

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 (1×10^{-3} - $10^{-4}\%$), per catalizzatori artificiali (0.1-1%).

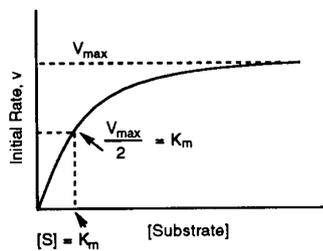
1

Processo enzimatico - Cinetiche di Michaelis Menten



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

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



Elevate concentrazioni di substrato

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

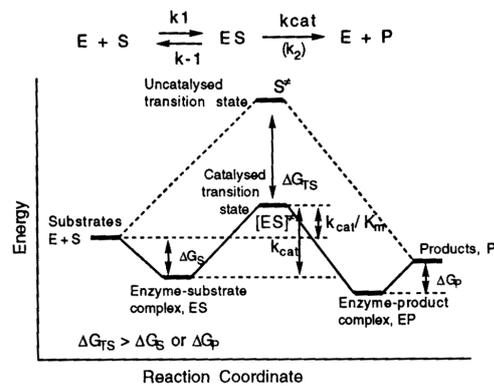
Basse concentrazioni di substrato

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

2

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

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



3

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.

4

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.

5

Classificazione di enzimi

Enzyme class	Number classified	Number available	Reaction type	Utility ^a
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%

6

Enzimi come Biocatalizzatori

Table 1. Enzymes commonly used for organic synthesis.

Not Requiring Cofactors	Not Requiring Added Cofactors	Cofactor Requiring
1) Hydrolytic Enzymes: Esterases Lipases Amidases Phospholipases Epoxide Hydrolases Nucleoside Phosphorylase SAM Synthetase	1) Flavoenzymes: Glucose Oxidase Amino Acid Oxidases Diaphorase 2) Pyridoxal Phosphate Enzymes: Transaminases Tyrosinase S-Aminooxalate Dehydratase Cystathionine Synthetase	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 Asparaginase Phenylalanine Ammonia Lyase Fumarase Cyanohydrin Synthetase	3) Metalloenzymes: Galactose Oxidase Monooxygenases Dioxygenases Peroxidases Hydrogenases Enolate Reductases Aldolases Carboxylases Nitrile Hydrase	
3) Aldolases		
4) Glycosyl Transferases		
5) Glycosidases		
6) Oxynitilase		
	4) Thiamin Pyrophosphate dependent enzymes: Transketolases Decarboxylases	
	5) Others: SAM 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.

7

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-Aminoacetoxyccephalosporanic 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	(R,S)-2-Chloropropionic acid	(S)-2-Chloropropionic acid	Intermediate for herbicides
Lipase	(R,S)-Glycidyl butyrate	(S)-Glycidyl butyrate	Chemical intermediate
Lipase	Isosorbide diacetate	Isosorbide 2-acetate	Pharmaceutical intermediate
Lipase	(R,S)-Naproxen ethyl ester	(S)-Naproxen	Drug
Lipase	Racemic 2,3-epoxy-3-(4-methoxyphenyl) propionic acid methyl ester	(2R,3S)-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.

8

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.

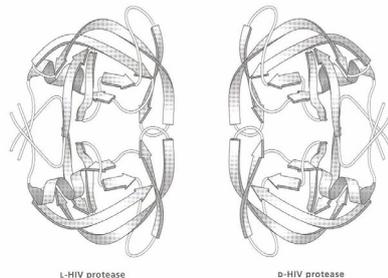
Stereoselettivi: Gli enzimi sono molecole chirali enantiopure e quindi sono catalizzatori chirali. Possono quindi reagire in maniera diversa con gruppi enantiotopici producendo molecole chirali con un certo grado di arricchimento enantiomerico.

9

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.



10

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.

11

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.

12

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	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

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

13

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

14

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 (±)

15

Fonti di Enzimi

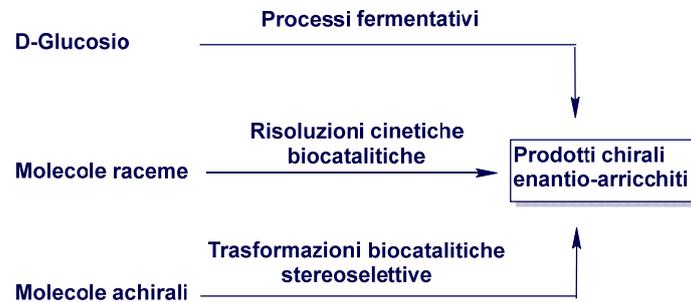
La maggior parte degli enzimi usati nelle biotrasformazioni sono usati nella forma non purificata e quindi sono relativamente economici. Il contenuto varia (1-30%) e la forma non purificata è generalmente più stabile.

Si ottengono:

- **Industria della detergenza (lipasi e proteasi)**
- **Industria alimentare (proteasi e lipasi per la lavorazione della carne, formaggio, grassi e olio. Per le 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.**

16

Processi Biocatalitici



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)

17

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 (nucleofilo):

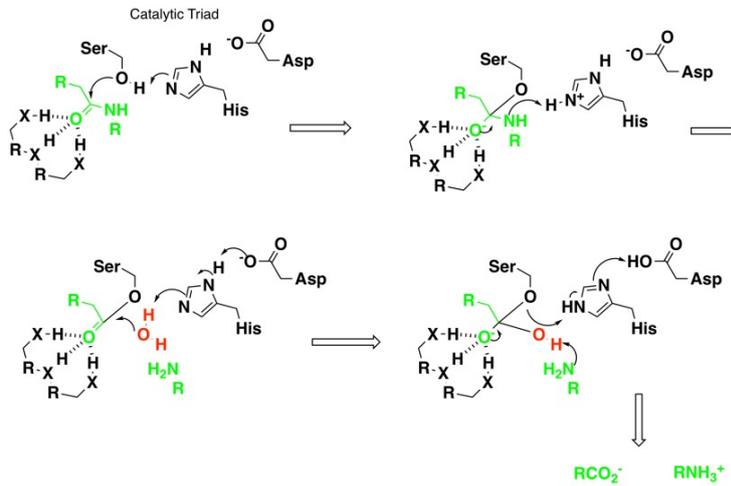
-OH (serina) esterasi di fegato di maiale, lipasi microbiche

-COO⁻ (acido aspartico) pepsina

-SH (cisteina) papaina

18

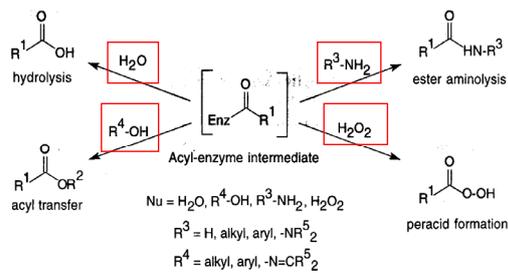
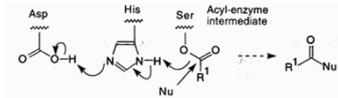
Meccanismo serina idrolasi



19

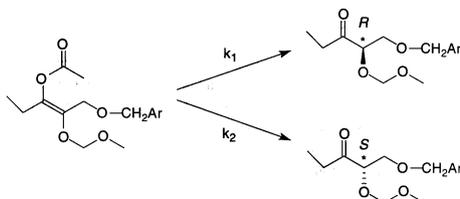
In ambienti con basse concentrazioni di acqua altri nucleofili competono :

- ✓ 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**



20

Sintesi enzimatica stereoselettiva (substrati achirali)



Si genera un nuovo stereocentro grazie alla tautomeria cheto enolica

21



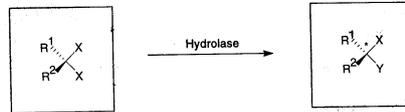
Table I. Enantioselective Hydrolysis of 1-Acetoxy-2-methylcyclohexene (**4a**)^a

entry	wt of wet cells, g	% yield of 5 ^b	% ee ^c	config ^d
1	4	77	72	<i>S</i>
2	7	78	83	<i>S</i>
3	11	72	88	<i>S</i>
4	14	79	90*	<i>S</i>

^aIncubation was performed with 0.2% of substrate **4a** for 3 h in 0.2 M phosphate buffer (pH 6.5). ^bDetermined by GLC analysis with 1-nonanol as internal standard. ^cDetermined by the optical rotation of **5**. ^dDetermined by comparing the sign of optical rotation. * [α]_D²⁵ +12.6° (c 0.73, MeOH), (lit.²⁸ [α]_D +12.2° (c 4, MeOH) (87% ee, *S* form)).

22

Sintesi enzimatica stereoselettiva (substrati achirali)

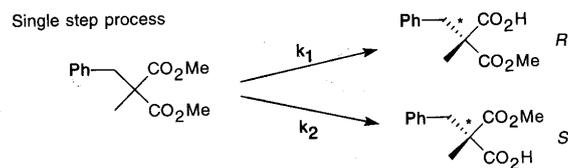


Reagisce preferenzialmente uno dei gruppi enantiotopici

Si genera una nuova unità stereogenica

23

Sintesi enzimatica stereoselettiva (substrati achirali)
Processo ad uno stadio (diesteri)



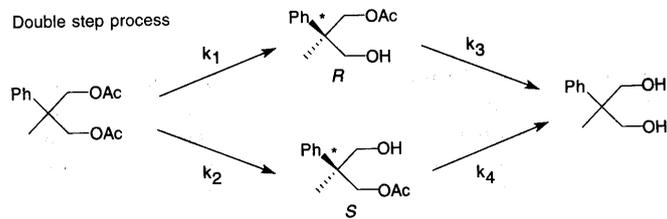
Idrolisi del diestere dell'acido malonico α,α -disostituito ad opera dell' α -chimotripsina o dell'esterasi di fegato di maiale (PLE)

La reazione si ferma dopo l'idrolisi del primo gruppo poiché il prodotto è fortemente idrato in ambiente acquoso e non viene più accettato dall'idrolasi

Cosa accade se la reazione procede? (seconda idrolisi)

24

Sintesi enzimatica stereoselettiva (substrati achirali)
Processo a due stadi (diacetato)

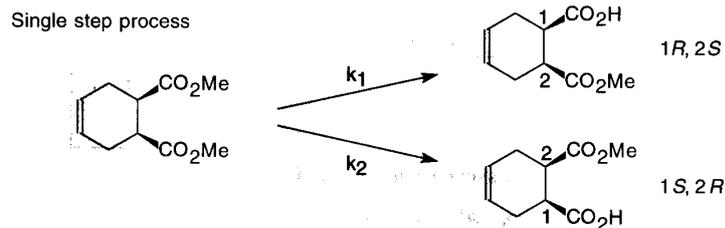
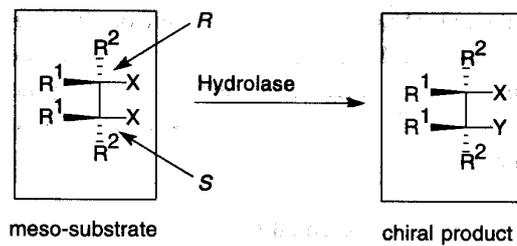


Il prodotto di mono-idrolisi, monoacetato, è meno polare per cui si ottiene anche il secondo processo che porta nuovamente ad un prodotto achirale.

La velocità però è inferiore (processo meno favorito) quindi si può recuperare il monoestere chirale ad elevati ee

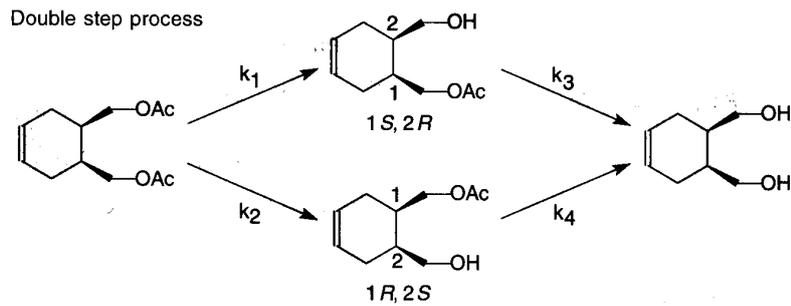
25

Sintesi enzimatica stereoselettiva (substrati achirali)
Composti meso (meso-trick)



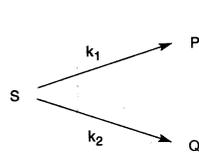
26

Sintesi enzimatica stereoselettiva (substrati achirali)
Composti meso (meso-trick)
Processo a doppio stadio, diacetato



27

Cinetiche processi a singolo stadio
(reazione in ambiente acquoso, processo irreversibile)



Selettività $\alpha = \frac{k_1}{k_2}$

$$\text{e.e.} = \frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} = \frac{P - Q}{P + Q}$$

S= substrati achirale con gruppi enantiotopici o composto meso

P,Q= prodotti enantiomerici

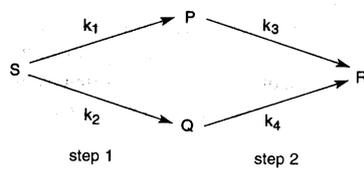
L' ee dipende dal rapporto k₁/k₂, che è costante nel corso di tutta la reazione



Quindi l'ee non varia al variare della conversione, è costante

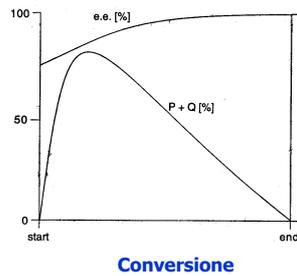
28

Cinetiche processi a doppio stadio
(reazione in ambiente acquoso, processo irreversibile)



$$e.e. = \frac{P - Q}{P + Q} \quad \alpha = \frac{k_1}{k_2}$$

$$E_1 = \frac{k_3}{k_1 + k_2} \quad E_2 = \frac{k_4}{k_1 + k_2}$$

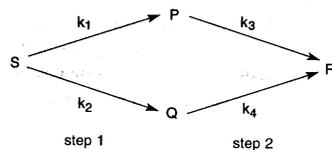


Il secondo processo è una risoluzione cinetica. Solitamente la selettività dell'enzima è la stessa, per cui se $k_1 > k_2$, k_4 sarà maggiore di k_3 .

Con la conversione si otterrà un aumento nell'ee del prodotto, mentre la resa in prodotto diminuisce

29

Cinetiche processi a doppio stadio
(reazione in ambiente acquoso, processo irreversibile)



Resa chimica dipende da:

$$[(k_1 + k_2) / (k_3 + k_4)]$$

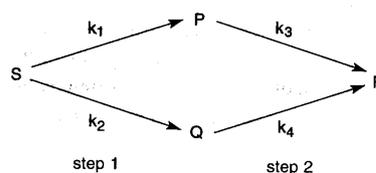
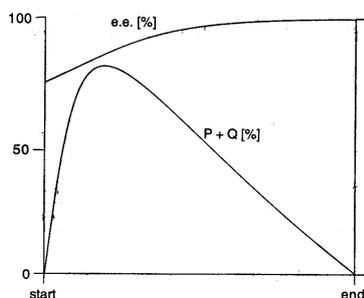
Selettività dipende da: $[(k_1 > k_2, k_3 > k_4 \text{ or } k_1 > k_2, k_3 < k_4)]$

Per avere alte rese in prodotto [Q+P] $[(k_1 + k_2) \gg (k_3 + k_4)]$.

Per avere alte stereoselezioni in prodotto [P] $(k_1 > k_2, k_3 < k_4)$

30

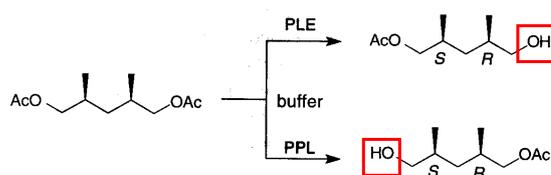
Cinetiche processi a doppio stadio (reazione in ambiente acquoso, processo irreversibile)



($k_1 = 100$, $k_2 = 10$, $k_3 = 1$, $k_4 = 10$).

31

Enzimi come Biocatalizzatori



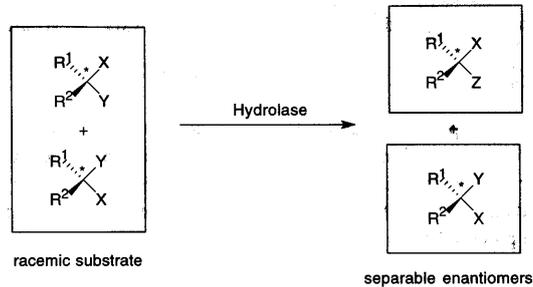
PLE pig liver esterase, PPL porcine pancreatic lipase

Enzyme	Stereochemical Preference	Kinetic Constants		
		α	E_1	E_2
PLE	pro-R	2.47	0.22	0.60
PPL	pro-S	15.6	0.04	0.18

**Cambiando enzima si ottiene opposta stereoselezione
($ee_{PLE} = 42\%$, $ee_{PPL} = 89\%$)
La risoluzione cinetica aumenta l'ee**

32

Risoluzione cinetica



Primo esempio riportato risale al 1903

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

33

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)

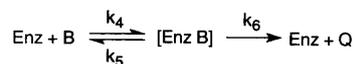
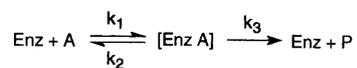
Selettività di una risoluzione = E = Enantiomeric Ratio

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

Eutomero: enantiomero con la massima reattività
Distomero: enantiomero con bassa reattività o indesiderata

34

Risoluzione cinetica enzimatica



Costanti cinetiche sono difficili da misurare

Si preferisce utilizzare gli ee e la conversione

Enz = enzyme

A, B = enantiomeric substrates

P, Q = enantiomeric products

k_1 through k_6 = rate constants

35

$$\text{Enantiomeric Ratio } E = \frac{v_A}{v_B} = \frac{\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)_A}{\left(\frac{k_{cat}}{K_m}\right)_B}$$

for the product:

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

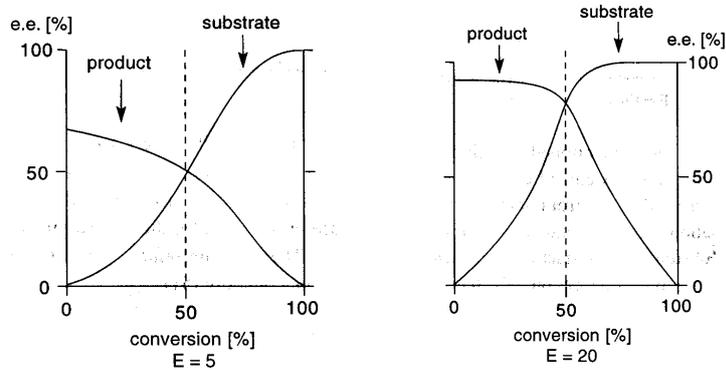
for the substrate:

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

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

36

Dipendenza del valore di ee contro la conversione



37

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

38

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 del ca 94%

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

Uso di racemasi

39

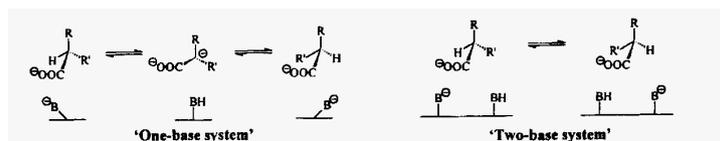
Racemasi

In generale riescono a racemizzare:

- sistemi che contengono stereocentri con un protone
- sistemi nei quali il protone è vicino ad un gruppo elettron attrattore



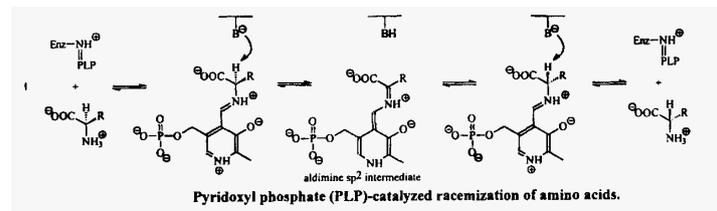
Classificazione in base ai siti basici nel sito attivo



40

Enzimi one-base (alanina racemasi)

Richiedono il piridossil fosfato (PLP) come cofattore



41

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 ²¹ , homocysteine ²² , methionine ²³ and selenium analogues ²⁴ .
14	<i>Flavobacterium</i>	lysine and arginine ²⁵
15	Serine	serine
16	Miscellaneous	miscellaneous

42

Relative Activity of Threonine Racemase for Various Substrates™.

Substrate	Relative Activity (%)	Substrate	Relative Activity (%)
L-Lysine	100	L-Asparagine	12
L-Ornithine	80	L-Alanine	6
L-Ethionine	83	L-Serine	10
L-Arginine	79	L-Histidine	6
L-Glutamine	54	L-Isoleucine	0
L-Methionine	66	L-Cysteine	0
S-Me-L-Cysteine	3	L-Threonine	3
ε-N-Ac-L-Lysine	75	L-Valine	0
L-Homocitrulline	45	L-Proline	0
L-Citrulline	45	L-Glutamic acid	0
L-Homoarginine	24	L-Aspartic acid	0
L-Norleucine	45	L-Tyrosine	0
L-Leucine	10	L-Tryptophane	0
L-Homoserine	22	L-Phenylalanine	0

43

Inversione in-situ

Utilizzabile con molecole che contengono un singolo stereocentro.

A seguito di una risoluzione cinetica il reagente e il prodotto vengono ottenuti nelle due forme enantiomeriche. Il reagente o il prodotto, opportunamente modificato, viene trasformato mediante un processo stereospecifico, portando ad un derivato del prodotto o del reagente con la stessa configurazione assoluta.

Esempio: idrolisi di esteri

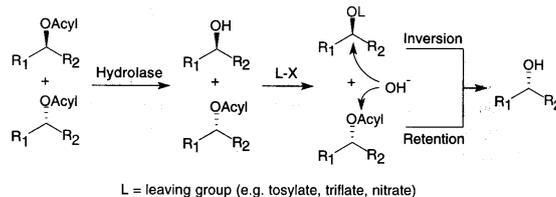
In una reazione di idrolisi, l'alcol che si ottiene viene trasformato in tosilato o triflato che viene poi idrolizzato con inversione di configurazione. Nelle stesse condizioni l'estere a opposta configurazione viene idrolizzato con ritenzione di configurazione.

44

Inversione in-situ

Poiché ee_s e ee_p dipendono dalla conversione, la conversione deve essere calcolata in funzione del valore di E (usualmente intorno al 50%)

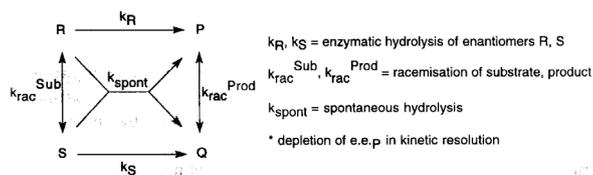
Scheme 2.9. Kinetic resolution with in-situ inversion



45

Risoluzione Cinetica Dinamica

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

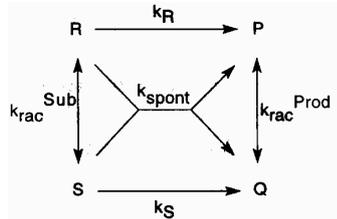


Diverse reazioni avvengono contemporaneamente:

- ✓ 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

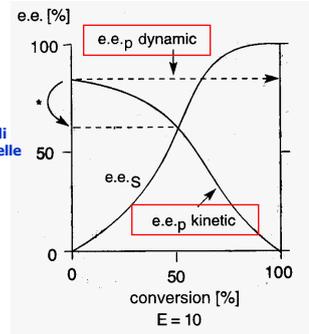
46

Risoluzione Cinetica Dinamica



k_R, k_S = enzymatic hydrolysis of enantiomers R, S
 $k_{rac}^{Sub}, k_{rac}^{Prod}$ = racemisation of substrate, product
 k_{spont} = spontaneous hydrolysis

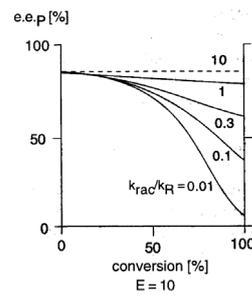
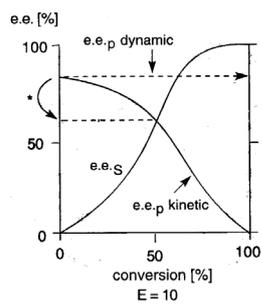
diminuzione di ee_p a causa delle risoluzioni cinetica



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

47

Risoluzione Cinetica Dinamica



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

48

Table 1. Commonly Used Enzyme Abbreviations

a-CT	α -Chymotrypsin	lipase PS	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (=cepacia) lipase
ACE	Acetyl cholinesterase	LPL	lipoprotein lipase fr. <i>Pseudomonas</i> sp.
Amano P-30	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (=cepacia) lipase	LPL-800	<i>Pseudomonas cepacia</i> lipase (purified)
Amano PS	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (=cepacia) lipase	LMJ	<i>Mucor javanicus</i> lipase
ANL	<i>Aspergillus niger</i> lipase	MEH	microsomal epoxide hydrolase
AFL	Amano lipase AP	<i>Mucor</i> sp.	<i>Mucor miehei</i> lipase
AY	<i>Candida cylindracea</i> (=rugosa) lipase	PAN	Pancreatin, pancreatic lipases (also contains esterases, proteases or their zymogens, and amylases)
CAL-B	<i>Candida antarctica</i> lipase B	PCL	<i>Pseudomonas cepacia</i> (=fluorescens) lipase
CCL	<i>Candida cylindracea</i> (=rugosa) lipase	PFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (=cepacia) lipase
CE	Cholesterol esterase	PGL	recombinant cutinase fr. <i>Fusarium solani pisi</i>
CEH	cytosolic epoxide hydrolase	PLE	Pig liver esterase
CRL	<i>Candida rugosa</i> (=cylindracea) lipase	PPL	Porcine pancreatic lipase
CVL	<i>Chromobacterium viscosum</i> lipase	Protease P6	protease fr. <i>Aspergillus melleus</i>
EEL	Electric eel cholinesterase	PS	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (=cepacia) lipase
GCL	<i>Geotrichum candidum</i> lipase	PSL	<i>Pseudomonas cepacia</i> (=fluorescens) lipase
HLADH	Horse liver alcohol dehydrogenase	RDL	<i>Rhizopus delemar</i> lipase
lipase AH	<i>Pseudomonas</i> sp. lipase	SAM II	<i>Pseudomonas</i> sp. lipase
lipase AK	<i>Pseudomonas</i> sp. lipase	Sp.382	<i>Candida</i> sp. lipase
lipase AY	<i>Candida cylindracea</i> (=rugosa) lipase	SP435	recombinant <i>Candida antarctica</i> B lipase
lipase MY	<i>Candida cylindracea</i> (=rugosa) lipase	Scaprose S	protease fr. <i>Aspergillus melleus</i>
lipase OF	<i>Candida cylindracea</i> (=rugosa) lipase	Sub.	Subtilisin (bacterial proteinase)
lipase B	<i>Candida antarctica</i> lipase B		
lipase P	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (=cepacia) lipase		