

Enzimi come Biocatalizzatori: pregiudizi e vantaggi

- Gli enzimi sono delicate
- Gli enzimi sono costosi
- Gli enzimi sono attivi solo con i loro substrati naturali
- Gli enzimi lavorano solo in ambiente naturale

Gli enzimi sono eco-compatibili

A differenza dei metalli pesanti sono biodegradabili e quindi non tossici per l'ambiente

Gli enzimi sono catalizzatori efficienti

Velocità di reazione 10^8 - 10^{10} volte maggiori delle reazioni non catalizzate.

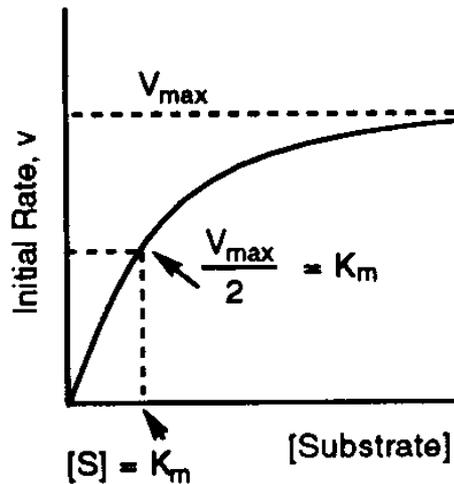
Si usano basse quantità di catalizzatore (10^{-3} - 10^{-4} %), per catalizzatori artificiali (0.1-1%).

Processo enzimatico - Cinetica di Michaelis Menten



$$v = [E]_0 k_{\text{cat}} [S] / (K_m + [S])$$

$$V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} [E]_0$$



Elevate concentrazioni di substrato

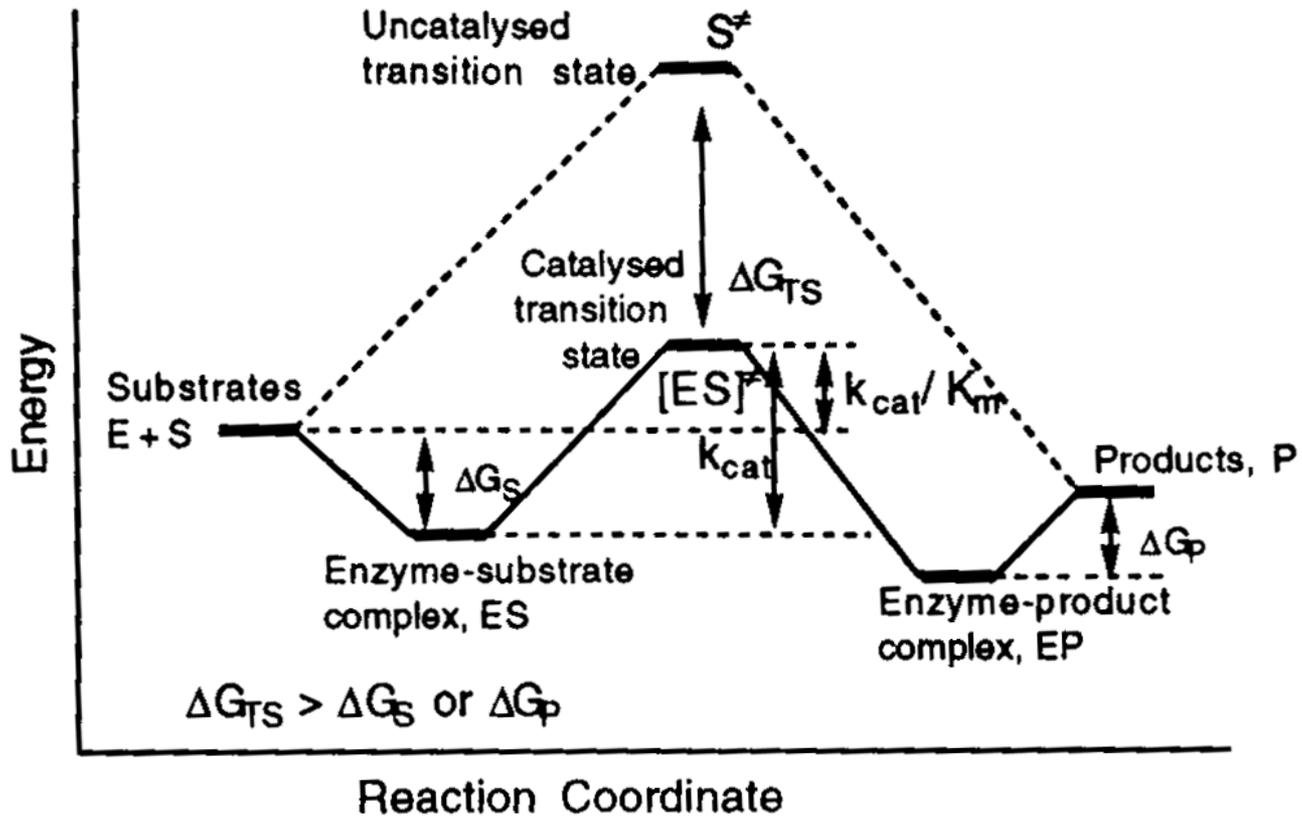
$$V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} [E]_0 \quad (5)$$

Basse concentrazioni di substrato

$$v = (k_{\text{cat}}/K_m) [E]_0 [S] \quad (6)$$

Relazione tra la k_{cat} e la k_{cat}/K_m

$$k_{cat}/K_m \leq k_1$$



Enzimi come Biocatalizzatori: Vantaggi

Gli enzimi reagiscono in condizioni blande:

pH=5-8, T=20-40°C. In questo modo reazioni collaterali (racemizzazioni, isomerizzazioni, decomposizioni, riarrangiamenti) vengono minimizzate

Gli enzimi sono compatibili tra loro:

Lavorando in condizioni simili possono essere usati in reazioni a cascata (*cascade reactions*) che evitano l'accumulo di prodotti instabili o permettono di spostare reazioni di equilibrio sfavorevoli

Gli enzimi non sono confinati al loro ruolo naturale:

Possono avere elevate tolleranze verso il substrato e lavorare in solventi diversi dall'acqua.

Enzimi come Biocatalizzatori: Vantaggi

Gli enzimi catalizzano ampie classi di reazioni:

In quanto catalizzatori gli enzimi accelerano le reazioni ma non influiscono sull'equilibrio termodinamico della reazione. Per cui alcune reazioni catalizzate da enzimi possono essere fatte in entrambi i sensi

Vi sono enzimi per quasi tutte le reazioni organiche:

Idrolisi-Sintesi di esteri, ammidi, lattoni, lattami, eteri, anidridi di acidi, epossidi, e nitrili.

Ossidazioni-Riduzioni di alcani, alcheni, aromatici, alcoli, aldeidi e chetoni, solfuri e solfossidi.

Alogenazioni e dealogenazioni, alchilazioni e dealchilazioni, carbossilazioni e decarbossilazioni, isomerizzazioni, reazioni aldoliche e addizioni di Michael.

Classificazione di enzimi

Enzyme class	Number		Reaction type	Utility ^a
	classified	available		
1. Oxidoreductases	650	90	Oxidation-reduction: oxygenation of C-H, C-C, C=C bonds, or overall removal or addition of hydrogen atom equivalents.	+++ 25%
2. Transferases	720	90	Transfer of groups: aldehydic, ketonic, acyl, sugar, phosphoryl or methyl.	+ ~5%
3. Hydrolases	636	150	Hydrolysis-formation of esters, amides, lactones, lactams, epoxides, nitriles, anhydrides, glycosides, organohalides.	+++ 65%
4. Lyases	255	35	Addition-elimination of small molecules on C=C, C=N, C=O bonds.	++ ~5%
5. Isomerases	120	6	Isomerizations such as racemization, epimerization, rearrangement.	± ~1%
6. Ligases	80	5	Formation-cleavage of C-O, C-S, C-N, C-C bonds with concomitant triphosphate cleavage.	± ~1%

Nomenclatura

EC A.B.C.D

EC Enzyme Commission

A: denota il tipo principale di reazione

B: Denota il sottotipo, indicando il tipo di substrato o di molecola che viene trasferita

C: indica la natura del co-substrato

D: il numero individuale di enzima

Enzimi come Biocatalizzatori

Table 1. Enzymes commonly used for organic synthesis.

<u>Not Requiring Cofactors</u>	<u>Not Requiring Added Cofactors</u>	<u>Cofactor Requiring</u>
1) Hydrolytic Enzymes: Esterases Lipases Amidases Phospholipases Epoxide Hydrases Nucleoside Phosphorylase SAM Synthetase	1) Flavoenzymes: Glucose Oxidase Amino Acid Oxidases Diaphorase	1) Kinases - ATP 2) Oxidoreductases - NAD(P)(H) 3) Methyl Transferases - SAM 4) CoA-Requiring Enzymes 5) Sulfurylases - PAPS
2) Isomerases and Lyases: Glucose Isomerase Aspartase Phenylalanine Ammonia Lyase Fumarase Cyanohydrin Synthetase	2) Pyridoxal Phosphate Enzymes: Transaminases Tyrosinase δ -Aminolevulinatase Cystathionine Synthetase	
3) Aldolases	3) Metalloenzymes: Galactose Oxidase Monooxygenases Dioxygenases Peroxidases Hydrogenases	
4) Glycosyl Transferases	Enoate Reductases Aldolases	
5) Glycosidases	Carboxylases Nitrile Hydrase	
6) Oxynitilase	4) Thiamin Pyrophosphate dependent enzymes: Transketolases Decarboxylases	
	5) Others: SAH Hydrolase B ₁₂ -Dependent Enzymes PQQ (Methoxatin) Enzymes	

- 1: Lipases and other esterases (ester formation including transesterification; aminolysis and hydrolysis of esters)
- 2: Proteases (ester and amide hydrolysis, peptide synthesis)
- 3: Nitrilases and nitrile hydratases
- 4: Other hydrolases (hydrolysis of epoxides, halogenated compounds, and phosphates; glycosylation)
- 5: Oxidoreductases (e.g. enantioselective reduction of ketones)

Table 4. Enzymes most commonly used for organic synthesis.

Esempi di enzimi usati nelle biotrasformazioni

ENZYME	SUBSTRATE	PRODUCT	APPLICATION
Nitrile hydratase	Pyridine-3-carbonitrile	Nicotinamide	Pharmaceutical intermediate
Nitrile hydratase	Acrylonitrile	Acrylamide	Intermediate for water-soluble polymers
D-amino acid oxidase & glutaric acid acylase	Cephalosporin C	7-Aminocephalosporanic acid	Intermediate for semisynthetic antibiotics
Penicillin acylase	7-Aminodeacetoxy-cephalosporanic acid	Cephalexin	Antibiotics
Penicillin G acylase	Penicillin G	6-Aminopenicillanic acid	Intermediate for semisynthetic antibiotics
Ammonia lyase	Fumaric acid + ammonia	L-Aspartic acid	Intermediate for aspartame
Thermolysine	L-Aspartic acid + D,L-phenylalanine	Aspartame	Artificial sweetener
Dehalogenase	(<i>R,S</i>)-2-Chloropropionic acid	(<i>S</i>)-2-Chloropropionic acid	Intermediate for herbicides
Lipase	(<i>R,S</i>)-Glycidyl butyrate	(<i>S</i>)-Glycidyl butyrate	Chemical intermediate
Lipase	Isosorbide diacetate	Isosorbide 2-acetate	Pharmaceutical intermediate
Lipase	(<i>R,S</i>)-Naproxen ethyl ester	(<i>S</i>)-Naproxen	Drug
Lipase	Racemic 2,3-epoxy-3-(4-methoxyphenyl) propionic acid methyl ester	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-2,3-epoxy-3-(4-methoxyphenyl) propionic acid methyl ester	Pharmaceutical intermediate
Acylase	D,L-Valine + acetic acid	L-Valine	Pharmaceutical intermediate
Acylase	Acetyl-D,L-methionine	L-Methionine	Pharmaceutical intermediate

Table 5. Examples of the use of biocatalysts in organic synthesis.

Enzimi come Biocatalizzatori: Vantaggi

Gli enzimi sono altamente selettivi:

Chemoselettivi: grazie alla loro specificità riescono a trasformare un gruppo funzionale in presenza di altri che reagiscono in condizioni confrontabili.

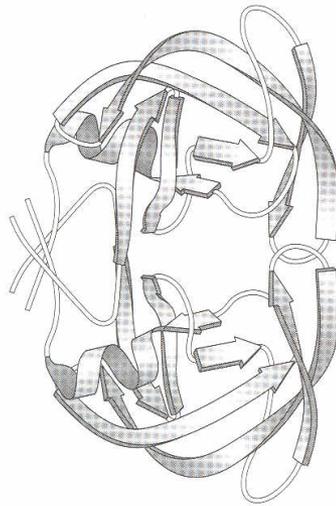
Regioselettivi: grazie alla loro struttura tridimensionale vengono riconosciuti gruppi funzionali situati in posizioni diverse del substrato.

Stereoselettivi: Gli enzimi sono molecole chirali enantiopure e quindi sono catalizzatori chirali. Possono quindi reagire in maniera diversa con gruppi enantiotopici producendo molecole chirali con un certo grado di arricchimento enantiomerico.

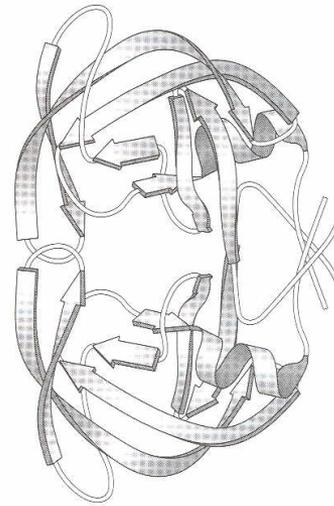
Enzimi come Biocatalizzatori: Svantaggi

Gli enzimi vengono prodotti in una sola forma enantiomerica:

Per via naturale non possono essere preparati enzimi composti da ammino acidi della serie D.
Per ottenere l'enantiomero opposto devono essere seguite vie alternative.



L-HIV protease



D-HIV protease

Enzimi come Biocatalizzatori: Svantaggi

Gli enzimi richiedono condizioni di reazioni molto specifiche:

Il fatto che gli enzimi lavorino in condizioni blande non ci consente di modificare troppo i parametri di reazione (temperatura, pH) per forzare la reazione.

Gli enzimi forniscono la massima attività in acqua:

L'acqua, a causa dell'elevata temperatura di ebollizione e la bassa volatilità, non è spesso il miglior solvente per le reazioni organiche. Pochi solventi organici sono solubili con l'acqua.

Gli enzimi possono lavorare in solventi organici, ma la loro attività cala, di solito di almeno un ordine di grandezza.

Enzimi come Biocatalizzatori: Svantaggi

Gli enzimi richiedono i loro cofattori naturali:

Mentre gli enzimi si sono rivelati molto flessibili nell'accettare substrati non naturali, richiedono quasi esclusivamente i loro cofattori naturali.

Questi reagenti biologici sono relativamente instabili e troppo costosi per essere usati in quantità stechiometriche. Sino ad ora non si sono trovati sostituti sintetici validi.

Gli enzimi possono causare allergie:

Devono quindi essere maneggiati con cura, analogamente ai reagenti chimici.

Gli enzimi sono prone alla disattivazione:

Molte reazioni enzimatiche possono essere inibite sia dai reagenti che dai prodotti, il che comporta un forte calo di attività a concentrazioni elevate di substrato o prodotto.

Enzimi isolati vs cellule

La forma in cui vogliamo usare un certo enzima dipende da molti fattori quali:

- 1) tipo di reazione,
- 2) possibilità di riciclo del cofattore;
- 3) scala in cui si effettua la reazione.

Table 1.2. Characteristics of 'enzymation' and 'fermentation'

Enzymation:

biotrasformazioni
microbiche di substrati
complessi che utilizzano
alcuni o solamente un
passaggio sintetico per
convertire prodotti non
naturali nei prodotti
desiderati.

	Enzymation	Fermentation
microorganism	resting cells	growing cells
reaction type	short, catalytic	long, life process
number of reaction steps	few	many
number of enzymes active	few	many
starting material	substrate	C + N source
product	natural or non-natural	only natural
concentration tolerance	high	low
product isolation	easy	tedious
by-products	few	many

Enzimi isolati vs cellule

Biocatalyst	Form	Pros	Cons
isolated enzymes	any	simple apparatus, simple work-up, better productivity due to higher concentration tolerance	cofactor recycling necessary
	dissolved in water	high enzyme activities	side reactions possible, lipophilic substrates insoluble, work-up requires extraction
	suspended in organic solvents	easy to perform, easy work-up, lipophilic substrates soluble, enzyme recovery easy	reduced activities
	immobilized	enzyme recovery easy	loss of activity during immobilization

Coenzimi

Molecole a basso peso molecolare, 15000 Da, piuttosto delicate e decisamente costose per essere usate in quantità stechiometriche

Devono quindi essere riciclate

Table 1.5. Common coenzymes required for biotransformations

Coenzyme	Reaction type	Recycling ^a
NAD ⁺ /NADH	removal or addition of	(+) [++]
NADP ⁺ /NADPH	hydrogen	(+) [+]
ATP ^b	phosphorylation	(+) [+]
SAM	C ₁ -alkylation	(+) [±]
Acetyl-CoA	C ₂ -alkylation	(+) [±]
Flavines ^c	oxygenation	(-)
Pyridoxal-phosphate	transamination	(-)
Biotin	carboxylation	(-)
Metal-porphyrin complexes ^c	peroxidation, oxygenation	(-)

Riciclo necessario (+) o non necessario (-).
Riciclo facile (++) o complesso (±)

Fonti di Enzimi

La maggior parte degli enzimi usati nelle biotrasformazioni sono usati nella forma non purificata e quindi sono relativamente economici. Il contenuto varia (1-30%) e la forma non purificata è generalmente più stabile.

Si ottengono:

- Industria della detergenza (lipasi e proteasi)
- Industria alimentare (proteasi e lipasi per la lavorazione della carne, formaggio, grassi e olio. Per la fermentazione e la cottura di dolci e pane vengono usate delle glicosidasi)
- Isolamento da organi (fegato, reni)
- Processi di fermentazione da batteri o funghi
- Origine vegetale (piante o frutti) abbastanza rari
- Gli enzimi purificati sono molto costosi. Esistono però mezzi di purificazione sempre più efficaci ed economici.

.

Reazioni di Idrolisi

Trasformazioni idrolitiche di esteri e ammidi (proteasi, esterasi, lipasi)

Vantaggi: assenza di cofattori sensibili, disponibilità di un largo numero di enzimi non altamente specifici.

Ampio utilizzo in sintesi organica (2/3 delle biotrasformazioni)

Reazioni di Idrolisi

Trasformazioni idrolitiche di esteri e ammidi (proteasi, esterasi, lipasi)

Vantaggi: assenza di cofattori sensibili, disponibilità di un largo numero di enzimi non altamente specifici.

Ampio utilizzo in sintesi organica (2/3 delle biotrasformazioni)

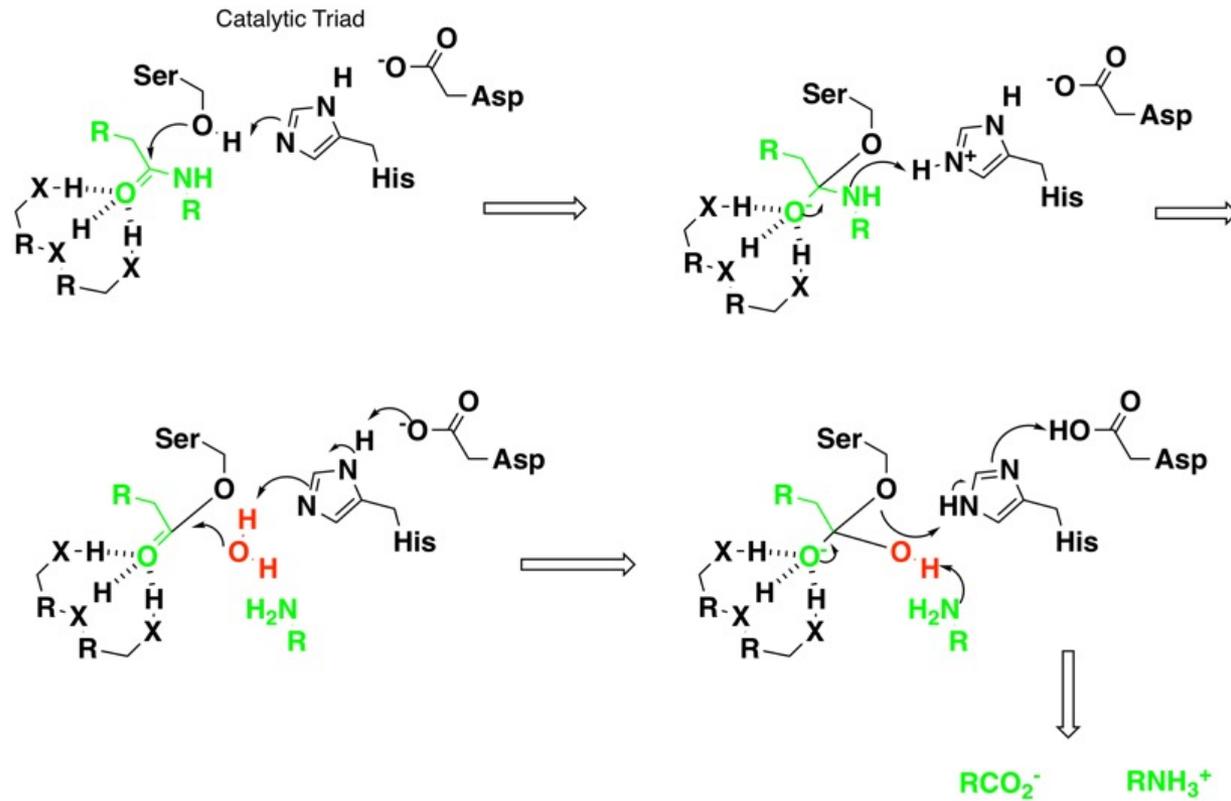
Meccanismo di idrolisi enzimatica di ammidi e esteri

Attacco nucleofilo da parte di un gruppo attivo dell'enzima alla gruppo carbonilico dell'estere o ammido (idrolisi basica)

Gruppo attivo: **-OH** (serina) esterasi di fegato di maiale, lipasi microbiche
-COO⁻ (acido aspartico) pepsina
-SH (cisteina) papaina

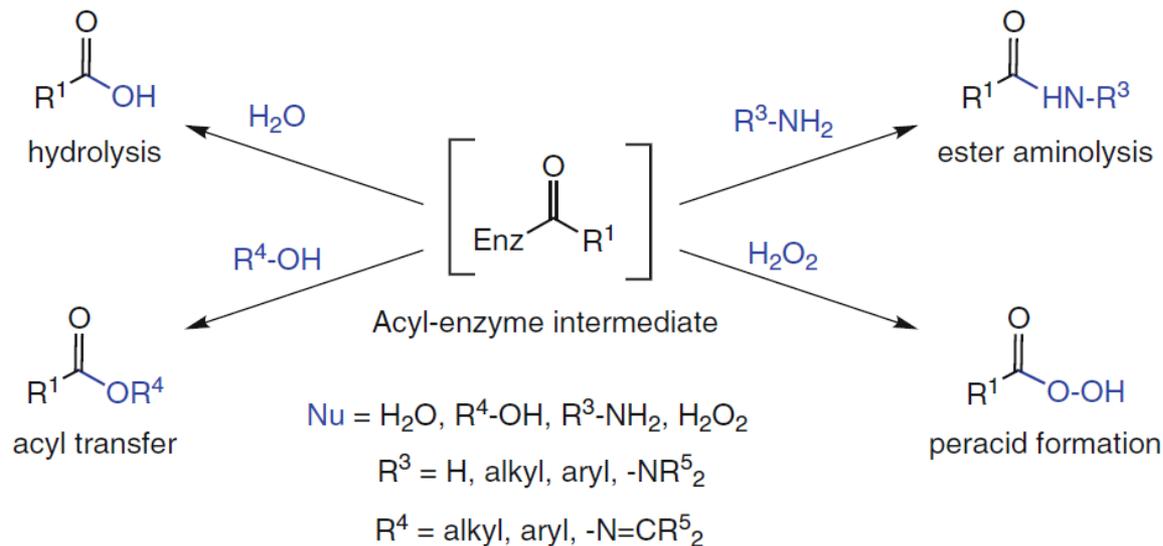
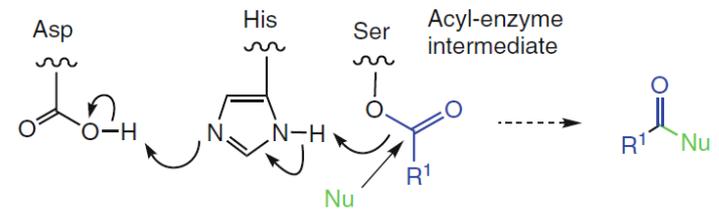
Meccanismo serina idrolasi

Meccanismo serina idrolasi

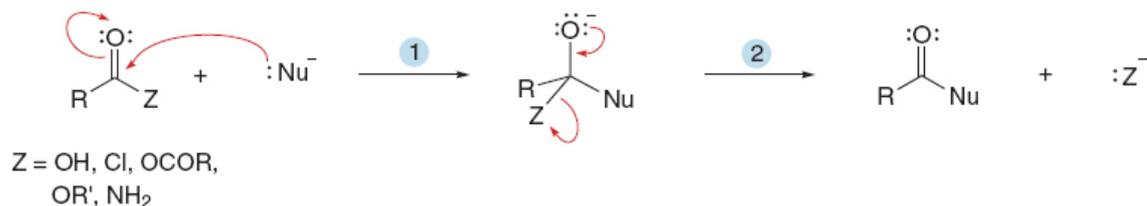


In ambienti con basse concentrazioni di acqua altri nucleofili competono :

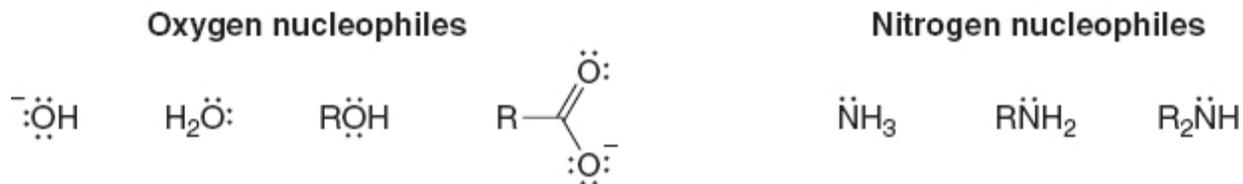
- ✓ Acil transfer: reazione di un altro alcol (trans-esterificazione)
- ✓ Amminolisi: reazione di RNH_2 (ammide N-sostituita)
- ✓ Reazione con H_2O_2 (peracidi, RCOOH)
- ✓ Reazione con tioli (tioesteri) **non avviene**



Sostituzione nucleofila acilica



- 1 Il nucleofilo attacca il gruppo carbonile elettrofilo. Il legame π si rompe, spostando una coppia di elettroni sull'ossigeno e formando un carbonio sp^3 .
- 2 Una coppia di elettroni sull'ossigeno ri-forma il legame π e Z si stacca come un gruppo uscente con la coppia di elettroni nel legame C – Z.



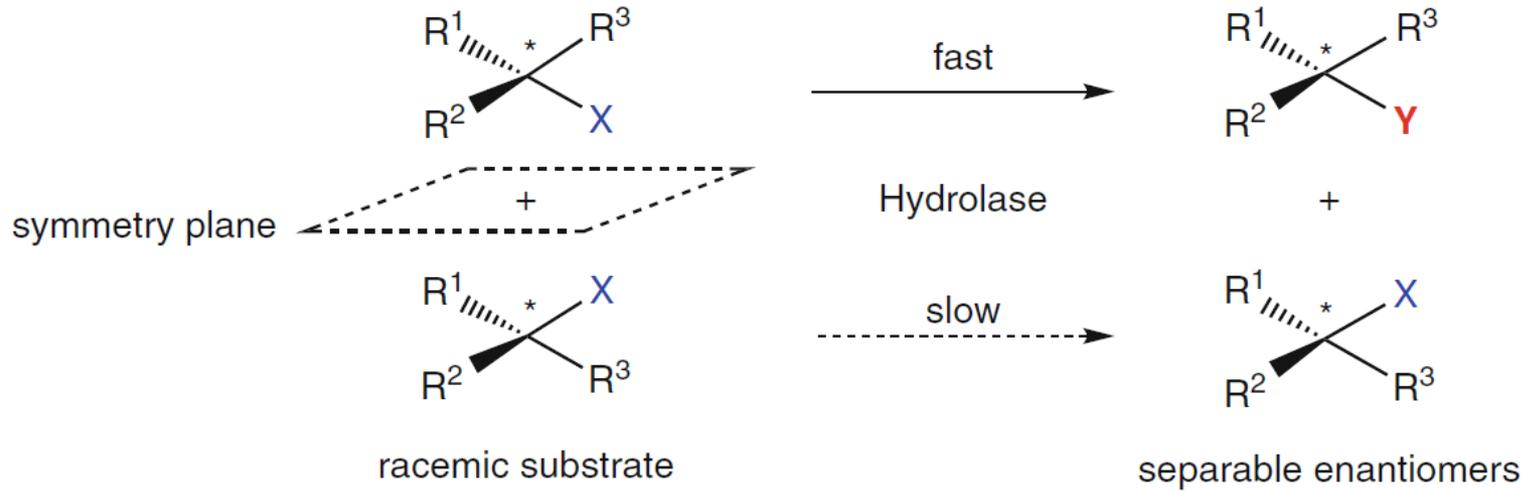
Idrolisi/esterificazioni enzimatiche stereoselettive

substrati achirali: generazione di uno stereocentro, reazione di gruppi o facce enantiotopiche

substrati achirali: reazione su substrati meso (meso trick)

substrati chirali: reazione su composti racemi, risoluzione cinetica, **risoluzione cinetica dinamica**

Risoluzione cinetica



Primo esempio riportato risale al 1903

Nelle bio-trasformazioni le risoluzioni cinetiche sono 4 volte più frequenti delle trasformazioni stereoselettive

Risoluzione cinetica

Resa massima teorica: 50%

In alcuni casi $k_S \gg k_R$, si trasforma solo uno dei due enantiomeri

Cinetiche di risoluzioni enzimatiche (Sih)

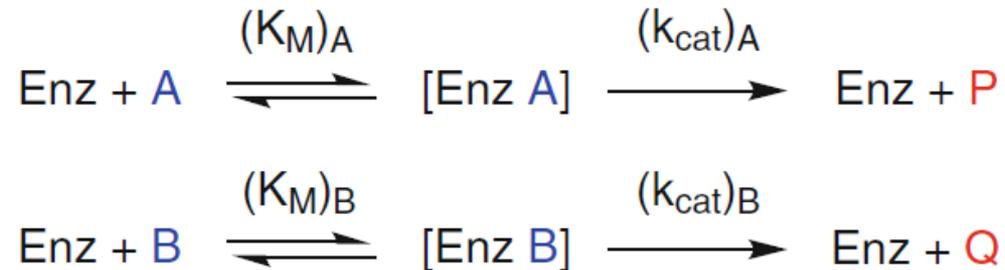
Selettività di una risoluzione = E = Enantiomeric Ratio

$$\text{Enantiomeric Ratio} \quad E = \frac{v_B}{v_A} = \frac{\left[\frac{k_{\text{cat}}}{K_M} \right]_A}{\left[\frac{k_{\text{cat}}}{K_M} \right]_B} \quad \Delta\Delta G^\ddagger = -RT \ln E$$

Eutomero: enantiomero con la massima reattività

Distomero: enantiomero con bassa reattività o indesiderata

Risoluzione cinetica enzimatica



Costanti cinetiche sono difficili da misurare

Si preferisce utilizzare gli ee e la conversione

Enz = enzyme

A, B = enantiomeric substrates

[EnzA], [EnzB] = diastereomeric enzyme-substrate complexes

P, Q = enantiomeric products

Enantiomeric Ratio $E = \frac{v_B}{v_A} = \frac{\left[\frac{k_{\text{cat}}}{K_M}\right]_A}{\left[\frac{k_{\text{cat}}}{K_M}\right]_B}$

For the product

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

For the substrate

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

c = conversion, e.e. = enantiomeric excess of substrate (S) or product (P),

E = Enantiomeric Ratio

Risoluzione cinetica



$$k_R > k_S$$

Condizioni iniziali: $([R]_0 = [S]_0 = 0.5 \text{ at time } t = 0)$

Conversione al tempo t : $C (0 < C < 1)$

Al tempo t la quantità di composto sarà: $[R] + [S] = 1 - C,$

Con un eccesso enantiomerico: $e.e. = ([S] - [R]) / ([S] + [R])$

Al tempo t possiamo calcolare le quantità di R e S

$$[S] = \frac{(1 - C)(1 + e.e.)}{2}, \quad [R] = \frac{(1 - C)(1 - e.e.)}{2}$$

Quindi il successo di una risoluzione cinetica ad una data conversione viene espresso dall' ee del reagente non reagito R+S. Questo valore è direttamente associato alla conversione C e al fattore di selettività $s = k_R/k_S$.



Reazioni pseudo-primo ordine
in R e S e $[B^*]_0 \gg [R]_0$

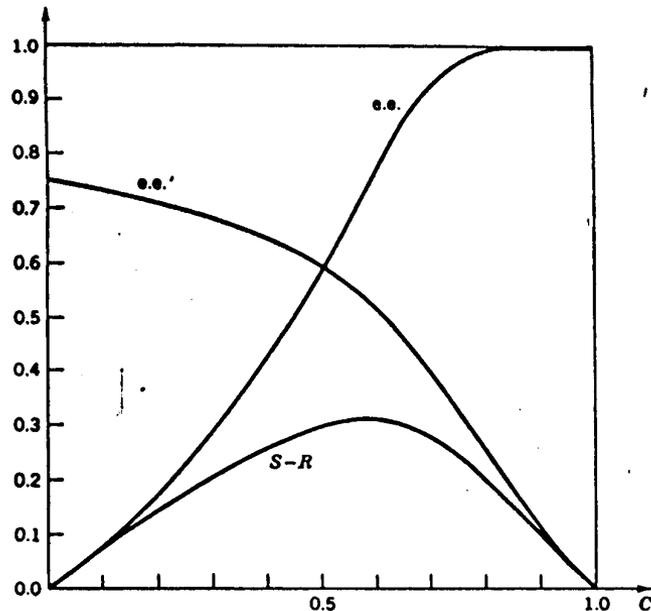
$$\frac{d[R]}{dt} = -k_R[R], \quad \frac{d[S]}{dt} = -k_S[S]$$

$$s = k_R/k_S$$

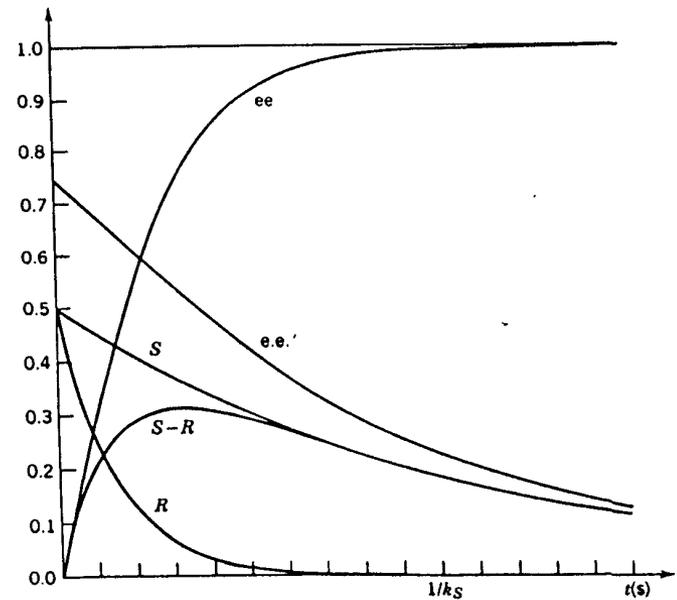
$$s = \frac{\ln([R]/[R_0])}{\ln([S]/[S_0])} = \frac{\ln 2[R]}{\ln 2[S]}$$

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

Cinetica pseudo-primo ordine in R e S con $s=k_R/k_S=7$



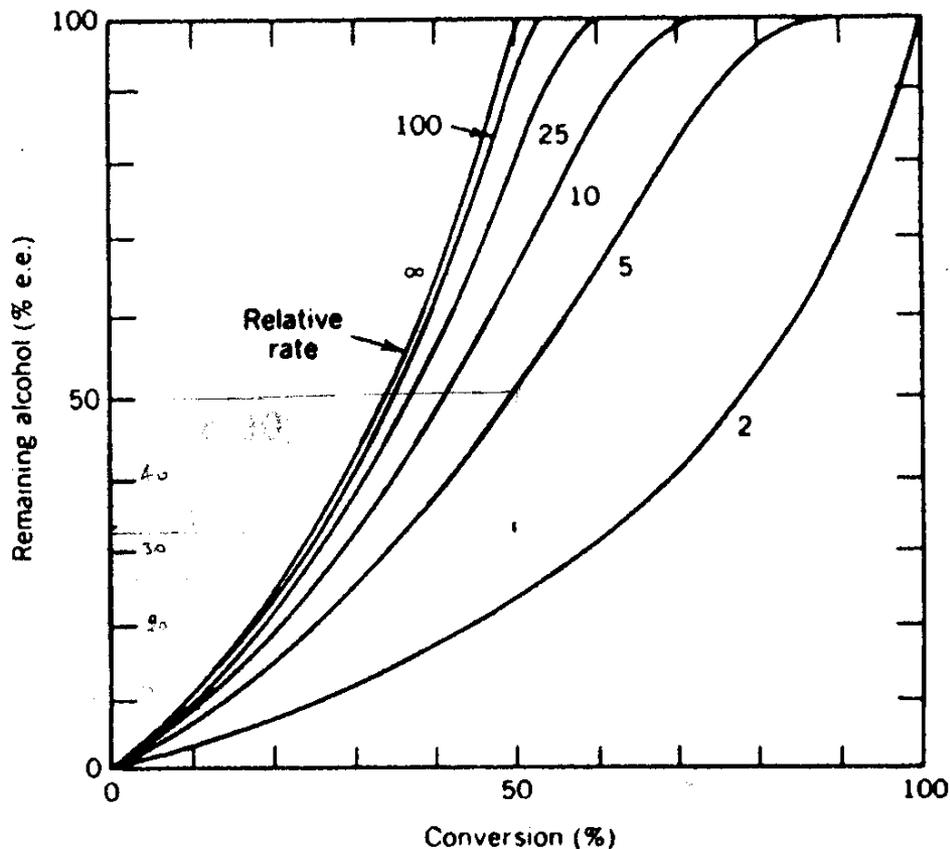
Conversione



Tempo

L'ee del reagente aumenta nel corso della reazione mentre quello del prodotto cala

Epossidazione di alcoli allilici racemi con il reagente di Sharpless (Ti(IV)-DET-*terz*-Butil idroperossido)



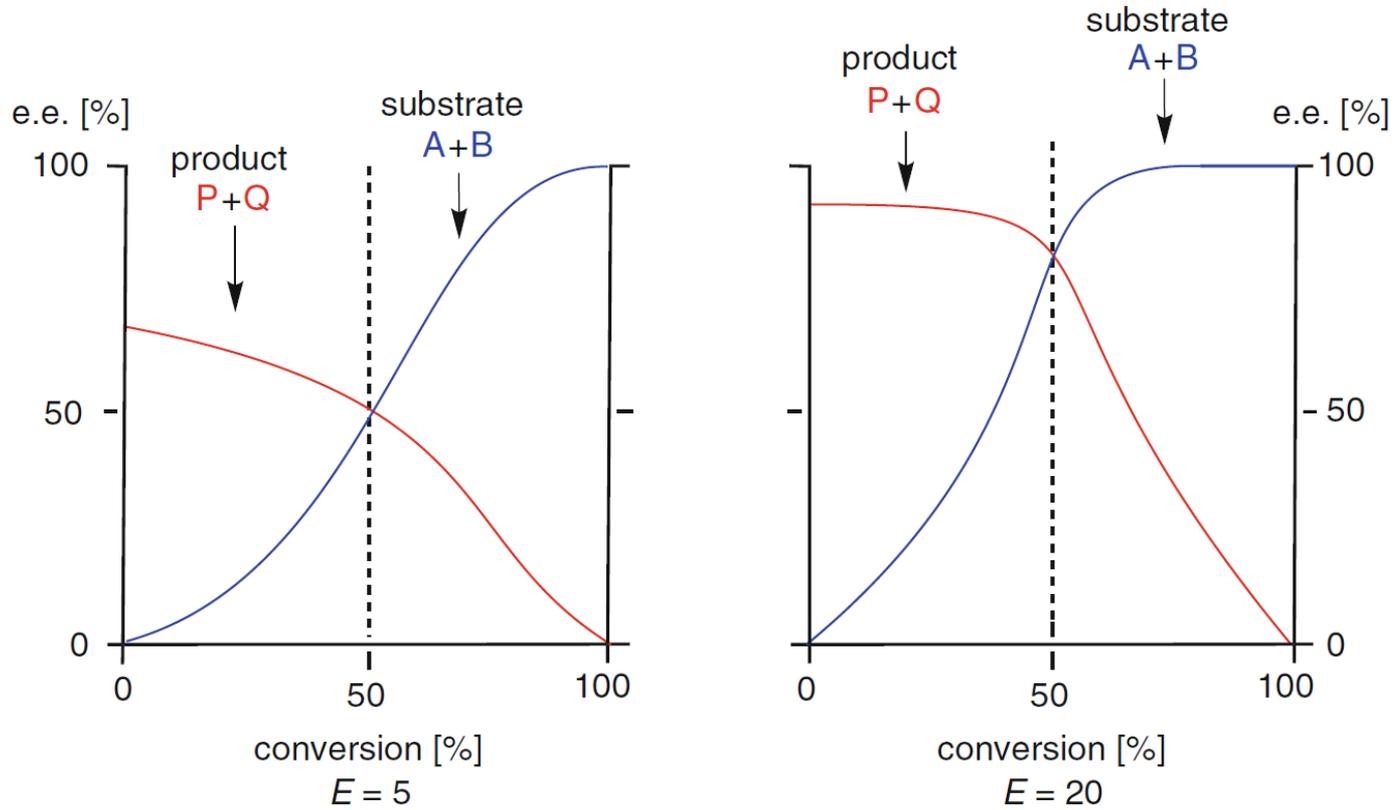
s = relative rate

Relazione tra C e s per ottenere elevati ee

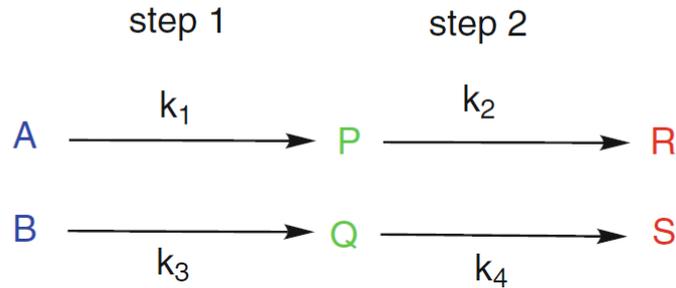
Extent of Reaction C (%) and Stereoselectivity Factor s (≤ 10)
Required for Obtaining Recovered Material with Enantiomeric
Composition of 99% e.e. in Kinetic Resolution of a Racemic
Mixture^a

s	C	s	C	s	C	s	C
1.5	99.999	2.0	99.7	2.8	97.3	5.0	86.6
1.7	99.97	2.2	99.4	3.0	96.4	7.0	79.2
1.8	99.93	2.4	98.9	3.5	94.0	10.0	72.1
1.9	99.86	2.6	98.2	4.0	91.3		

Dipendenza del valore di e_e dalla conversione



Risoluzione biocatalitica sequenziale



A, B = enantiomeric starting diesters

P, Q = enantiomeric intermediate monoesters

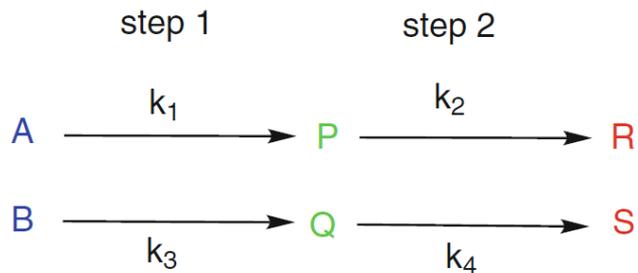
R, S = enantiomeric product diols

k_1 through k_4 = relative rate constants

Il substrato racemo ha due siti di reazione uguali, per cui la reazione procede due volte con la formazione di un mono estere intermedio

In pratica il substrato deve coordinarsi al sito attivo e reagire due volte

Si ottengono selettività molto alte

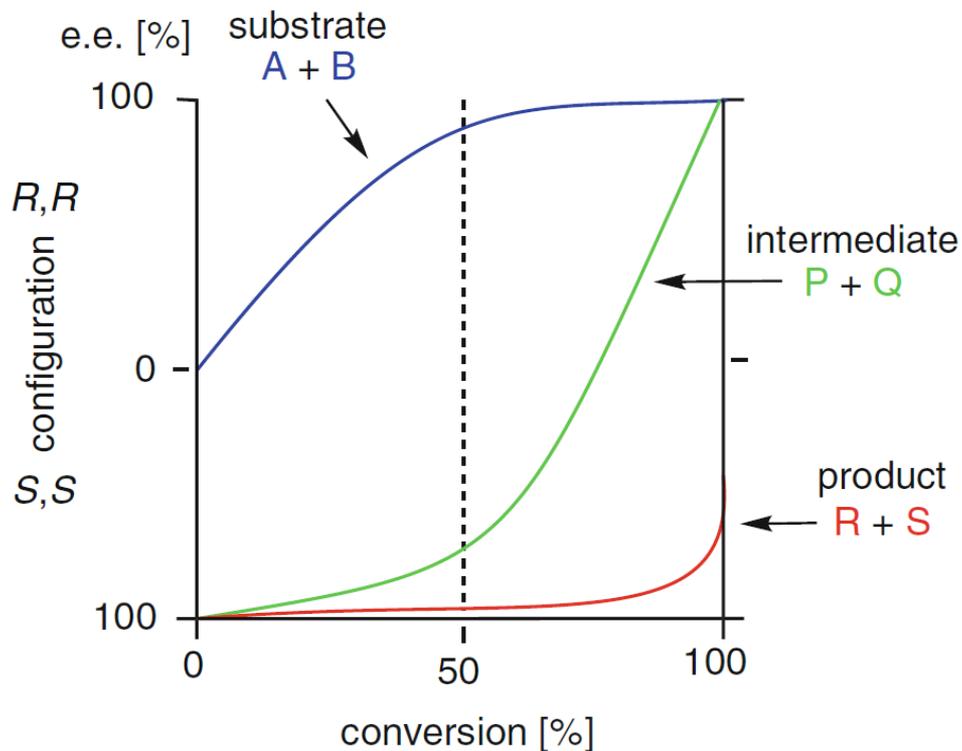


A, B = enantiomeric starting diesters

P, Q = enantiomeric intermediate monoesters

R, S = enantiomeric product diols

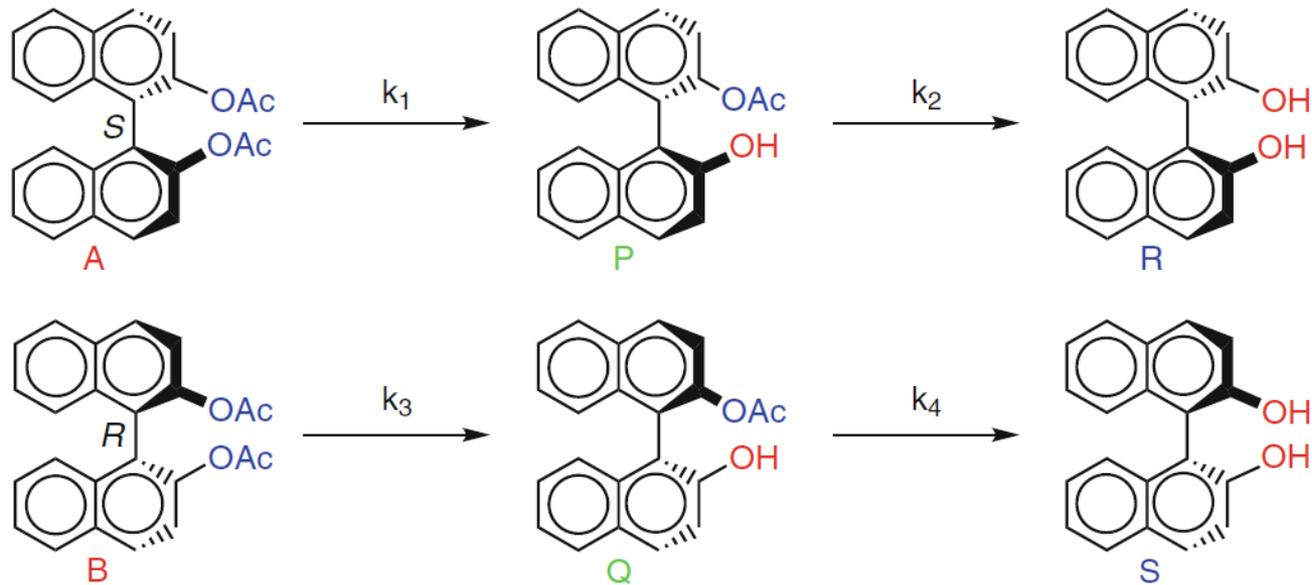
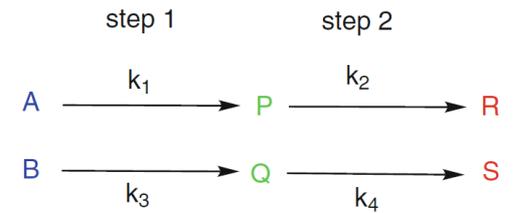
k_1 through k_4 = relative rate constants



$$E_{\text{tot}} \sim \frac{E_1 \times E_2}{2}$$

E_{tot} rappresenta la selettività che un singolo processo dovrebbe avere per arrivare a questi risultati

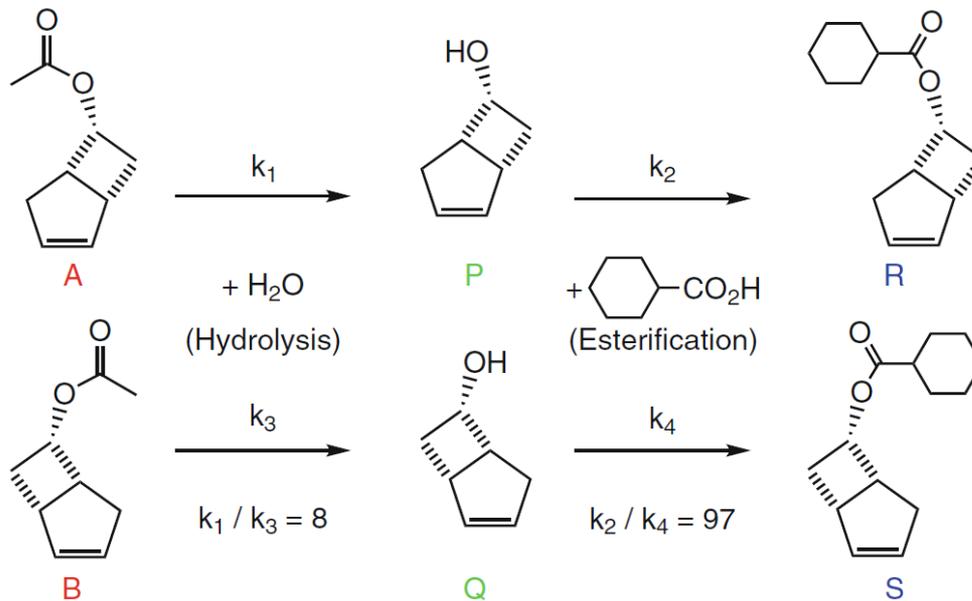
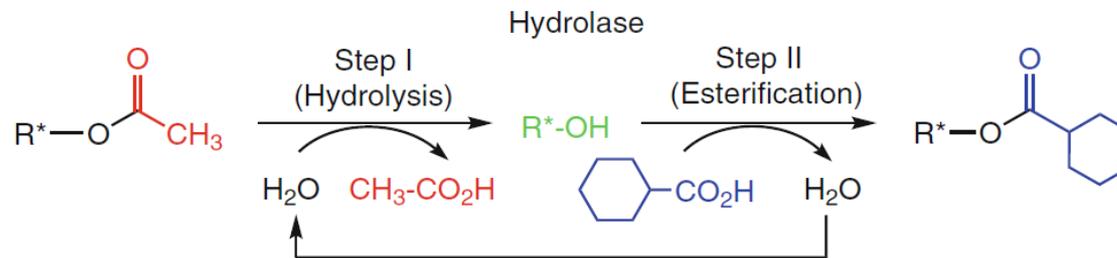
Risoluzione biocatalitica sequenziale



conditions: aqueous buffer, *Absidia glauca* cells

E_{tot} rappresenta la selettività che un singolo processo dovrebbe avere per arrivare a questi risultati

Risoluzione biocatalitica sequenziale



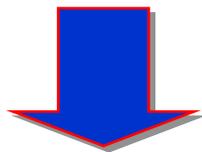
$$E_{tot} \sim \frac{E_1 \times E_2}{2}$$

$$E_{tot} \sim (8 \times 97) / 2 \sim 388$$

Deracemizzazioni

Risoluzione cinetica: svantaggi

- Massima resa del 50%. Scarsa importanza dell'enantiomero non voluto
- Separazione del substrato dal prodotto può essere complessa e costosa
- Eccesso enantiomerico dei prodotti non ottimale



Per evitare questi svantaggi si possono utilizzare varie strategie:

Risoluzione Ripetuta
Inversione in-situ
Risoluzione Dinamica

Risoluzione Ripetuta

L'enantiomero non voluto (distomero), dopo separazione, viene racemizzato e riutilizzato nel successivo ciclo di risoluzione cinetica

Approccio importante in processi industriali (sistemi in continuo)

Conversione totale nel prodotto voluto (virtuale)

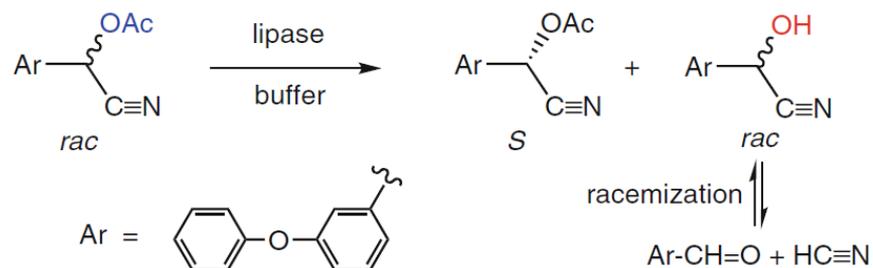
Ciclo	Eutomero (%)	Distomero (%)
1	50	50
2	25	25
3	12.5	12.5
4	6.25	6.25
	93.75	6.25

Dopo 4 cicli teorica resa ~ 94%

Rese reali più basse a causa delle condizioni energetiche richieste per la racemizzazione

Uso di racemasi

Risoluzione Ripetuta



Lipase	e.e. Ester [%]	Configuration	Selectivity (<i>E</i>)
CRL	70	<i>R</i>	12
PSL	93	<i>S</i>	88
<i>Alcaligenes</i> sp.	93	<i>S</i>	88
<i>Chromobacterium</i> sp.	96	<i>S</i>	160
<i>Arthrobacter</i> sp.	>99	<i>S</i>	>200

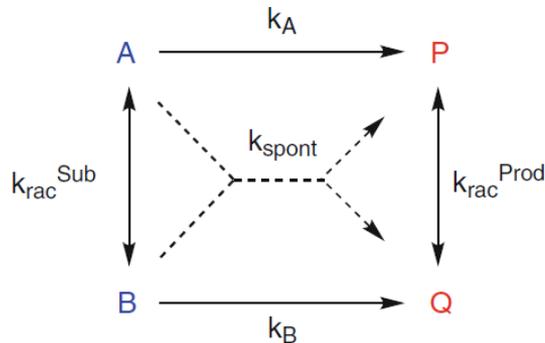
Scheme 2.65 Hydrolysis of cyanohydrin esters using microbial lipases

Racemasi e relativi substrati

Entry	Racemase	Substrates
1	α -Amino- ϵ -caprolactam (ACR)	ACR 43, α -amino- δ -valerolactone
2	Mandelic acid	(substituted) mandelic acid 69, 2-hydroxy-but-3-ene
3	Hydantoin	substituted hydantoins
4	Alanine	4 amino acids
5	Threonine	18 amino acid derivatives
6	Arginine	15 amino acid derivatives
7	<i>Pseudomonas Putida</i>	12 amino acid derivatives
8	N-Acyl-amino acid	18 N-acyl-amino acids
9	aminobutyric acid	aminobutyric acid
10	Aspartic acid	aspartic and cysteic acid
11	Proline	proline (derivatives)
12	Glutamic acid	glutamic acid
13	Sulfur containing amino acids	cystine ²⁷¹ , homocysteine ²⁷² , methionine ²⁷³ and selenium analogues ²⁷⁴ .
14	<i>Flavobacterium</i>	lysine and arginine ²⁷⁵
15	Serine	serine
16	Miscellaneous	miscellaneous

Risoluzione Cinetica Dinamica

La risoluzione avviene in condizioni nelle quali il substrato racemizza rapidamente.



A, B = substrate enantiomers

P, Q = product enantiomers

k_A, k_B = enzymatic hydrolysis of enantiomers A, B

$k_{rac}^{Sub}, k_{rac}^{Prod}$ = racemization of substrate, product

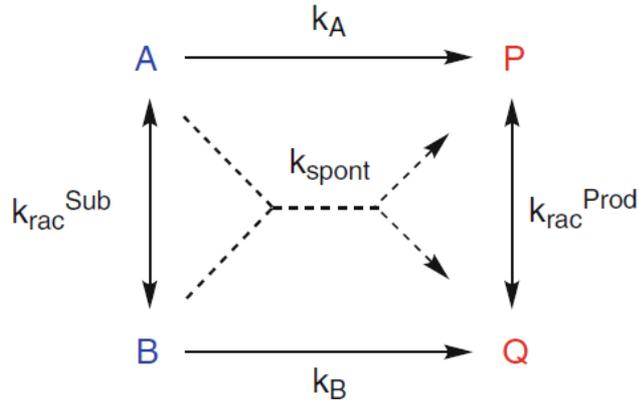
k_{spont} = spontaneous hydrolysis

* depletion of e.e.p in kinetic resolution

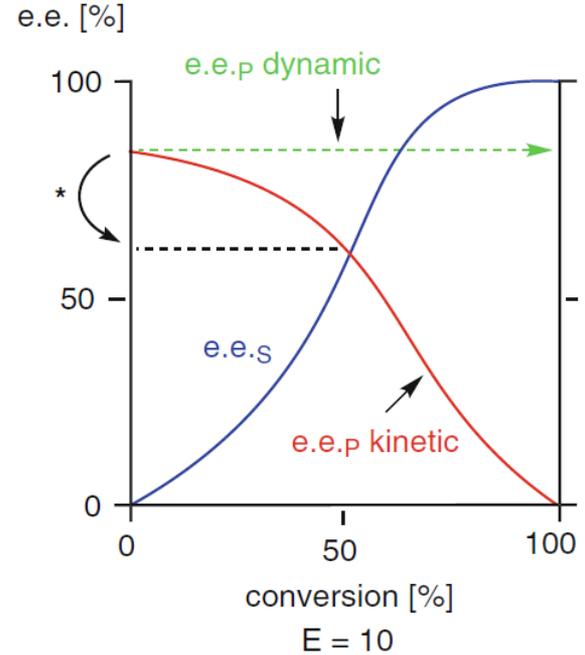
Diverse reazioni avvengono contemporaneamente:

- ✓ L'enzima deve avere un'elevata specificità per uno degli enantiomeri ($k_S \gg k_R$ o $k_R \gg k_S$).
- ✓ L'idrolisi non catalizzata deve essere trascurabile
- ✓ La racemizzazione del substrato deve avvenire a velocità uguali e maggiori della reazione enzimatica ($k_{rac}^{Sub} \geq k_R$ o k_S) al fine di consentire concentrazioni sufficienti di enantiomero buono
- ✓ La racemizzazione del prodotto deve essere trascurabile

Risoluzione Cinetica Dinamica



diminuzione di ee_p
a causa delle
risoluzione
cinetica



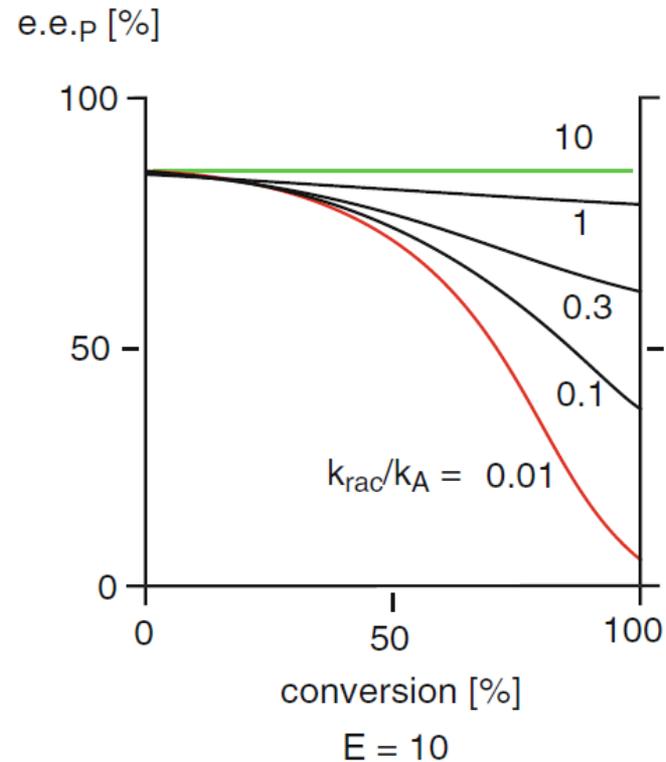
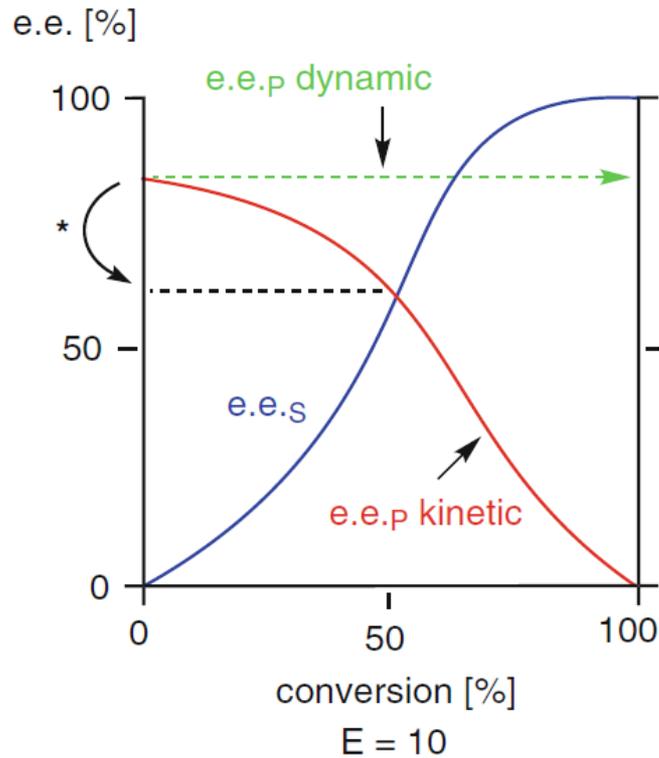
k_A, k_B = enzymatic hydrolysis of enantiomers A, B

$k_{rac}^{Sub}, k_{rac}^{Prod}$ = racemization of substrate, product

k_{spont} = spontaneous hydrolysis

$$e.e.p = \frac{(E-1)}{(E+1)}$$

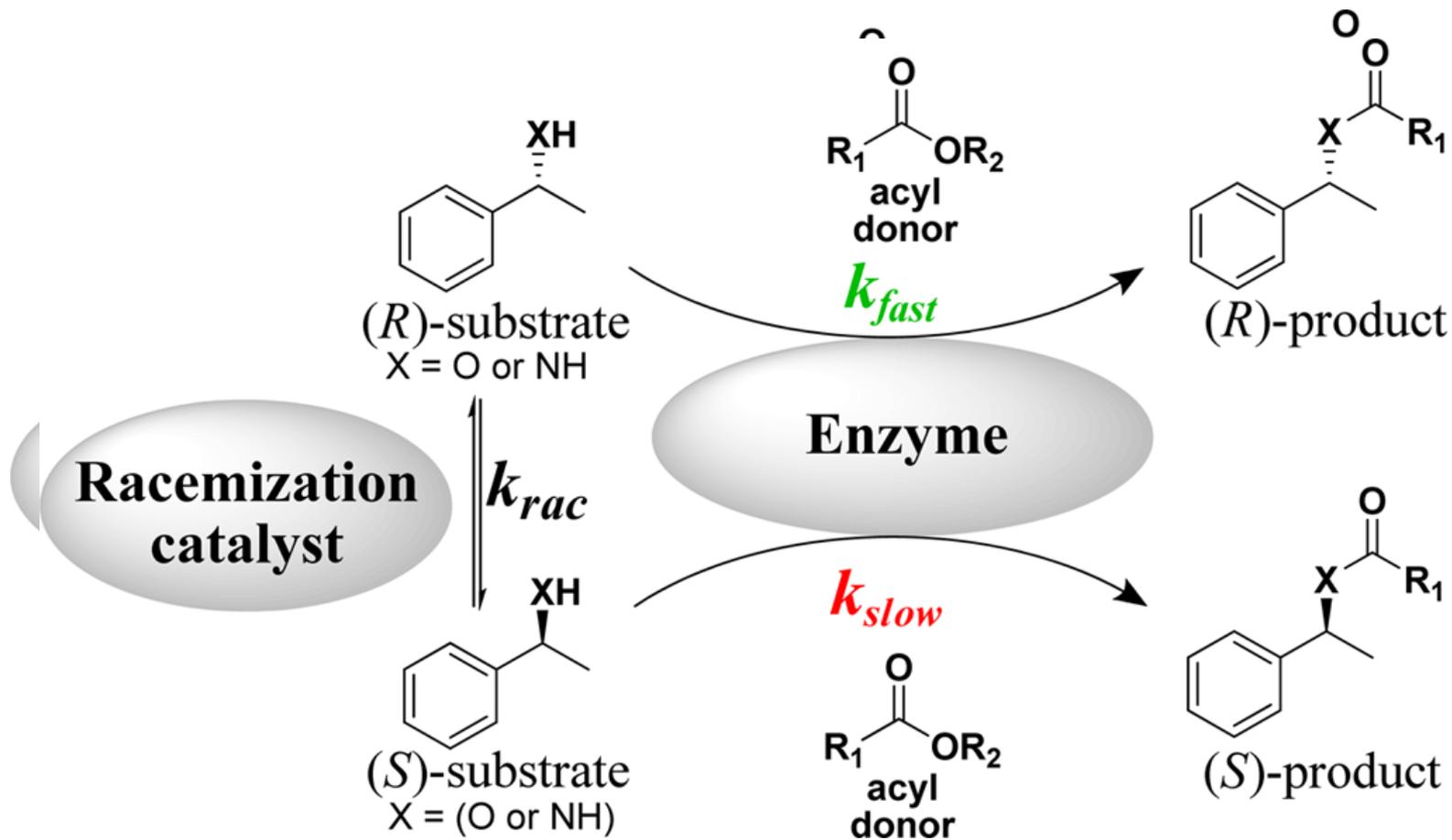
Risoluzione cinetica Dinamica



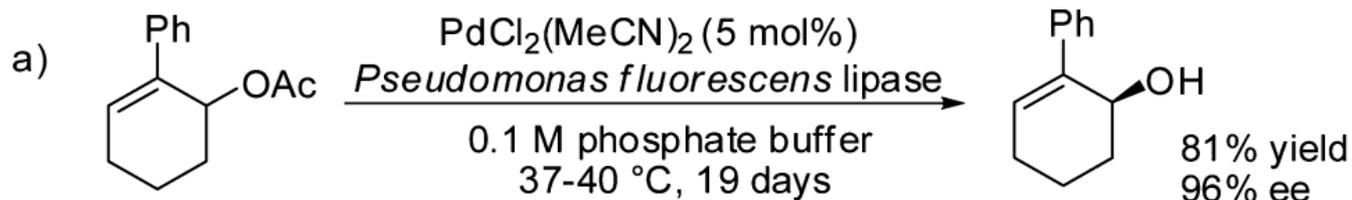
con la risoluzione dinamica si possono ottenere elevati valori di ee_p solo per elevate stereoselezioni
 $E=19 ee_p=90\%$; $E=40 ee_p=95\%$; $E=100 ee_p=98\%$

Risoluzione Cinetica Dinamica Chemoenzimatica

Risoluzione di alcoli e ammidi

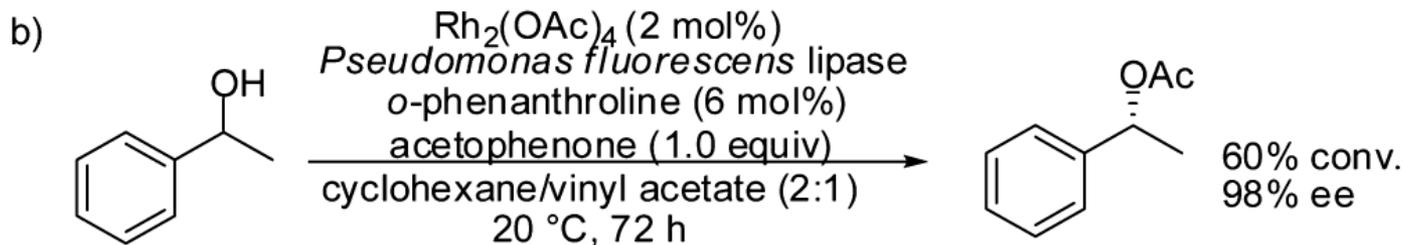


Risoluzione Cinetica Dinamica Chemoenzimatica Risoluzione di alcoli e ammidi - Sistema di Williams



Tetrahedron Lett. 1996, 37, 1859–1862

Reazione lentissima - proof of principle



Tetrahedron Lett. 1996, 37, 7623–7626

Novozyme-435

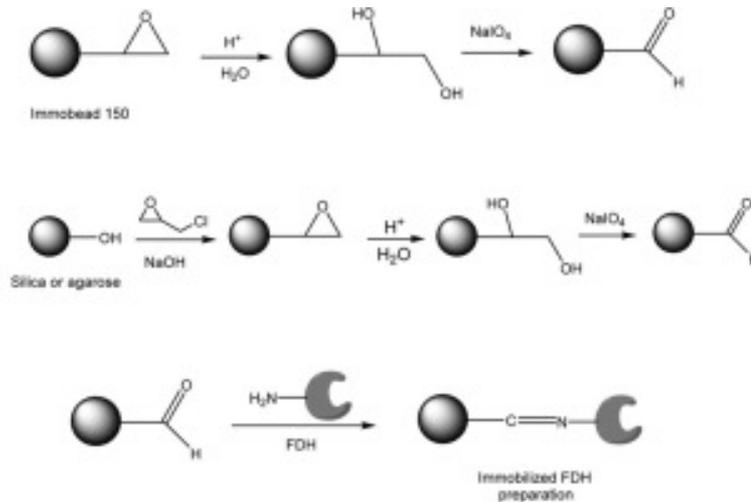
CALB - Lipase B *Candida antarctica*

Lipase B *Candida antarctica*, recombinant from *Aspergillus oryzae*: 250 mg=765 € (9 U/mg)

10 g Immobead 150, recombinant from yeast (164 €) (≥ 2000 U/g)



Immobilizzazione di un enzima su resina

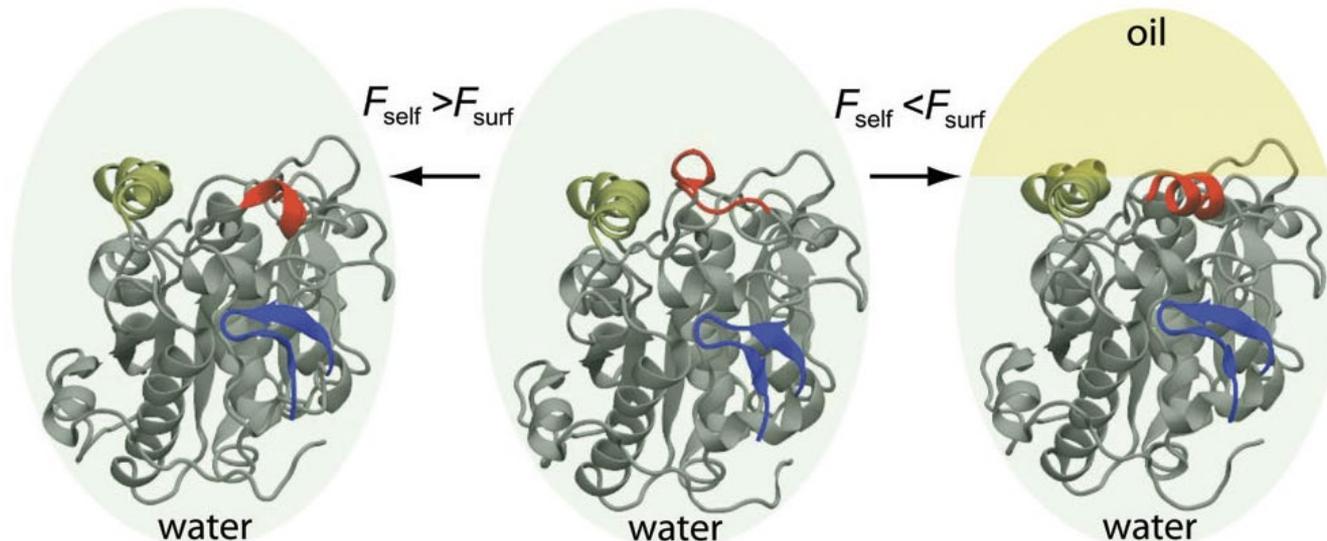


Lipasi

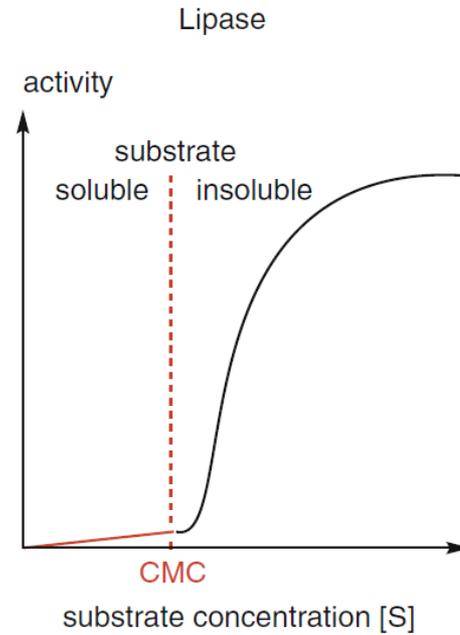
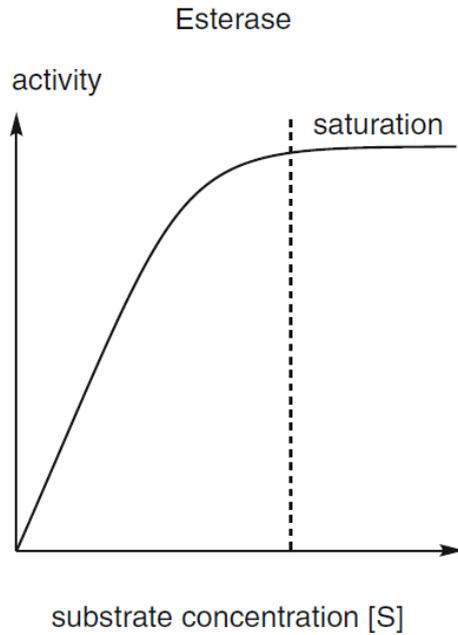
Le lipasi sono enzimi che idrolizzano i trigliceridi in acidi grassi e glicerolo

Oltre al loro ruolo biologico, vengono ampiamente utilizzati per la lavorazione degli alimenti e dell'olio e per la preparazione di intermedi chirali enantiopuri e costituiscono il gruppo di enzimi più studiati e utilizzati (30% dei processi bioenzimatici)

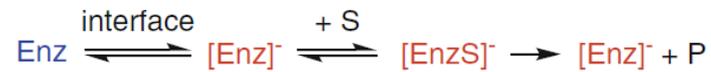
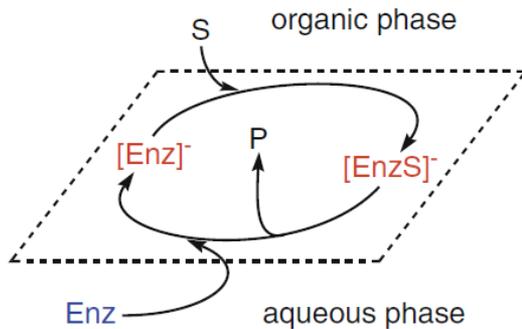
Sono state clonate numerose lipasi e sono disponibili circa 150 strutture cristalline



Lipasi vs Esterasi (cinetiche di Michaelis-Menten)



Lipasi



Enz = inactive lipase (closed lid conformation)

[Enz]* = active lipase (open lid conformation)

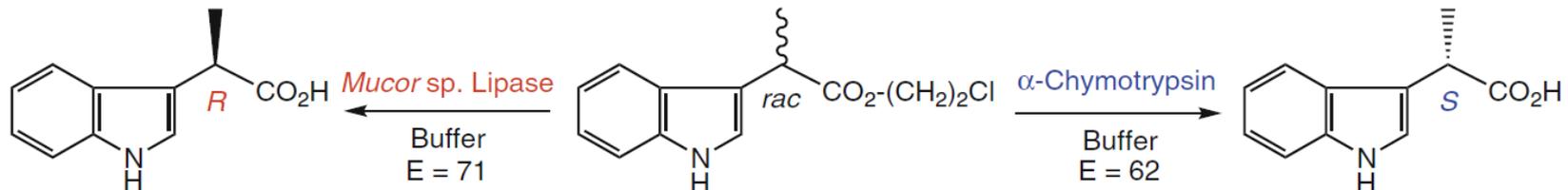
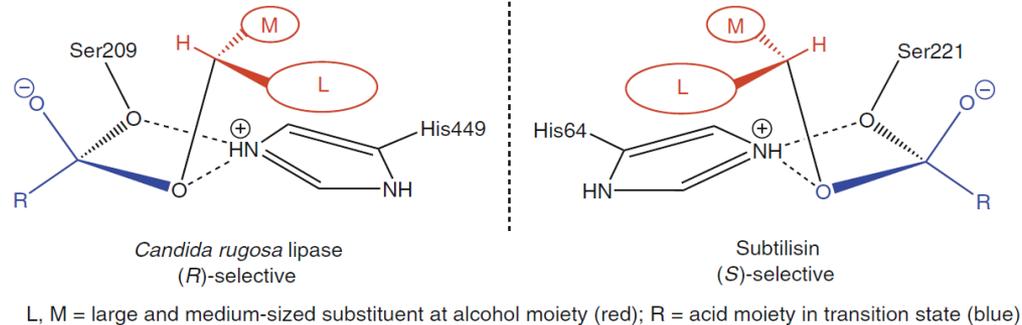
S = Substrate; P = Product

LIPASI

Per garantire un'attività ottimale, le idrolisi catalizzate da lipasi dovrebbero quindi essere condotte in un mezzo bifasico: con solo substrato a concentrazioni elevate, tali da costituire la seconda fase organica, oppure con un solvente organico immiscibile con acqua (esano, dialchil etere, solvente aromatico).

Triacilgliceroli come trioleina o -butirina sono usati come substrati standard per la determinazione dell'attività della lipasi, mentre per esterasi p-nitrofenil acetato è lo standard classico.

Stereoselezione opposta rispetto a esterasi o proteasi

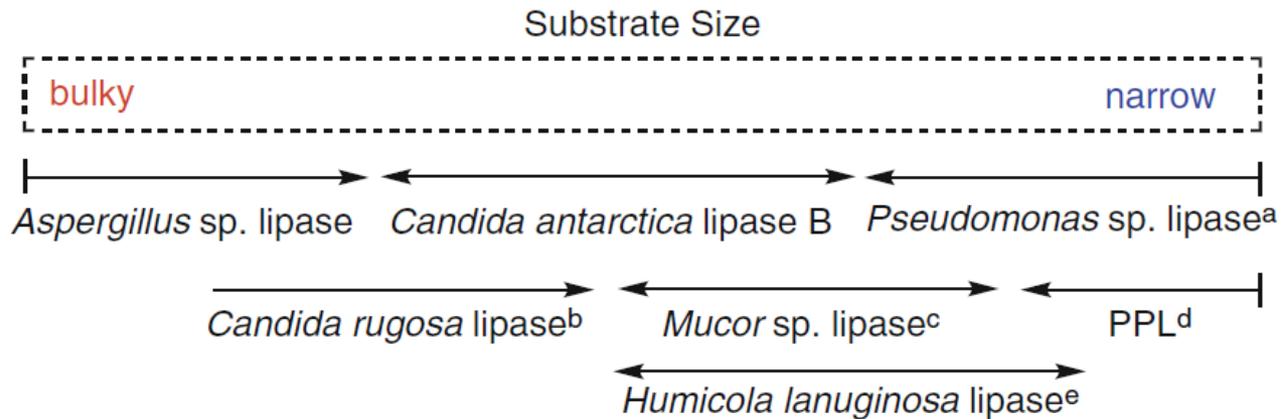


LIPASI

Una grande varietà di lipasi è prodotta da batteri o funghi e sono secrete come enzimi extracellulari e questo rende la loro produzione su larga scala particolarmente facile.

La maggior parte delle lipasi esistono in due isoforme (isoenzimi), solitamente indicati come tipo A e B. Negli estratti grezzi solitamente sono contenute entrambe le isoforme;

Solamente le isoforme A e B della Lipasi da *Candida antarctica* lipasi vengono prodotte in forma pura via ingegneria genetica.



LIPASI

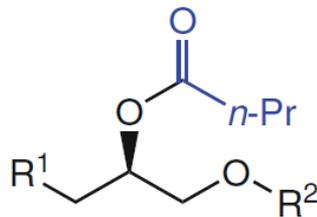
Pancreatic Porcine Lipase (PPL)

Candida sp. Lipases (da lieviti): Candida lipolytica, C. antarctica (CAL), C. rugosa (CRL)

CALB

CALB è una proteina eccezionalmente robusta che viene disattivata solo a 50–60 °C e mostra anche una elevata resistenza ai solventi organici. In differenza di molte altre lipasi, l'enzima mostra solo una debole attivazione interfacciale e può anche lavorare in fase omogenea.

CALB è la lipasi più utilizzata sia nell'idrolisi che nella sintesi di esteri



R ¹	R ²	Cosolvent	<i>E</i>
Cl	CH ₂ -Ph	none	7
Cl	CH ₂ -Ph	acetone (30%)	>200
Cl	(CH ₂) ₂ -Ph	none	20

MeO	CH ₂ -Ph	none	16
MeO	CH ₂ -Ph	<i>t</i> -BuOH (20%)	106
MeO	(CH ₂) ₂ -Ph	none	>100

Lipasi di *Candida antarctica*

Questi enzimi sono stati trovati in Antartico nel corso di uno screening effettuato per ottenere lipasi che operassero in condizioni estreme da usare in formulazioni per la detergenza

I due isoenzimi sono abbastanza diversi:

isoenzima A: Ca^{2+} dipendente, termostabile, molto stabile con trigliceridi in modo non specifico, non molto utile per sistemi non naturali.

isoenzima B: non è Ca^{2+} dipendente, meno termostabile, attivo con un largo numero di substrati non naturali.

Entrambi sono stati clonati e sovraespressi in *Aspergillus oryzae* e sono disponibili in larghe quantità

Meccanismo di Reazione della CALB

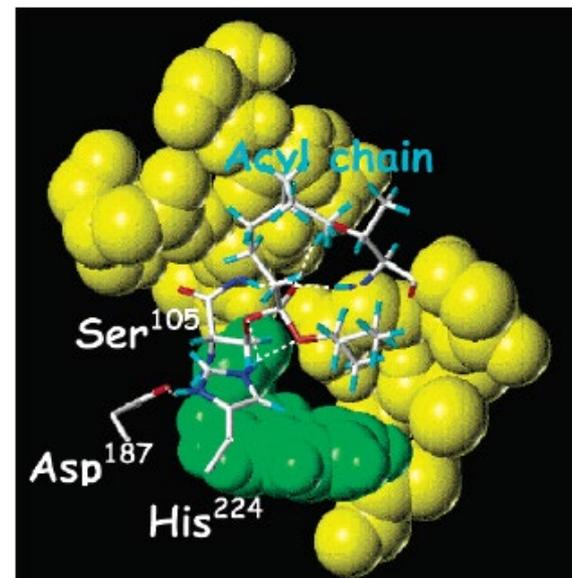
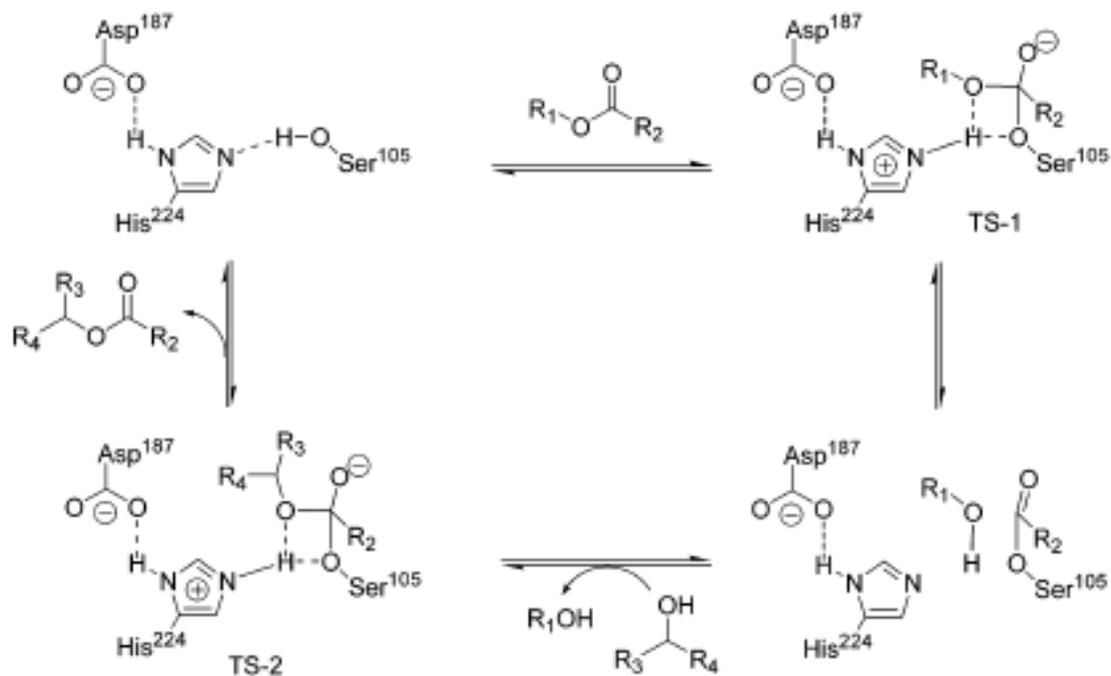
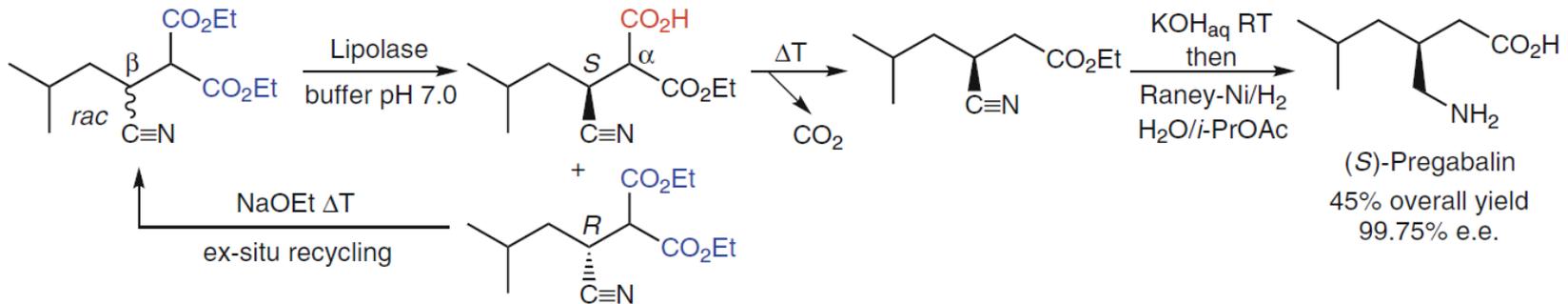


Figure 1. Productive docking for (*R*)-2-pentanol in the active site of CALB. Reprinted with permission from ref 14b. Copyright 1998 Taylor & Francis Ltd. (<http://www.tandf.co.uk/journals>).

(S)-PREGABALIN: processo industriale chemoenzimatico



Hydrolase	Enantiopreference	Enantioselectivity (<i>E</i>)
<i>Streptomyces griseus</i> protease	<i>R</i>	20
porcine liver esterase	<i>S</i>	2
<i>Candida antarctica</i> lipase (A or B)	<i>S</i>	3-5
<i>Mucor miehei</i> lipase	<i>S</i>	41
<i>Pseudomonas</i> sp. lipase	<i>S</i>	51

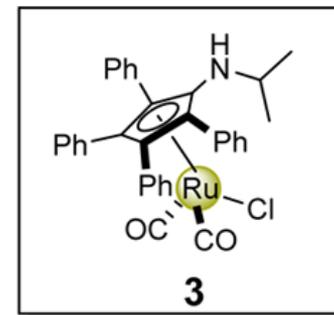
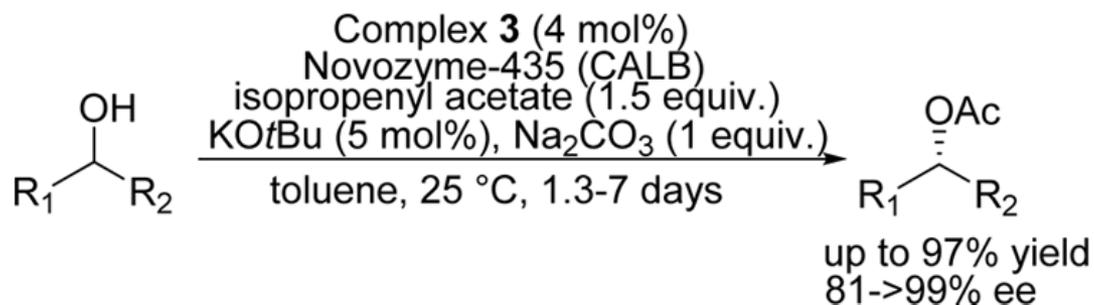
<i>Rhizopus delemar</i> lipase	<i>S</i>	>200
<i>Thermomyces lanuginosus</i> lipase	<i>S</i>	>200

Dopo ottimizzazione il processo di risoluzione catalizzato dalla lipasi si è potuto eseguire con essere eseguito a $[\text{substrato}]_0 = 3\text{M}$, con lotti da 3,5 tonnellate in un reattore da 8 m³ con un TTN di $\sim 10^5$. Il processo chemo-enzimatico ha permesso di ridurre l'utilizzo di solventi organici (del 92%), Raney Ni (del 87%) e materiale di partenza (del 39%) e eliminato la necessità di acido mandelico per risolvere il prodotto.

Il fattore E (rapporto tra la massa di scarto per massa di prodotto) è stata portata da 87 a 17

Risoluzione Cinetica Dinamica Chemo-Enzimatica

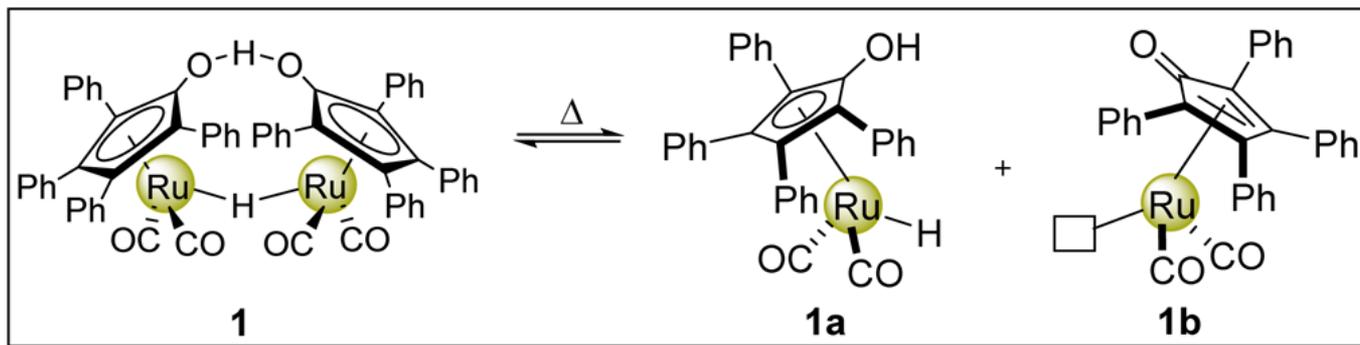
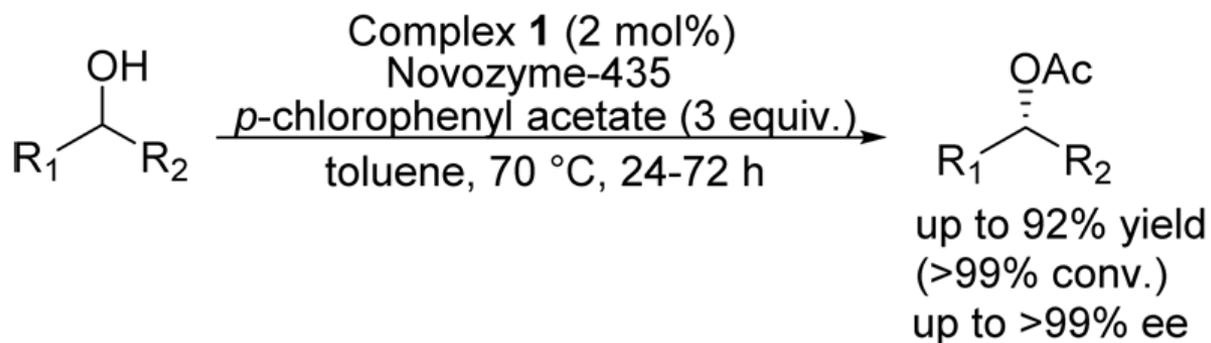
Risoluzione di alcoli (Park, 2002)



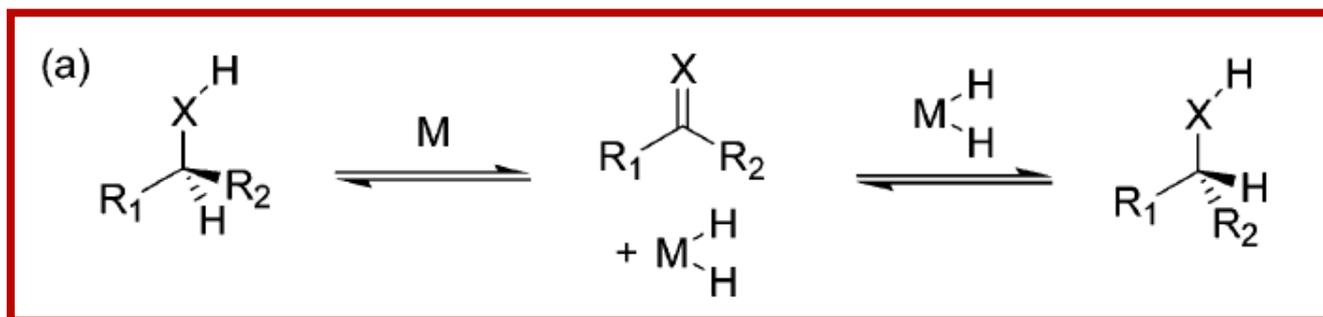
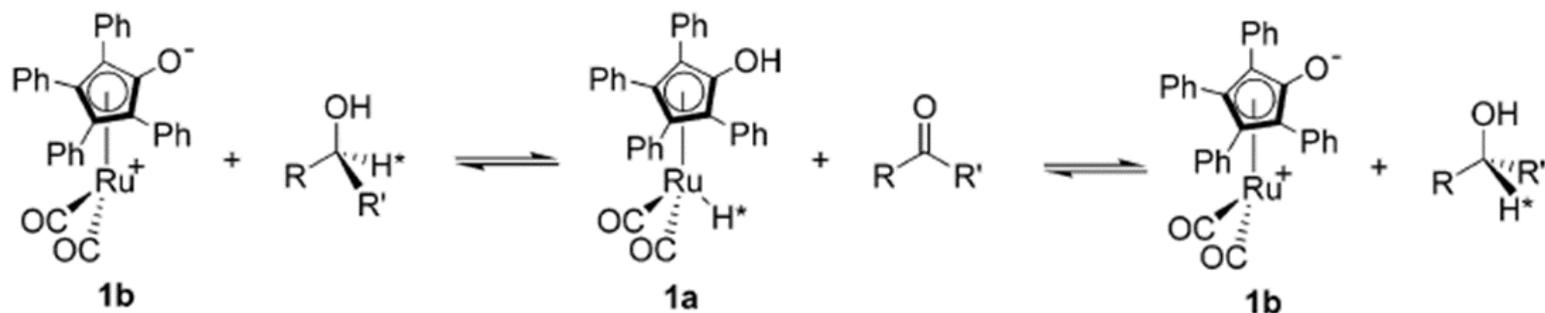
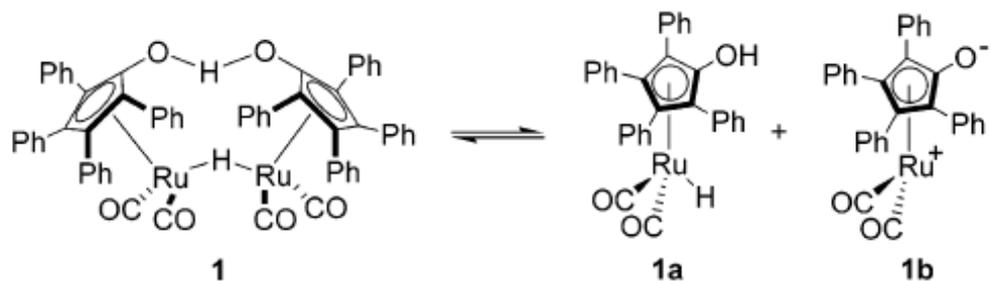
Temperatura ambiente, KOtBu (5%), carbonato (1 equiv),
rese quasi quantitative, reazione lenta

Risoluzione Cinetica Dinamica Chemoenzimatica

Risoluzione di alcoli - Sistema di Bäckvall

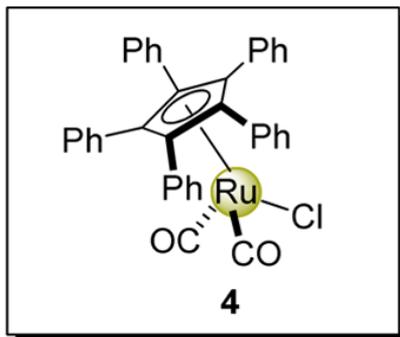


Meccanismo di Racemizzazione di alcoli ad opera di complessi di Ru



Risoluzione Cinetica Dinamica Chemoenzimatica

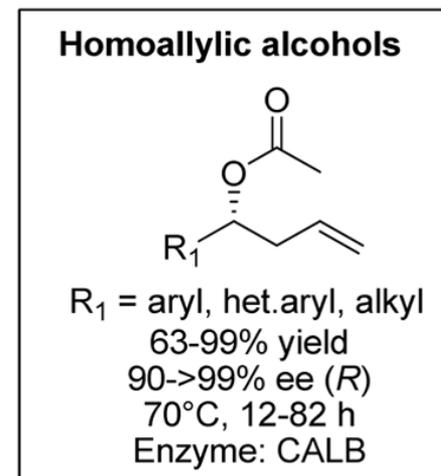
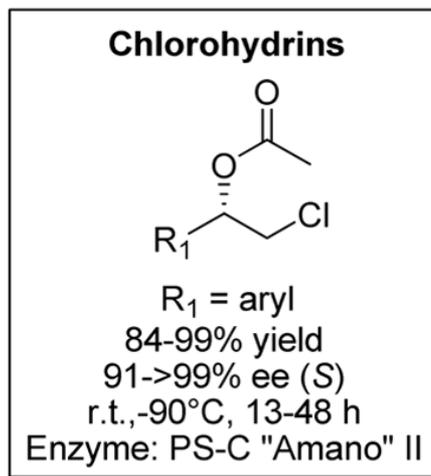
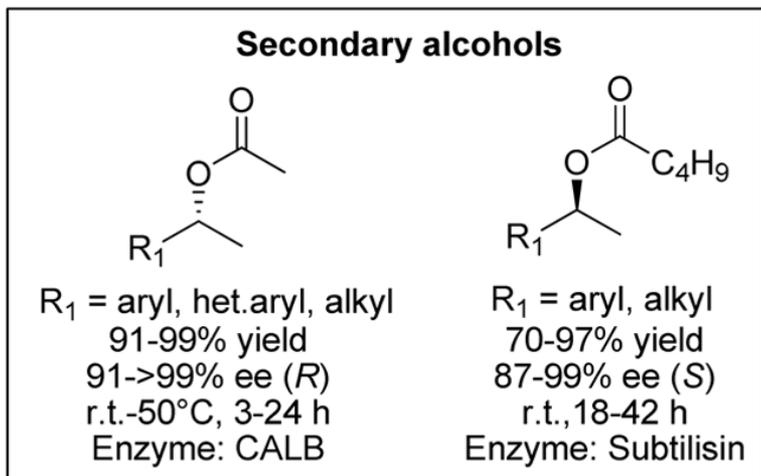
Risoluzione di alcoli (Bäckvall, 2013)



Enzymes used:

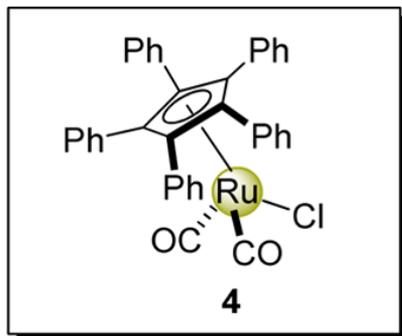
Burkholderia cepacia Lipase (BCL)
Candida antarctica Lipase B (CALB)
Pseudomonas cepacia (PS-C)
 Subtilisin

Selected examples of alcohols deracemized by DKR/DYKAT systems involving complex **4**:



Risoluzione Cinetica Dinamica Chemoenzimatica

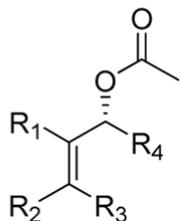
Risoluzione di alcoli (Bäckvall, 2013)



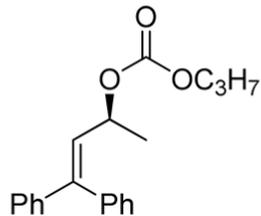
Enzymes used:

Burkholderia cepacia Lipase (BCL)
Candida antarctica Lipase B (CALB)
Pseudomonas cepacia (PS-C)
 Subtilisin

Allylic Alcohols

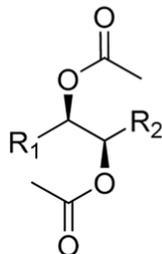


R_{1-3} = H, aryl, alkyl
 R_4 = alkyl
 89-99% yield
 97->99% ee (*R*)
 80°C, 18-24 h
 Enzyme: CALB

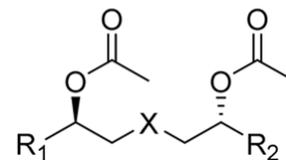


83% yield
 95% ee (*S*)
 36°C, 18 h
 Enzyme: Subtilisin

Diols

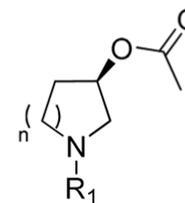


$R_{1,2}$ = aryl, alkyl
 61-95% yield
 up to >99% ee
 up to 10:1 dr
 50°C, 41-142 h
 Enzyme: CALB



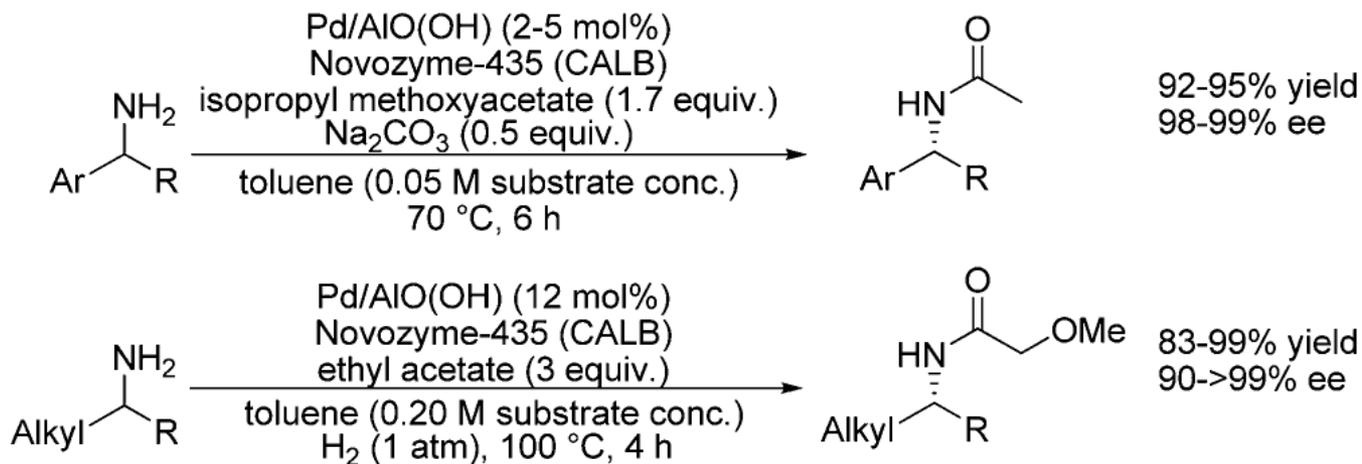
$R_{1,2}$ = alkyl, ester
 X = CH₂ or heteroatom
 77-98% yield
 up to >99% ee
 up to >99:1 anti/syn
 50-100°C, 24-77 h
 Enzyme: CALB, PS-C

Heterocyclic Amino Alcohols



R_1 = various protecting groups
 n = 1 or 2
 73-98% yield
 86-99% ee (*R*)
 50-60°C, 18-24 h
 Enzyme: CALB, BCL

DKR Ammine (Kim, Parker)

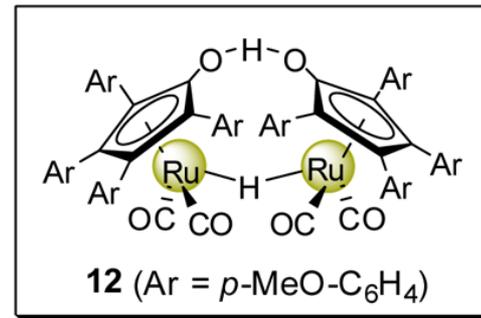
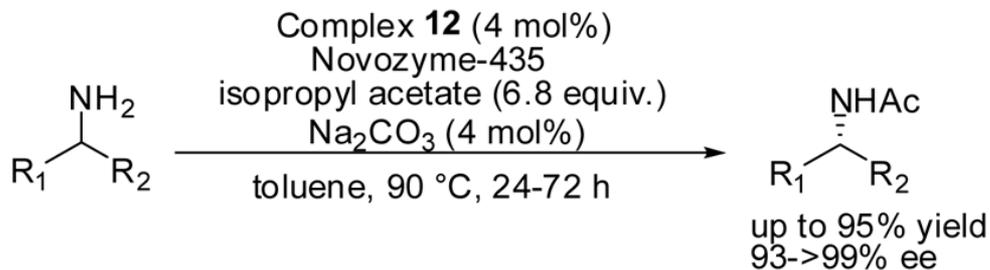


Org. Lett. 2007, 9, 1157

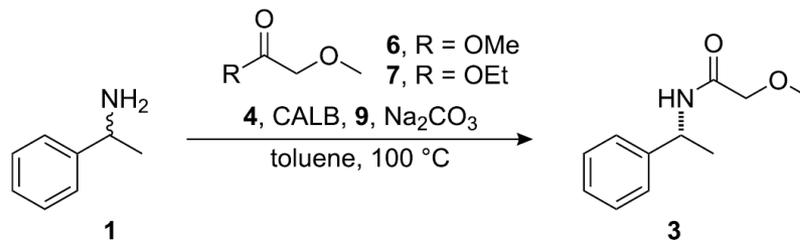
La DKR di ammine è più difficile, sono pochi i catalizzatori un grado di racemizzare le ammine.

- Le ammine sono ottimi leganti e disattivano il catalizzatore.
- Sono necessarie temperature di reazione elevate e questo è spesso incompatibile con l'uso di enzimi.
- Le immine che si generano sono specie reattive che possono dare processi secondari (idrolisi a chetoni, produzione di aminali, etc.)

DKR Ammine (Bäckvall)



Org. Lett. 2007, 9, 1157



Entry	1 (mmol)	Acyl donor	Acyl donor (equiv)			8 (equiv)	ee (%)	Yield (%) ^b
			0 h	24 h	48 h			
1	10	7	0.75	0.35	—	2.5	97	93 (90)
2	10	7	0.4	0.35	0.35	2.5	99	91
3	10	6	0.75	0.35	—	1.25	98	(74)
4 ^c	45	6	0.4	0.35	0.35	1.25	98	(68)
5 ^d	45	6	0.75	0.35	—	1.25	98	(83)

^aConditions: **1**, 1.25 mol % of **4**, 100 mg of CALB, 200 mg of Na₂CO₃, acyl donor, hydrogen donor **9**, 50 mL of toluene, 100 °C, 72 h; ^bdetermined by GC, isolated yield in parenthesis; ^c225 mg of CALB, addition of 113 mg of CALB after 24 and 48 h; ^d340 mg of CALB, addition of 110 mg of CALB after 24 h.