

### Fare ripasso aminoacidi

Quando si decide di utilizzare un biocatalizzatore si devono verificare dei parametri fondamentali:

- Il biocatalizzatore
  - Cofattori
  - Cinetica
  - Stabilità
- Il mezzo di reazione
  - Stabilità nei solventi organici
- Processo di purificazione
- Costo ed efficienza del processo

### Biocatalizzatori

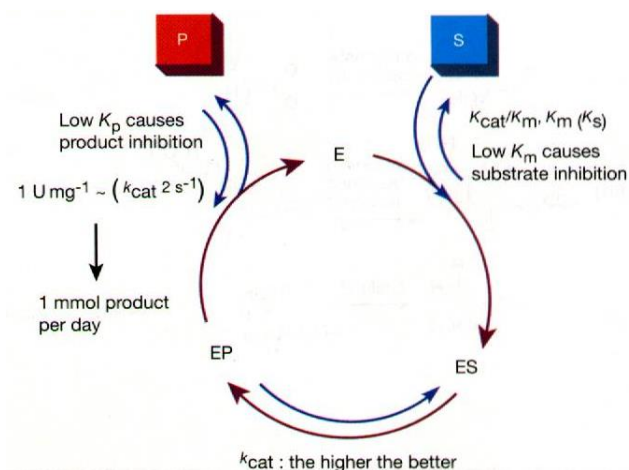
Si possono usare:

- Enzimi isolati  
Può essere un vantaggio usare enzimi in soluzione, perché la miscela sarà poi più facile da purificare.
- Cellule intere  
Con l'uso delle cellule intere si ha un problema di rimozione della biomassa nella fase di purificazione. Bisogna capire se il prodotto di reazione è escreto all'esterno della cellula o mantenuto all'interno del microorganismo.

Se sono necessari cofattori sono spesso necessari sistemi a cellule intere. La cellula ha tutto quello che serve al suo interno, quindi anche i cofattori utili all'enzima.

Il biocatalizzatore può essere immobilizzato sia come enzima isolato che come cellula intera. A volte il biocatalizzatore è così economico che non è necessario recuperarlo.

Relativamente al catalizzatore, devono essere conosciuti i parametri cinetici della reazione da realizzare. Ci si deve accertare dell'inibizione da substrato. Quando la reazione ha una bassa  $K_S$ ,



costante di dissociazione del substrato, il substrato darà inibizione. La velocità di reazione  $k_{cat}$  deve essere elevata, per una produzione efficiente. L'inibizione da prodotto deve essere minima o nulla, bisogna valutare quindi la  $k_P$ , che è la costante di dissociazione del complesso enzima-prodotto. Una  $k_P$  bassa è indice di inibizione da prodotto.

Da attenzionare è se l'enzima che si sta considerando catalizza una reazione reversibile (ad esempio le isomerasi) per trasformare l'intermedio in prodotto. In questi casi non ci deve essere una reazione di equilibrio, ma si dovrà fare in modo di spostare la reazione verso la produzione del prodotto.

## **I cofattori**

Sono numerosi, in genere piccole molecole di natura non proteica, associati all'enzima. Sono indispensabili per l'attività catalitica dell'enzima. Tra questi:

- Vitamine  
Sono molecole relativamente complesse, con molti stereocentri.
- Ioni metallici
- Gruppo eme
- Coenzima A
- NADH, FADH<sub>2</sub> (cofattori utilizzati dalle ossidoreduttasi)

## **È bene conoscere la struttura chimica di questi composti**

Spesso il cofattore non è sintetizzabile con mezzi chimici, per questo spesso si ricorre a cellule intere quando sono necessari cofattori.

## **Mezzo di reazione**

Il mezzo di reazione deve essere ottimizzato per la reazione che desideriamo.

Generalmente vogliamo trasformare molecole organiche che si sciolgono bene in solventi organici, il biocatalizzatore però funziona bene in solventi acquosi. Si deve quindi trovare un compromesso per la reazione, tra solubilità dei substrati ed attività dell'enzima. Talvolta un prodotto insolubile può essere utile perché precipita non appena prodotto ed è facile da separare dalla miscela. Il substrato deve però essere solubile affinché venga trasformato, perché un substrato precipitato è poco disponibile per la reazione.

In assenza di acqua si possono usare solventi organici puri. I biocatalizzatori usati in solventi organici possono essere naturali o ingegnerizzati.

Liquidi supercritici sono generalmente gas che vengono liquefatti in condizioni opportuni di pressione e temperatura, ed hanno proprietà di solvente. Uno di questi è la CO<sub>2</sub>, che viene usata per il processo di rimozione della caffeina dal caffè. Gli impianti per l'utilizzo dei liquidi supercritici sono costosi. Hanno dei vantaggi:

- Aumentano la solubilità dei substrati
- Dato che si lavora senza acqua si sposta l'equilibrio verso la sintesi rispetto all'idrolisi
- Possono modificare la specificità di substrato, alterando la conformazione del sito catalitico

- Il cambio di conformazione indotto può però portare ad una riduzione o perdita dell'attività catalitica.

### *Solventi organici puri*

È possibile utilizzare i biocatalizzatori in solvente organico puro. Per rendere più stabili gli enzimi in solventi organici si usano preparazioni enzimatiche fatte ad hoc, come liofilizzazioni in presenza di Sali, che stabilizzano l'enzima nella forma nativa.

In alcuni casi si è osservato un miglioramento dell'attività enzimatica. La Subtilisina Carlsberg in solvente organico ha una attività maggiore di 20.000 volte al solvente acquoso, la penicillina acilasi ha una attività migliorata di 35.000 volte in esano puro. Nella preparazione liofilizzata è anche più facile separare il prodotto dalla miscela di reazione.

Ogni enzima va però attentamente valutato nel suo comportamento nelle condizioni di processo specifiche.

Quando si vuole lavorare in solvente organico si possono usare tensioattivi o surfattanti. Queste molecole permettono di rendere miscibili due fasi altrimenti non miscibili. Una miscela di reazione che contiene una fase di solvente organico per solubilizzare il substrato ed una fase acquosa per solubilizzare l'enzima può essere stabilizzata da surfattanti. Si è visto che in queste condizioni la subtilisina e l' $\alpha$ -chimotripsina sono circa 1000 volte più attive.

Nella sintesi di poliesteri che prevedono una condensazione tra diolo e diestere si può utilizzare una catalisi enzimatica. Questi poliesteri sono in forma liquida a temperatura ambiente e fungono allo stesso tempo da solvente e substrato. La biotrasformazione in questi casi è molto efficiente.

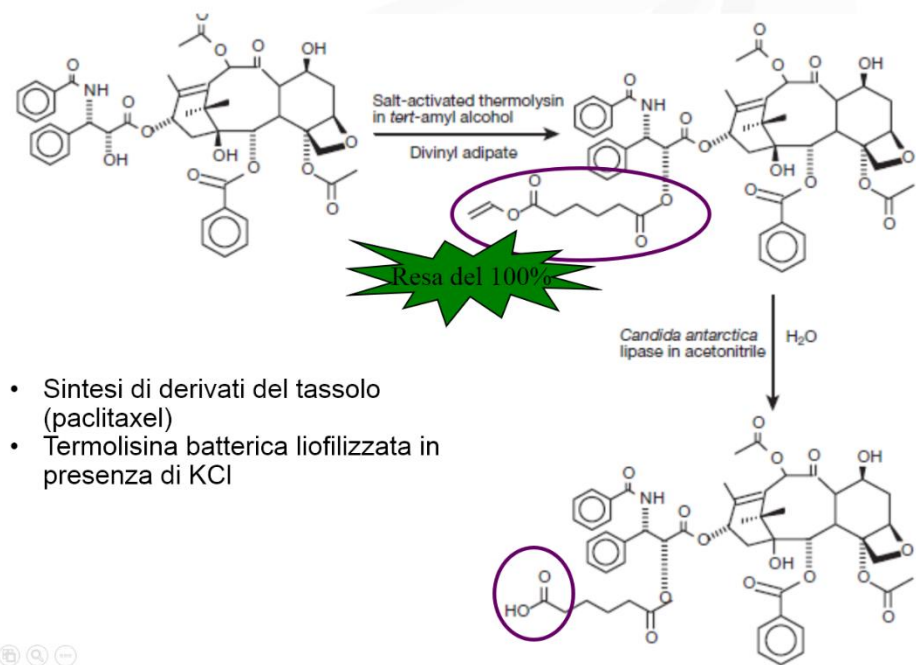
### **Paclitaxel**

Il Paclitaxel è un farmaco antitumorale derivato dal tasso. La produzione di questo farmaco avviene in solvente organico.

La molecola naturale deve essere trasformata nel prodotto farmacologicamente attivo, il quale porta su un ossidrile una catena carboniosa derivante da un diacido, che forma un estere con un gruppo carbossilico e lascia un gruppo carbossilico libero.

Il tasso di partenza ha diversi stereocentri. La sua sintesi parte da un intermedio che vede la presenza di tre gruppi ossidrilici liberi. Nel prodotto finale solo uno di questi gruppi ossidrilici viene funzionalizzato con un gruppo estere. Chimicamente è difficile da sintetizzare il composto con una reazione regioselettiva.

Si può utilizzare una *termolisina* di origine batterica, liofilizzata e stabilizzata con KCl. Come solvente organico si può usare l'*alcol tert-amilico* e come agente acilante il *divinil adipato*. In queste condizioni l'enzima è regioselettivo e porta alla produzione del prodotto di acilazione dell'ossidril di interesse con resa del 100%.



Questo derivato non è il substrato naturale della termolisina, però riesce a lavorare su questo substrato.

L'intermedio così prodotto necessita dell'idrolisi di un gruppo estereo per portare al prodotto farmacologicamente utile. Va idrolizzato il gruppo estereo presente sulla catena carboniosa appena aggiunta, ma sono anche presenti altri gruppi esterei sulla molecola, che vanno preservati.

Per via chimica non c'è modo di idrolizzare un gruppo estere in maniera selettiva. Anche in questo caso serve un biocatalizzatore, e serve anche dell'acqua per eseguire l'idrolisi.

Per la sintesi del Paclitaxel sono quindi necessari due passaggi biocatalitici.

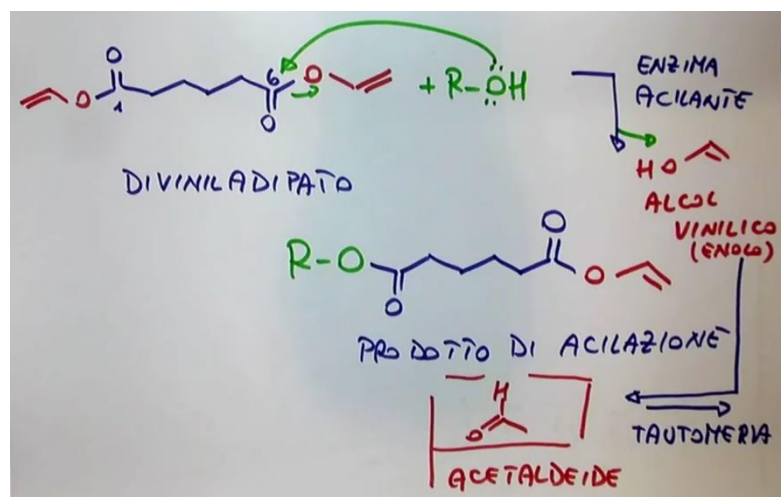
## Sintesi

L'adipato è un diestere di un acido dicarbossilico a 6 atomi di carbonio. Il divinil adipato è il reagente utilizzato dalla termolisina per trasferire l'adipato sul tassolo.

Nella reazione si fa reagire il **divinil adipato** in presenza di un *enzima acilante* (termolisina in questo caso, si possono utilizzare *lipasi*), con un alcol (ossidril OH).

Si ha il trasferimento sull'ossidril della parte acilica. Nella reazione il gruppo OH, in presenza dell'enzima, attaccherà il carbonile; si avrà come gruppo uscente la parte alcolica presente sul divinil adipato, che prende il nome di alcol vinilico.

L'alcol vinilico è un enolo, L'enolo è soggetto a tautomeria e si trasforma in acetaldeide. L'acetaldeide è più stabile, quindi l'equilibrio sarà spostato verso la



formazione di questa molecola.

La tautomeria è una delle ragioni, assieme all'efficienza dell'enzima, per la quale la resa arriva al 100%. Il fatto che il gruppo uscente si trasformi in acetaldeide sottrae un prodotto all'equilibrio e sposta l'equilibrio della reazione verso la formazione dei prodotti.

Una reazione di idrolisi catalizzata dell'enzima, che normalmente è una reazione di equilibrio con  $\Delta G$  vicino allo 0, viene resa irreversibile dalla tautomeria.

Il diviniladipato ha due gruppi funzionali identici. Se effettuassi la reazione dell'alcol con il vinil adipato per via chimica non sarei in grado di ottenere il derivato monofunzionalizzato, perché la reattività dei due gruppi è identica, quindi dopo l'attacco del primo alcol sull'adipato, questo potrebbe essere attaccato da un altro alcol sull'altro gruppo, che porta ad un derivato doppiamente funzionalizzato.

La termolisina permette di evitare questa evenienza, oltre a dare la regioselezione della reazione.

L'esempio della sintesi del tassolo è importante per dimostrare le capacità degli enzimi nella sintesi di molecole farmacologicamente attive.

Uno dei maggiori produttori di paclitaxel è italiano, la Indena.

## **Downstream**

Quando si opera con biotrasformazioni, indipendentemente dal solvente, le concentrazioni sono molto basse. Servono sistemi specifici per l'estrazione del prodotto.

Spesso le biotrasformazioni sono in produzione discontinua, cioè si blocca la produzione e si recupera il prodotto.

Se si hanno prodotti insolubili si possono far precipitare in situ, senza far precipitare l'enzima. Se il prodotto precipita si ha meno inibizione da prodotto, inoltre il prodotto precipitato si degrada meno essendo meno esposto al solvente.

Un esempio tipico di questa tipologia di processo è la purificazione dell'acrilammide a partire dall'acrilonitrile.

Se si lavora con processi bifasici si possono separare le fasi e trattare solo la fase in cui si trova il prodotto per estrarre la molecola pura.

## **Smaltimento**

Importante è lo smaltimento dei prodotti di scarto della reazione. La maggior parte dei rifiuti sono acqua, Sali e biomassa. I solventi organici vengono spesso riutilizzati nell'industria.