Glutammato deidrogenasi accetta sia NADPH che NADH . Viene utilizzata come coenzima per reazione riduzione del substrato e quindi ossidazione del cofattore.

La reazione catalizzata dalla glutammato deidrogenasi prevede la trasformazione dell'acido α -chetoglutarico in acido glutammico, che è un α -amminoacido.

Serve una fonte di azoto. In genere si usano Sali di ammonio, che danno una reazione di equilibrio acido-base con la liberazione di ammoniaca, NH_3 , che è una fonte di azoto nucleofila.



Acido α -chetoglutarico ed Acido glutammico hanno catene carboniose a 5 atomi di Carbonio. Entrambi sono acidi dicarbossilici, perché due dei cinque atomi della catena carboniosa portano gruppi carbossilici. In posizione α rispetto ad uno dei due carbossili troviamo un carbonile.

L'acido α -chetoglutarico, con catalisi enzimatica, in presenza di un donatore di azoto quale l' NH_3 , prevede la formazione della corrispondente immina. L'immina, in presenza dell'enzima glutammato deidrogenasi e del cofattore NADH, sarà attaccata dal NADH che riconosce il C elettrone povero che lega il gruppo imminico in maniera chemoselettiva. Il NADH perde uno ione idruro, che si lega al carbonio sp^2 che è elettrone povero, e che diventa sp^3 . Si otterrà quindi NAD^+ .

Il cofattore NADH cedendo l'elettrone diventa NAD^+ . L'intermedio creato dall'attacco nucleofilo del NADH sulla funzione imminica non sarà stabile, e verrà stabilizzato per protonazione dal mezzo di reazione dando luogo ad un gruppo amminico legato ad un carbonio sp^3 , quindi uno stereocentro.

Il prodotto ottenuto è l'acido glutammico, nel caso specifico l'enantiomero acido L-glutammico.

La glutammato deidrogenasi col sistema NADH/NAD^+ rigenera il cofattore nella forma ossidata NAD^+ e produce acido L-glutammico.

Formazione dell'immina

Il primo passaggio di questa reazione è la formazione della immina. La reazione è normalmente catalizzata da H^+ . Nel caso della biocatalisi ci sarà un residuo dell'enzima che protona.

Il C che viene protonato in modo regio e chemoselettivo sul carbonile chetonico dà luogo ad uno ione ossonio, con l'O che lega un protone H^+ ed assume una carica positiva.

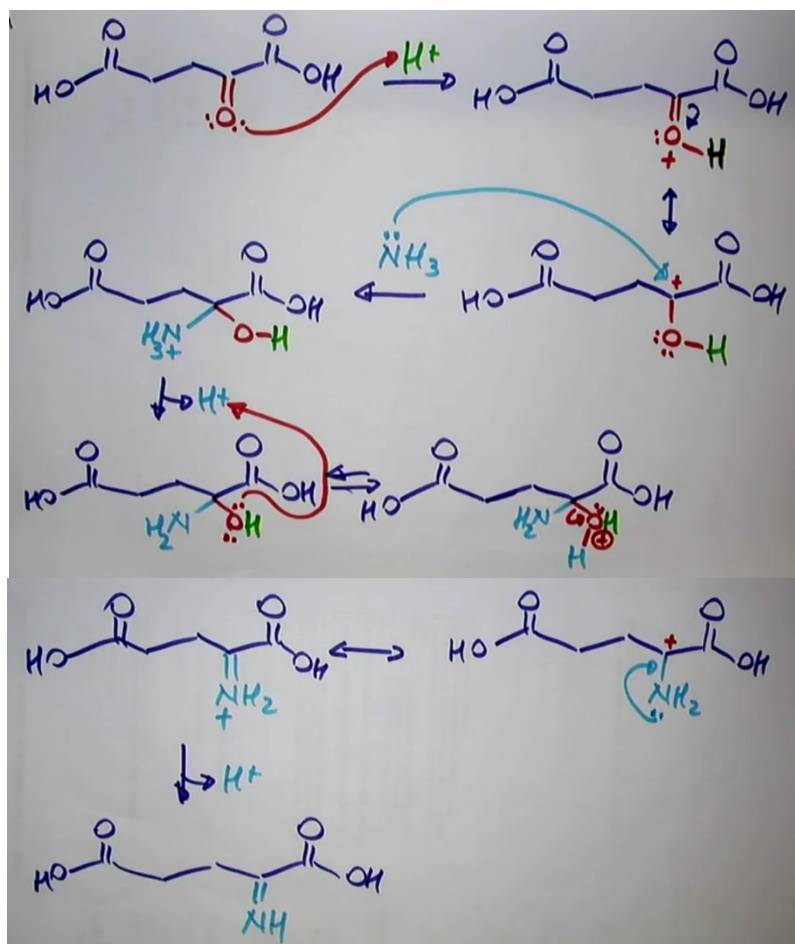
Lo ione ossonio è stabilizzato per risonanza, e questo rende il C

elettrone povero. La lacuna elettronica sull'atomo di C può essere colmata da una specie elettrone ricca, che nel sistema considerato è l'azoto dell'ammoniaca NH_3 .

L'N di NH_3 darà un attacco nucleofilo sul C carico positivamente. Siccome l'N condivide il suo doppietto elettronico assumerà una carica positiva,

rilasciando un H^+ nel mezzo di reazione. L' H^+ rientra nella reazione per protonare l'O dello ione ossonio.

L'O ha condiviso due dei suoi doppietti elettronici con i due H^+ che ha legato, e ne condivide un altro con il C della catena carboniosa. Vorrebbe riprendersi i suoi elettroni e ci sono due opzioni: rilasciare l' H^+ che ha



appena legato o rompere il legame con il C della catena. La reazione è in equilibrio. Nel momento in cui si rompe il legame C-O viene rilasciata H_2O e C diventa un carbocatione che lega una ammina NH_2 . L'N dell'ammina condivide il suo doppietto con C formando un doppio legame.

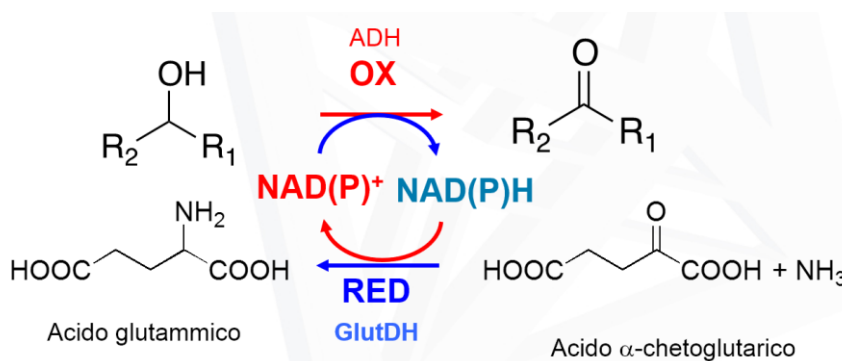
A questo punto N è carico positivamente come NH_2^+ con un doppio legame. Rilascia quindi un H^+ trattenendo gli elettroni di legame, formando l'immina.

GluDH

I passaggi precedenti vanno conosciuti.

Se il substrato viene ossidato la reazione abbinata deve essere una riduzione.

La fonte di azoto nella reazione sono Sali di ammonio che vengono aggiunti alla miscela di reazione.



Reazioni di riduzione

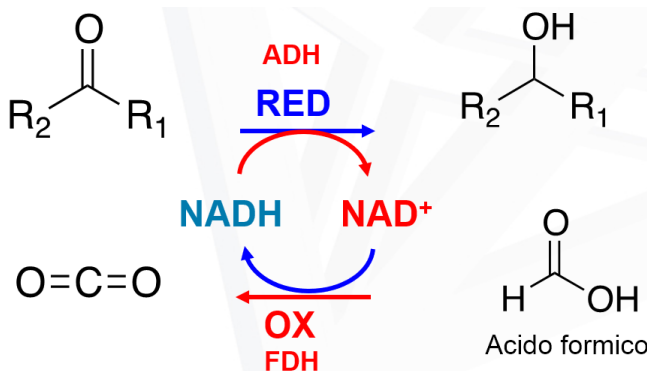
Vedremo due dei vari enzimi che ci possono essere utili per rigenerare il cofattore nelle reazioni di riduzione, che sono la *formiato deidrogenasi* e la *glucosio deidrogenasi*.

Formiato deidrogenasi come enzima accoppiato (REAZIONI DI RIDUZIONE)

La formiato deidrogenasi è particolarmente conveniente perché abbina la reazione di riduzione del substrato ad una reazione di ossidazione dell'acido formico in anidride carbonica, con riduzione del cofattore NAD^+ in $NADH$.

L'acido formico a pH fisiologico è dissociato, come formiato. Il prodotto di reazione è CO_2 , che uscendo dalla miscela di reazione in forma gassosa sposta la reazione verso i prodotti.

L'ADH in questo effettua una reazione selettiva, con produzione in maggioranza di uno dei due enantiomeri possibili.



L'idruro H^- che viene ceduto nella reazione accoppiata al NAD^+ affinché questo venga ridotto a $NADH$ deriva dall'acido formico. Bisogna capire quale dei due idrogeni si lega al NAD^+ , considerando che l'H se ne va con entrambi gli elettroni di legame. L'H legato al carbonio è quello che viene rilasciato come idruro, perché l'H legato all'O è un H acido che viene rilasciato in soluzione come H^+ .

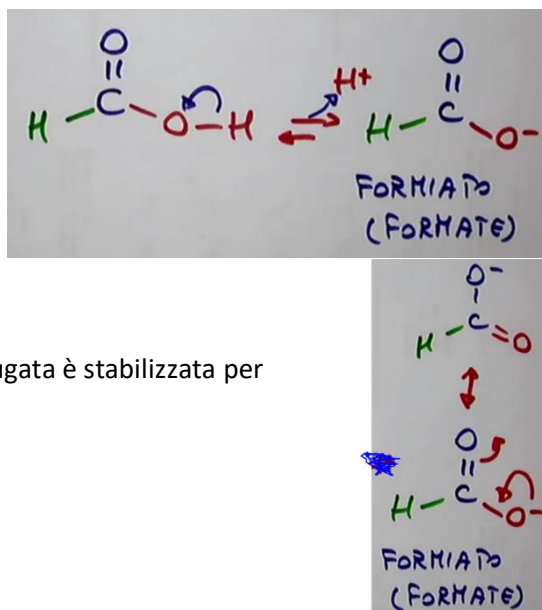
La formiato deidrogenasi lavora solo con NAD^+ e non con NADP^+ , ed ha una bassa attività. Ci sono quindi possibilità di miglioramento.

Vediamo come il formiato sia un donatore di idruro.

L'*acido formico* è l'acido carbossilico più semplice, ha solo un C. La dissociazione dell' H^+ del carbossile dà luogo al *formiato*. Gli elettroni di legame rimangono all'O, che è più elettronegativo e prende carica negativa O^- .

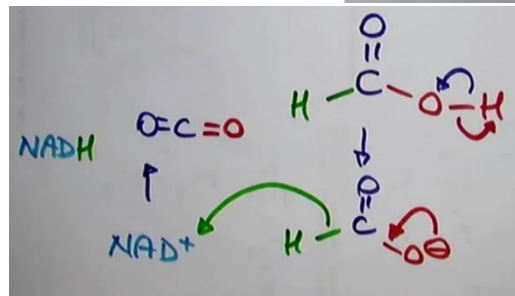
Il formiato, essendo una base coniugata di un acido carbossilico, è stabilizzato dalla risonanza col carbonile, motivo che giustifica la forte acidità degli acidi carbossilici.

Gli acidi carbossilici portano protoni acidi perché la base coniugata è stabilizzata per risonanza.



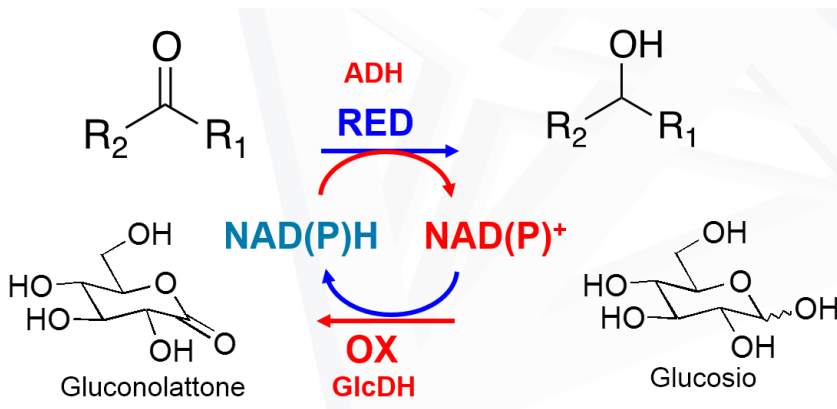
In presenza della formiato deidrogenasi, di formiato e del cofattore ossidato NAD^+ , viene catalizzata la reazione di cessione dell'idruro H^- dal formiato al NAD^+ . Viene prodotto NADH e CO_2 .

La formiato deidrogenasi è quindi un ottimo enzima per la rigenerazione del cofattore NAD^+ , ha però lo svantaggio di non funzionare col cofattore fosforilato NADP^+ e di avere una bassa attività.



Glucosio deidrogenasi come enzima accoppiato (REAZIONI DI RIDUZIONE)

La reazione di interesse è una reazione di riduzione, in cui si trasforma un carbonio sp^2 in un C ibridato sp^3 e si ha l'ossidazione del cofattore NADH in NAD^+ . A seconda della ADH la reazione sarà stereoselettiva secondo Prelog o anti-Prelog. La reazione accoppiata che consente di rigenerare il cofattore sarà una



ossidazione, da *glucosio* a *gluconolattone*, che permetterà la riduzione del cofattore da NAD^+ a NADH .

Il vantaggio della GlcDH è che accetta come cofattore sia NAD^+ che NADP^+ .

Il donatore di idruro è in questo caso il glucosio, che viene trasformato in gluconolattone. Il gluconolattone rimane nella miscela di reazione, che va quindi purificata anche da questo prodotto.

La reazione prevede che il carbonio da ossidare sul glucosio sia il C1, detto carbonio anomero. Bisogna comprendere quale si l'H rilasciato come idruro H^- dal glucosio. In presenza della catalisi enzimatica si ha la rottura del legame O-H sul C1, in modo eterolitico con rilascio di H^+ e acquisizione degli elettroni di legame da parte di O che diventa O^- . Questi elettroni andranno condivisi con il C, che rilascerà uno ione idruro H^- , che andrà a ridurre il NAD^+ in NADH.

Si ottiene quindi il gluconolattone ed il cofattore ridotto NADH.

La reazione è chemoselettiva ad opera dell'enzima.

La GlcDH è molto interessante quanto abbinata alle ADH da *Lactobacillus brevis*. Le GlcDH hanno una bassa specificità di substrato ma mantengono una elevata attività ed enantioselettività (spesso anti-Prelog), anche in solvente organico, liquidi supercritici e liquidi ionici.

La reazione catalizzata da LbADH è utilizzata a livello industriale per la produzione di alcol in maniera stereoselettiva; la reazione accoppiata è quella con una GlcDH che trasforma il glucosio in gluconolattone.

Il gluconolattone in soluzione è in equilibrio con la sua forma idrolizzata, in cui il gruppo estereo viene idrolizzato al corrispondente acido carbossilico ed ossidrilico. Se abbiamo un acido carbossilico libero si abbassa il pH del mezzo di reazione. Questo implica che se utilizziamo una reazione accoppiata ad una GlcDH ci si deve preoccupare di controllare con attenzione la produzione dell'acido carbossilico e l'abbassamento del pH, che potrebbe influire sulle performance dell'enzima.

Sistemi a cellule intere

I sistemi a cellule intere risolvono molti dei problemi che abbiamo incontrato nei sistemi multisubstrato e multienzimatici. Nei sistemi multisubstrato e multienzimatici si ha sempre a che fare con miscele complesse in cui è presente il prodotto di interesse, perché si hanno sempre co-substrati abbinati che servono a rigenerare il cofattore. Questo può portare ad inefficienze ed aumento di costi nel processo.

Inoltre l'utilizzo di un secondo enzima nei processi multienzimatici è strettamente vincolato al processo di interesse, per cui può anche essere relativamente costoso.

Per ovviare a questi svantaggi si è pensato ad usare le cellule intere. Anche questo sistema ha delle limitazioni.

In generale i sistemi a cellule intere sono più economici dei sistemi ad enzima isolato. Il lievito è spesso usato in esperimenti in scala di laboratorio. Inoltre si possono utilizzare cellule ingegnerizzate in cui sono espressi gli enzimi accoppiati.

Gli svantaggi del sistema a cellule intere comprendono una ridotta attività enzimatica per unità di peso secco, con relativa quantità di biomassa da smaltire.

La formazione di uno stereocentro causa quindi la possibilità di avere stereoisomeri, che prendono il nome di acido D-lattico ed L-lattico.

Benché siano noti organismi che riescono a produrre entrambe le forme di acido lattico, la più rilevante dal punto di vista biologico è la forma L, secondo Fischer. Da un punto di vista chimico entrambi gli enantiomeri sono importanti.

Nella lattato deidrogenasi di *Bacillus stearothermophilus* BS-LDH il sito attivo dell'enzima è strutturato in modo da avere degli aminoacidi fondamentali che permettono l'ingresso dell'acido piruvico con una precisa orientazione.

Parlando della BSLDH, tra gli aminoacidi chiave per la coordinazione del substrato nel sito attivo troviamo l'*arginina* 171. L'arginina ha una catena laterale basica (gruppo guanidinio, l'arginina è l'amminoacido più basico), e forma un ponte salino con la parte carbossilica dell'acido piruvico, mantenendolo nel sito attivo.

Dalla parte opposta troviamo una *glutammina* 102 che nella catena laterale ha un gruppo ammidico CONH₂. Il gruppo ammidico è apolare perché delocalizza il doppietto sul gruppo carbonilico. Ne consegue che la glutammina riesce a coordinare, mediante interazioni di non legame, il gruppo metilico del piruvato.

La presenza di questi due aminoacidi che interagiscono con le due estremità del piruvato ne permette una orientazione stabile e ripetibile all'interno del sito catalitico.

Troviamo anche aminoacidi accessori che migliorano il coordinamento del gruppo carbossilico, quali *arginina* e *treonina*.

Altri amminoacidi coordinano il gruppo carbonilico che subirà la reazione di riduzione ad opera del NADH. L'O carbonilico viene coordinato da una *istidina* che ha un N acido.

L'insieme di questi aminoacidi garantiscono il corretto posizionamento del substrato.

Quando il substrato è entrato nel sito attivo con questa orientazione, interviene il NADH, anch'esso coordinato all'interno del sito attivo in una posizione tale da permettere il rilascio dello ione idruro dalla faccia inferiore del piano del carbonile. Per questo motivo la BS-LDH porta alla formazione dell'acido L-lattico come prodotto, con una reazione stereoselettiva.

La BS-LDH quindi è un ottimo enzima per produrre acido L-lattico. Per produrre acido D-lattico si è cercato di fare ingegneria proteica sull'enzima, grazie alle conoscenze relative alla morfologia del sito attivo. Ciò che si è provato a fare è stato invertire la posizione dell'amminoacido polare, per la coordinazione del gruppo carbossilato, e dell'amminoacido apolare per la coordinazione del gruppo metilico, facendo delle mutazioni sito dirette.

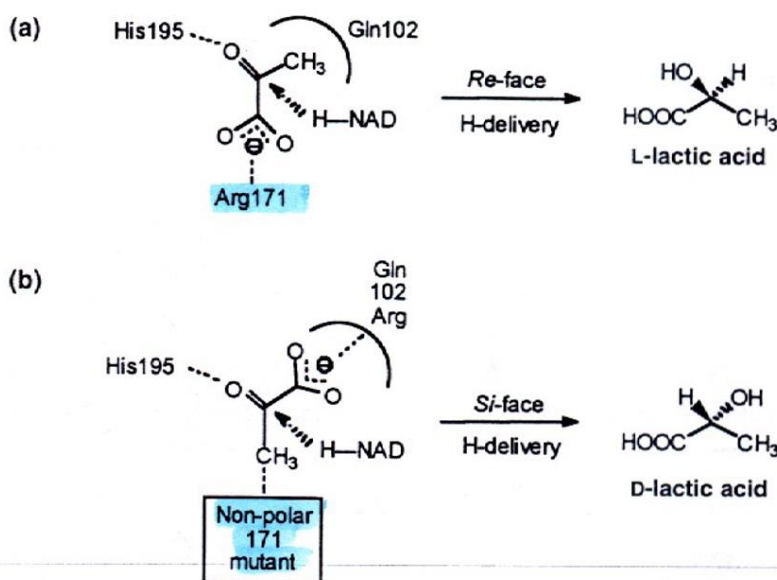
Al posto dell'*arginina* 171 che coordina il gruppo carbossilato sono stati provati aminoacidi non polari. Allo stesso tempo al posto della *glutammina* non polare è stata messa una *arginina*, che è l'amminoacido che coordina al meglio il gruppo carbossilato.

In questo modo il substrato entra nel sito attivo in posizione ribaltata, col gruppo carbonilico che resta sempre in coordinazione con l'*istidina*.

Lo ione idruro H^- verrà ceduto dal NADH sempre sulla parte inferiore rispetto al piano del carbonile, ma dato che il substrato è ribaltato, mostrerà la faccia Si, e non la faccia Re.

Con la BS-LDH con la doppia mutazione si otterrà l'enantiomero *acido D-lattico*.

La produzione dell'acido D-lattico è comunque ancora limitata dai costi, perché è costoso ottenere quantità adeguate di enzima mutato. C'è quindi ancora spazio dal punto di vista industriale per la creazione e scoperta di nuovi enzimi per la produzione di acido D-lattico.



Un esperimento particolarmente interessante è l'utilizzo della LDH abbinato alla Glucosio Deidrogenasi per rigenerare il cofattore. Si è pensato di utilizzare nanoparticelle per co-immobilizzare l'intero sistema fatto da enzima per la produzione di acido L-lattico ed il co-enzima per la rigenerazione del cofattore.

Il fatto che i due enzimi si trovano vicini nello spazio aumenta l'efficienza perché i reagenti si trovano vicini tra loro. Per arrivare a nanoparticelle che abbiano legate la Glc-DH, la LDH ed il cofattore legato in maniera tale da poter essere rigenerato ed al contempo dare la selezione adeguata si deve conoscere bene la chimica della reazione, in modo da non far perdere attività al complesso.

Sulla LDH è stata studiata anche la specificità di substrato, perché l'acido piruvico, che è un α -chetoadido viene trasformato in un α -idrossiacido, generando uno stereocentro. Gli α -idrossiacidi sono importanti intermedi per l'industria della chimica fine. Si è cercato quindi di variare il gruppo R del substrato (gruppo metilico CH_3 nell'acido piruvico). La sostituzione del gruppo metilico con un *gruppo etilico* causa una piccola diminuzione nell'attività dell'enzima.

Con l'aumento dell'ingombro sterico ottenuto aumentando il numero di carboni del gruppo R o usando sostituenti ramificati, l'attività catalitica cala drasticamente rispetto all'attività sul substrato naturale. Il substrato più ingombrante fa fatica ad entrare nel sito attivo e l'enzima perde di attività.

La sostituzione del gruppo R con un anello aromatico permette una discreta attività dell'enzima.

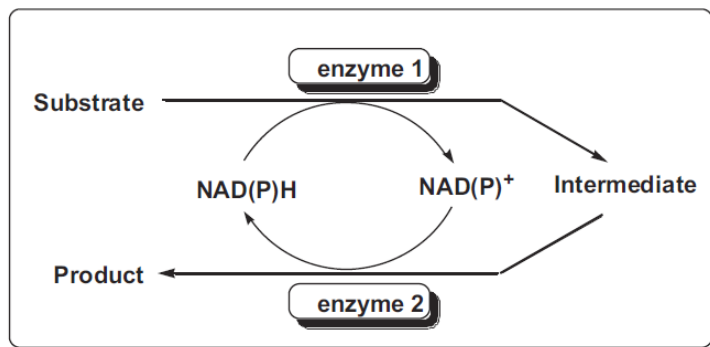
Questi esperimenti ci dicono che l'enzima non tollera bene sostituenti molto ingombranti, ma in ogni caso riesce a mantenere una conversione intorno al 90%, ed una forte stereoselezione con eccesso enantiomerico superiore al 99%.

In questo studio è stata utilizzata la formiato deidrogenasi per rigenerare il cofattore.

Un aspetto emergente è utilizzare sistemi multienzimatici studiati in modo che il prodotto della prima reazione sia il substrato per il secondo enzima nella reazione di rigenerazione del cofattore.

(da *Strategies for regeneration of nicotinamide coenzymes emphasizing self-sufficient closed-loop recycling systems*. W. Hummel)

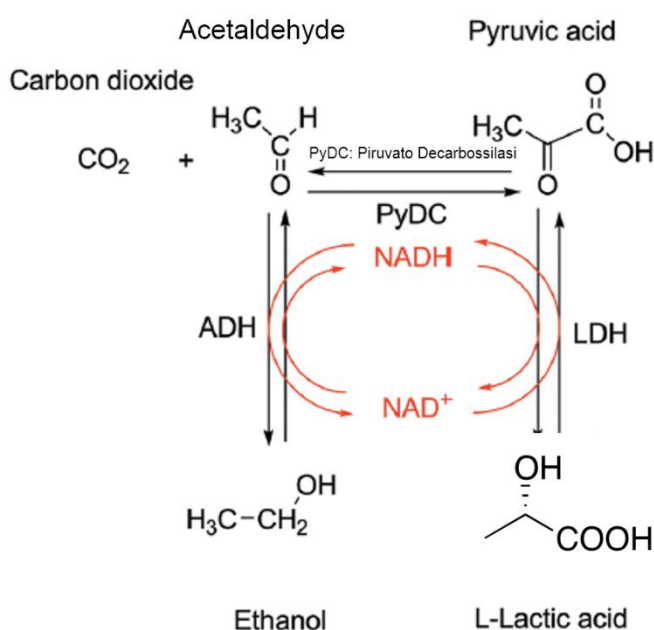
Un esempio particolarmente innovativo è un sistema per fissare la CO₂. Ovviamente l'intermedio che sarà substrato della seconda reazione non deve essere quello di interesse.



Un esempio è l'utilizzo dell'etanolo come substrato di partenza per l'alcol deidrogenasi ADH. L'etanolo viene ossidato dalla ADH alla corrispondente aldeide (acetaldeide), con ossidazione del gruppo ossidrilico a gruppo carbonilico. Essendo l'ossidrile primario il gruppo carbonilico sarà aldeidico e non chetonico.

L'acetaldeide, prodotto della prima reazione, può essere convertita, attraverso una reazione di carbonilazione in presenza di CO₂ e dell'enzima *piruvato decarbossilasi*, in acido piruvico.

L'acido piruvico è substrato della LDH, e può essere da questa convertito in acido L-lattico, mediante una reazione di riduzione in presenza di NADH, che viene ossidato a NAD⁺.



L'ADH nella reazione iniziale ossida etanolo in acetaldeide e quindi riduce NAD⁺ in NADH. L'acetaldeide è convertita in acido piruvico in presenza di CO₂ e dell'enzima *piruvato decarbossilasi*. La LDH riduce il piruvato in acido lattico, quindi ossida il NADH in NAD⁺. Si chiude quindi il ciclo.

Il meccanismo è interessante anche per la fissazione della CO₂, che è importante dato l'eccesso di CO₂ prodotta dalle attività umane. Si usano esclusivamente biocatalizzatori e si ottiene un prodotto, l'acido L-lattico, che è molto utile nell'industria chimica, per la produzione di polimeri organici e biodegradabili.

L'etanolo di partenza è ottenibile dalle biomasse.

L'acido lattico è un monomero a tre atomi di carbonio, che è stato indicato già nel 2004 come *added value chemical*, prodotti chimici ottenibili da biomasse, con una ampia utilità industriale.

Leucina deidrogenasi

La leucina deidrogenasi è un enzima che permette la sintesi della tert-leucina, un importante intermedio per l'industria farmaceutica.

La leucina deidrogenasi da *Sporosarcina psychrophila* è un ottamero altamente simmetrico.

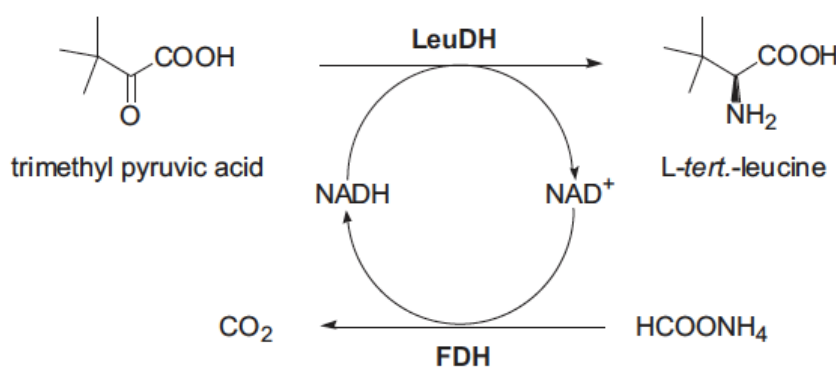
La *leucina deidrogenasi* è interessante perché, come la *glutammato deidrogenasi*, catalizza una reazione di riduzione di un doppio legame C=N, ottenuto da un gruppo carbonilico. Queste reazioni sono interessanti perché partendo da α -chetoacidi, in presenza di una fonte di N e di un enzima adeguato, è possibile ottenere α -amminoacidi in maniera stereoselettiva. Questi enzimi sono alcol deidrogenasi che lavorano con i cofattori NAD(P)^+ e NAD(P)H , e quindi richiedono di utilizzare tecniche di rigenerazione del cofattore.

Questi enzimi trasformano un gruppo carbonilico C=O in gruppo imminico C=N in presenza di una fonte di N. Riducono poi l'immina in gruppo amminico NH_2 . Se il gruppo carbonilico è in α al gruppo carbossilico, i prodotti finali della reazione sono α -amminoacidi sintetizzati in maniera stereoselettiva.

La leucina deidrogenasi e la glutammato deidrogenasi catalizzano questa reazione. Il processo che porta da carbonile ad ammina prende il nome di **Aminazione Riduttiva**.

Si ha una aminazione del carbonio ed una successiva riduzione ad ammina.

Nella reazione catalizzata dalla leucina deidrogenasi l'*acido trimetil piruvico* viene ridotto ad *L-tert-leucina*. La fonte di N è il *formiato di ammonio* HCOONH_4^+ , che sarà dissociato in *formiato* e *ione ammonio*. Lo ione ammonio è in equilibrio con l'ammoniaca NH_3 , che è l'effettiva fonte di azoto che reagisce col gruppo carbonilico



C=O dell'acido trimetil piruvico, ottenuto per sintesi chimica. Il gruppo carbonilico viene trasformato in immina C=N. L'immina è ridotta ad ammina NH_2 dal cofattore NADH , che diventa NAD^+ .

Si ottiene così L-tert-leucina. Il formiato rilasciato da sale formiato d'ammonio è un ottimo substrato per la *formiato deidrogenasi* che riduce il NAD^+ rigenerando NADH e liberando CO_2 .

Le alcol deidrogenasi servono quindi a convertire gruppi carbonilici C=O in gruppi ossidrilici OH, e viceversa. Questi enzimi lavorano con cofattore, dobbiamo quindi considerare sempre la rigenerazione di quest'ultimo.

Alcune alcol deidrogenasi, quali glutammato deidrogenasi e leucina deidrogenasi sono degli enzimi che, in presenza di una fonte di azoto, convertono il gruppo carbonilico C=O in gruppo imminico C=N e poi operano la reazione di riduzione ad ammina NH_2 , operando quindi una aminazione riduttiva in maniera stereoselettiva.