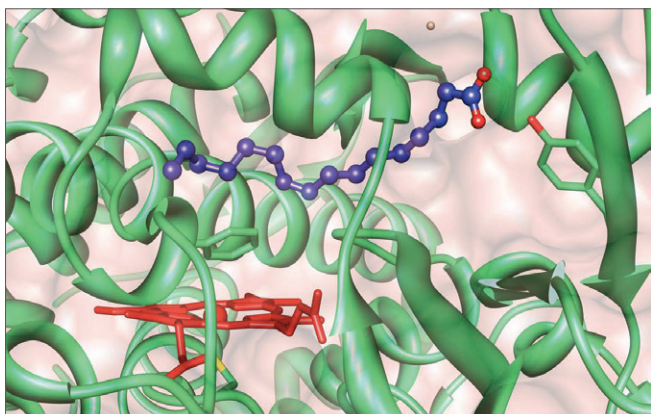


UTILIZZO DI MONOSSIGENASI PER LA BIOCATALISI INDUSTRIALE

Le monossigenasi hanno un elevato potenziale per la biocatalisi e alcuni processi industriali utilizzano già questi enzimi. Interessante è la prospettiva di combinarli con enzimi degradativi per la valorizzazione di biomasse e scarti o con processi chimici che operano in condizioni blande nell'ambito della chimica verde.

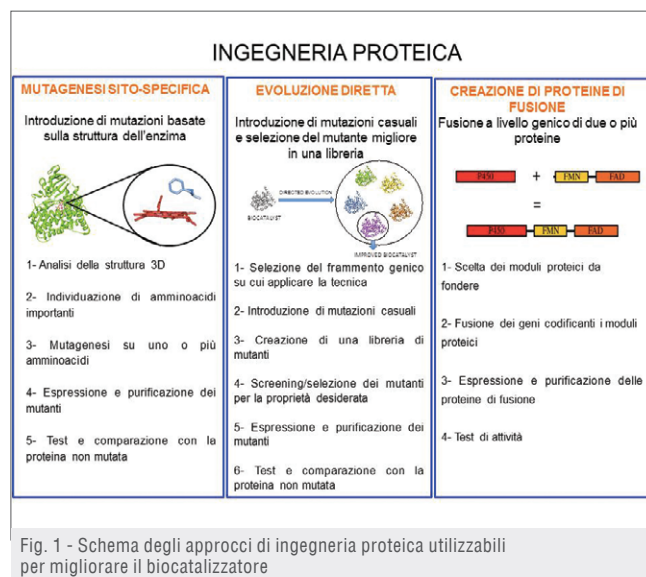


L'applicazione di enzimi in forma purificata o inseriti in sistemi cellulari per la produzione di molecole organiche è uno strumento già ampiamente utilizzato in diversi campi industriali come quello chimico, farmaceutico, alimentare, cosmetico e tessile. Numerosi sono infatti i processi dove la chemo-, regio- e stereoselettività delle reazioni catalizzate dagli enzimi vengono sfruttate per la produzione di un'ampia gamma di molecole [1].

L'utilizzo di biocatalizzatori, e la loro sempre maggiore diffusione, è principalmente dovuto a importanti progressi tecnologici, come l'introduzione di metodi di manipolazione del DNA, quali l'ingegneria metabolica e proteica. Questi approcci hanno permesso di sviluppare varianti cellulari ed enzimatiche mirate all'ottimizzazione di uno specifico processo catalitico e delle rese di reazione per il prodotto di interesse. L'ingegneria proteica, affiancata alla possibilità di immobilizzare gli enzimi su opportuni supporti, ha inoltre permesso di superare il limite della stabilità degli enzimi in diverse condizioni, laddove parametri, quali la temperatura e la presenza di solventi e/o reattivi e prodotti, possono provocare la denaturazione del biocatalizzatore. Le tecniche di ingegneria proteica utilizzate

per migliorare i biocatalizzatori sono schematizzate in Fig. 1. Ad oggi, l'applicazione della biocatalisi su scala industriale è possibile attraverso l'ottimizzazione del biocatalizzatore in funzione sia del substrato e della reazione che dovrà catalizzare, sia delle condizioni di reazione richieste dalla tecnologia industriale. La biocatalisi può inoltre essere una valida alternativa "green" dal momento che le condizioni di reazione sono solitamente più blande rispetto alla sintesi chimica.

Tra le diverse reazioni di interesse industriale, l'ossi-funionalizzazione selettiva dei composti organici per via enzimatica è interessante rispetto alla sintesi chimica che può comportare problemi legati all'utilizzo di forti agenti ossidanti, alle difficoltà nell'ottenimento di chemo-, regio- e enantioselettività. Tali reazioni sono catalizzate in natura dalle ossigenasi, enzimi della classe delle ossidoreduttasi (classe 1) coinvolti in diversi



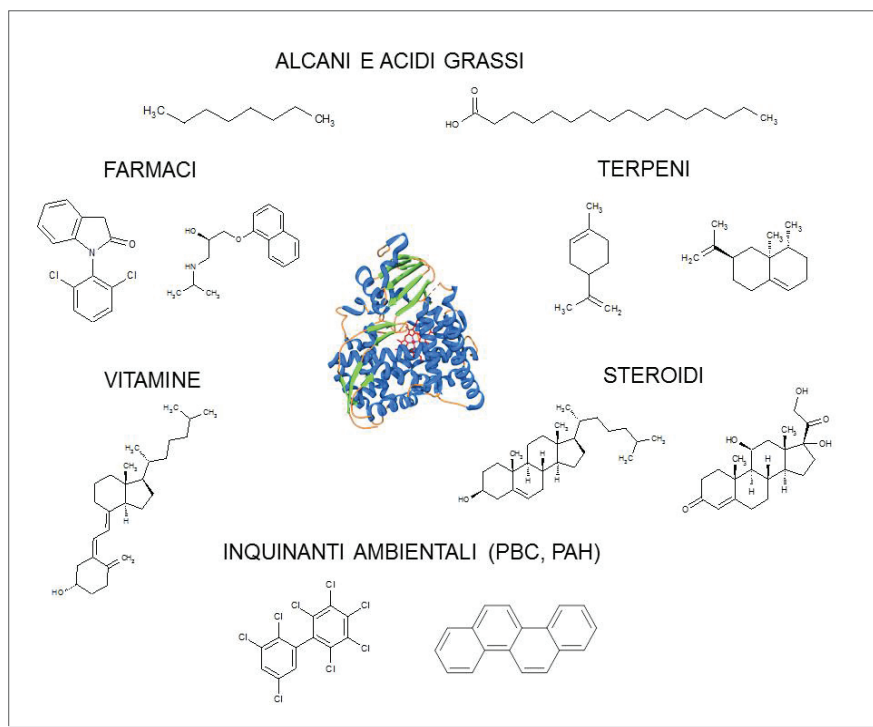


Fig. 2 - Diversità dei substrati riconosciuti dai citocromi P450

processi metabolici. In questo articolo, saranno prese in considerazione alcune monossigenasi e alcune applicazioni già messe a punto per produzioni industriali.

Le monoossigenasi

Le monoossigenasi sono enzimi che catalizzano l'inserimento di un singolo atomo di ossigeno molecolare in una molecola organica. A tale scopo, attivano l'ossigeno molecolare grazie al trasferimento di elettroni che genera un intermedio reattivo dell'ossigeno diverso a seconda del cofattore presente in queste proteine. Gli elettroni necessari per l'attivazione dell'ossigeno possono essere estratti direttamente dal substrato oppure possono derivare da cofattori esterni quali il NAD(P)H.

Le monossigenasi si dividono in diverse classi a seconda del cofattore che possiedono. In questo articolo, l'attenzione sarà focalizzata su monoossigenasi eme-dipendenti, i citocromi P450, e flavina-dipendenti, dal momento che questi enzimi hanno delle caratteristiche che li rende molto attraenti per diverse applicazioni industriali.

I citocromi P450

I citocromi P450 sono enzimi ubiquitari, presenti in batteri, funghi, piante e mammiferi, e contenenti eme. Questi enzimi sono coinvolti in diverse vie metaboliche come la sintesi di vitamine, di ormoni steroidei e la detossificazione di xenobiotici (Fig. 2).

Le caratteristiche che rendono interessanti questi enzimi da un punto di vista biocatalitico sono diverse. La prima è che i citocromi P450 catalizzano come reazione principale la monossigenazione di atomi di carbonio non reattivi, ma sono anche in grado di catalizzare l'eossidazione di doppi legami C=C, la deaminazione, la dealogenazione, l'idrossilazione di anelli aromatici, la N-, S- e O-dealchilazione [2]. Inoltre, i substrati

che questi enzimi sono in grado di riconoscere e convertire sono molteplici e includono acidi grassi, terpeni, steroidi, prostaglandine, composti aromatici, solventi, farmaci, pesticidi e altri xenobiotici (Fig. 2). Su tali substrati questi enzimi catalizzano reazioni altamente regio-, chemo- e stereospecifiche. Vedremo ora qualche esempio di applicazione di tali enzimi in campo industriale.

Sintesi di composti di interesse farmaceutico

I citocromi P450 sono anche coinvolti in reazioni di detossificazione di xenobiotici e, nel fegato umano, nel metabolismo di fase I dei farmaci. La fase I prevede l'introduzione di uno o più gruppi funzionali chimici nel farmaco con lo scopo, nella maggior parte dei casi, di inattivarlo. Pertanto, alcuni di essi sono enzimi già predisposti a riconoscere e convertire composti organici utilizzati nell'industria farmaceutica e altri possono essere ingegnerizzati per farlo.

Le applicazioni dei citocromi P450 nell'industria farmaceutica riguardano la sintesi di precursori, di farmaci e dei loro metaboliti [3]. Un esempio è la sintesi della pravastatina, un farmaco prodotto dalla Daiichi-Sankyo e prescritto a milioni di persone in più di 100 nazioni per ridurre il

colesterolo [4]. In questo processo, il precursore compactina derivata dal fungo *Penicillium citrinum* è convertita in pravastatina in un processo fermentativo che utilizza *Streptomyces carbophilus* che, grazie al citocromo P450sca-2 (CYP105A3), catalizza la 6 β -idrossilazione della compactina [5].

Un'altra applicazione industriale importante è la conversione della vitamina D3 in 1 α ,25-diidrossivitamina D3 (1 α ,25(OH)2D3), un farmaco utilizzato per l'ipotiroidismo e l'osteoporosi. Questa reazione è catalizzata dal citocromo P450_{VD25} (CYP105A2) dal batterio *Amycolata* sp. [6], ma anche da altri citocromi P450 da microrganismi diversi.

Altre interessanti applicazioni dei citocromi P450 riguardano gli steroidi, composti di alto interesse in campo farmaceutico. Un esempio è dato dalla produzione del cortisolo a partire dall'11-desossicortisolo grazie ad una 11 β -idrossilazione catalizzata dal citocromo P450Iun. A tale scopo, la Schering AG (Germania) utilizza il micelio *Curvularia lunata* [7, 8].

Poteniali applicazioni interessanti vengono dalla possibilità di utilizzare il citocromo P450 BM3 batterico per la produzione di metaboliti di farmaci [9-11]. Tali metaboliti, difficili da sintetizzare in quantità preparative, devono essere testati per studi di tossicità durante il processo di sviluppo di nuovi farmaci perché possono essere biologicamente attivi e avere effetti collaterali non desiderati. Dal momento che nel fegato umano i citocromi P450 sono i principali responsabili del metabolismo di fase I dei farmaci e della produzione di tali metaboliti, il loro utilizzo anche a fini biocatalitici sarebbe la soluzione ottimale. Tuttavia, questi enzimi richiedono delle proteine partner di ossidoriduzione, cioè non sono cataliticamente autosufficienti e sono difficili da manipolare in quanto legati alla membrana del reticolo endoplasmatico cellulare. Per tale motivo vengono utilizzati citocromi batterici omologhi a quelli umani, quali il citocromo P450 BM3, che è cataliticamente autosufficiente e solubile. In

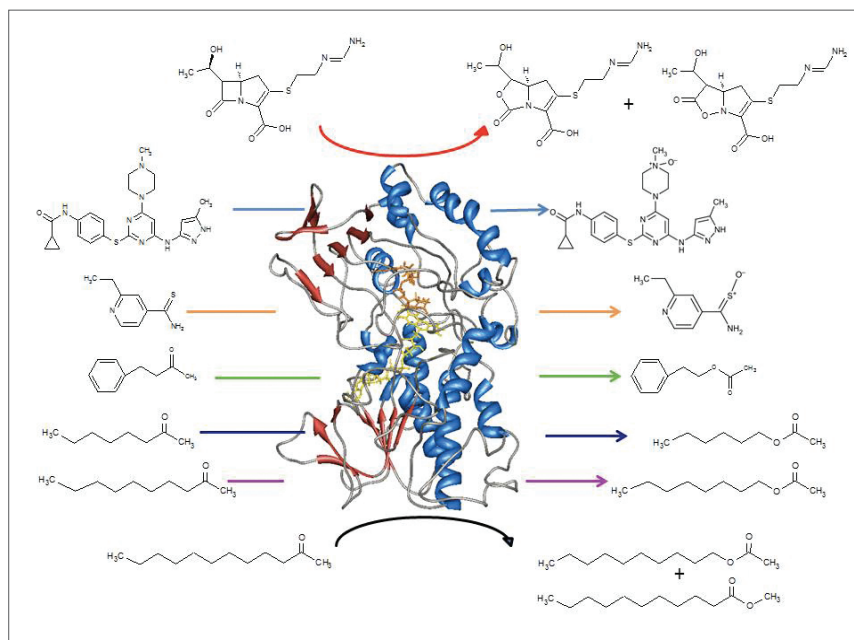


Fig. 3 - Reazioni note della monossigenasi Baeyer-Villiger da *Acinetobacter radioresistens*

particolare, grazie a differenti approcci di ingegneria proteica sono state create diverse varianti in grado di metabolizzare diversi farmaci e produrre gli stessi metaboliti generati dai citocromi P450 da fegato umano.

Altre applicazioni industriali

Numerose sono le possibili applicazioni dei citocromi per la sintesi di composti di interesse industriale. Il citocromo P450 BM3 sopra menzionato, insieme a numerosi altri, riconosce e idrossila acidi grassi a diversa lunghezza di catena (C8-C24) e gli acidi grassi idrossilati hanno una notevole importanza nell'industria alimentare, cosmetica e dei polimeri [12]. In particolare, i citocromi P450 che idrossilano gli acidi grassi vengono classificati come idrossilasi che idrossilano il carbonio α (α -idrossilasi) e idrossilasi terminali o subterminali (ω -idrossilasi) [13]. L'attenzione è stata rivolta soprattutto verso il citocromo P450 BM3 perché questo enzima possiede un numero di turnover molto alto ($>1.000 \text{ min}^{-1}$) e pertanto è un ottimo candidato come biocatalizzatore [14]. Altre interessanti applicazioni dei citocromi P450 provengono dalla loro capacità di idrossilare i terpeni producendo derivati importanti per l'industria di aromi e fragranze. Un processo che sfrutta cellule batteriche intere che esprimono un mutante del citocromo P450 BM3 è stato sviluppato per l'eossidazione regioselettiva dell' α -pinene. Il processo è stato anche ottimizzato introducendo a livello genico nel ceppo batterico un sistema di rigenerazione del NADPH e sviluppando un processo bifasico, con un contenuto di acqua e fase organica ottimale per solubilizzare il substrato e nello stesso tempo evitare la degradazione del biocatalizzatore [15, 16].

Potenziati applicazioni nell'uso di risorse rinnovabili e nella "green chemistry"

L'interesse nell'utilizzo dei citocromi P450 è ancora più grande se si considera la possibilità di utilizzare biomasse o composti di scarto per valorizzare le risorse. In questo caso, un pool enzimatico formato da biocatalizzatori degradativi accoppiati a enzimi che catalizzano la produzione del composto di interesse potrebbe essere una soluzione significativa. Tale combinazione enzimatica può essere creata in organismi "ospitanti" attraverso metodi di ingegneria metabolica. In realtà, la natura offre già organismi di questo genere. Un esempio è dato da alcuni funghi basidiomiceti, che possiedono un corredo enzimatico extracellulare per la degradazione di tutte le componenti del legno (compresa la lignina) accoppiato ad un corredo di citocromi P450 intracellulari che permettono di sfruttare le risorse provenienti dalla degradazione [17]. Inoltre, questi organismi, grazie alla presenza di numerosi citocromi P450 che producono metaboliti secondari e detossificano xenobiotici, quali composti petrolchimici aromatici e inquinanti ambientali (PAH), hanno

un'ampia versatilità di substrato che sta alla base della loro capacità adattativa in diversi ambienti.

Nell'ottica di produzione di risorse da fonti alternative, un esempio di accoppiamento enzimatico interessante viene da un lavoro dove i triacilgliceroli degli oli di oliva, di soia e da microalghe sono stati convertiti in biodiocarburanti utilizzabili come biocarburanti [18]. Un processo dove l'idrolisi catalizzata dalla lipasi è accoppiata alla decarbossilazione catalizzata da un citocromo P450 ha permesso di produrre alcani dalla risorsa a basso costo e rinnovabile dei triacilgliceroli dell'olio con rese che variano dal 6,7 al 46% [18].

Monossigenasi flavina-dipendenti

Un'altra classe di monossigenasi molto interessanti da un punto di vista della biocatalisi sono le monossigenasi flavina-dipendenti [19]. Questi

enzimi partecipano al metabolismo di numerosi composti, quali vitamine e ormoni, e sono implicati in fenomeni di antibiotico-resistenza nei batteri [20]. Pertanto, come nel caso dei citocromi P450 ci troviamo di fronte ad enzimi che catalizzano diverse reazioni tra cui idrossilazioni, ossidazioni di Baeyer-Villiger, sulfossidazioni, epossidazioni e reazioni di alogenazione su un'ampia gamma di substrati [21]. Questi enzimi sono estremamente regio- ed enantioselettivi e pertanto attraenti nella sintesi chimica [22] (Fig. 4).

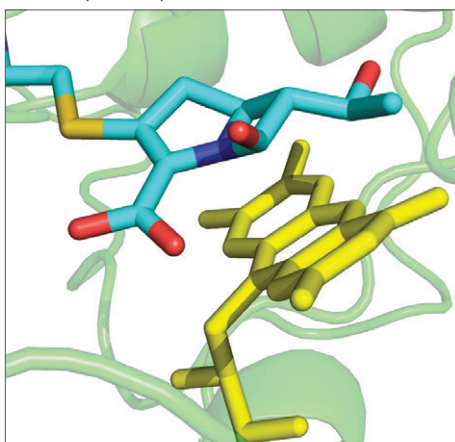


Fig. 4 - Modello del sito catalitico (FAD in giallo) della BVMO da *A. radioresistens* con legato il substrato imipenem

Sintesi di composti di interesse farmaceutico

Le monossigenasi flavina-dipendente e, in particolare le monossigenasi Bayer-Villiger (BVMO), sono in grado di riconoscere diversi steroidi come substrati e catalizzare diverse



reazioni. Per esempio una BVMO batterica, che fisiologicamente è coinvolta nel catabolismo del ciclopentadecanone, è versatile e riconosce una serie di 17-chetosteroidi ed è in grado di convertirli nei corrispondenti lattoni [23].

Una BVMO è stata utilizzata per uno dei due step di reazione per la sintesi del farmaco (-)-modafinil, utilizzato per il trattamento della narcolessia e altri disordini del sonno [24].

Inoltre, l'ingegneria proteica ha permesso di sviluppare una variante promettente di una BVMO in grado di catalizzare la sulfossidazione enantioselettiva dell'omeprazolo in esomeprazolo, un inibitore delle pompe protoniche nonché un farmaco da miliardi di dollari [25].

La flavina-monossigenasi di fegato umano (hFMO3) è coinvolta nella fase I del metabolismo dei farmaci. In questo caso, l'enzima è autosufficiente e pertanto può essere direttamente utilizzato per produrre i metaboliti dei farmaci per studi di tossicità [26].

Altre potenziali applicazioni industriali

Nei nostri laboratori è stata isolata una nuova BVMO dal ceppo batterico *Acinetobacter radioresistens* in grado di catalizzare diverse reazioni schematizzate in Fig. 3.

Se le reazioni catalizzate dalle monossigenasi flavina-dipendenti sono estremamente interessanti nel campo della sintesi industriale, ancora più interessante è la possibilità di combinare più strategie sostenibili nell'ottica della chimica verde. Un esempio viene dalla sintesi del bicyclo[4.2.0]ottano, la cui struttura è molto difficile da sintetizzare mediante i metodi chimici convenzionali. Questa molecola è stata ottenuta combinando metodi fotochimici con un successivo step biocatalitico tramite l'utilizzo di una BVMO [27-29]. Un altro esempio è la combinazione di metodi sonochimici e step enzimatici per la preparazione del (+)-(1S,6S)-lattone, che è stato ottenuto con elevata purezza ed è stato poi utilizzato per la sintesi di diversi composti naturali contenenti un anello tetraidrofuranico [30].

Ingegneria proteica come strumento per l'ottimizzazione del biocatalizzatore

I limiti applicativi dei citocromi P450 e delle monossigenasi flavina-dipendenti per la biocatalisi industriale sono da tempo oggetto di studio. Infatti, è possibile superare questi limiti grazie a diverse strategie, quali l'ingegneria proteica e l'immobilizzazione.

L'introduzione razionale e casuale di mutazioni amminoacidiche ha permesso di variare non solo la specificità di substrato, ma anche la stereoselettività della reazione e la stabilità dell'enzima in diverse condizioni, tra cui la presenza di solvente.

Ancora più interessante è il fatto che sono state messe a punto strategie per rendere alcuni citocromi P450 autosufficienti da un punto di vista catalitico attraverso la creazione di proteine di fusione, dove la proteina accessoria che prende gli elettroni dal NADPH per donarli al citocromo viene fusa a livello genico con il citocromo stesso [31].

La necessità di NADPH per la bioconversione è un limite importante a causa dell'alto costo di questo cofattore, ma sono state studiate strategie alternative che utilizzano surrogati meno costosi oppure metodi di rigenerazione basati su reazioni enzimatiche accoppiate a basso costo, quale quella catalizzata dalla glucosio deidrogenasi in presenza di glucosio [32]. Un'altra strategia, che è stata applicata con successo sui citocromi P450, è basata sul cosiddetto "shunt del perossido", dove gli elettroni per la catalisi vengono donati direttamente dal perossido di idrogeno [33].

In conclusione, le straordinarie capacità delle monossigenasi di sintetizzare composti di interesse industriale rendono questi enzimi molto attraenti. Tuttavia, lo sviluppo di un processo industriale può richiedere la combinazione di tecniche di biologia molecolare, sintesi organica e ingegneria per quello che riguarda la parte tecnologica del processo. Inoltre, nell'era in cui il recupero, il riciclo e la valorizzazione di risorse alternative sono importanti, i corredi enzimatici che la natura mette già a disposizione in diversi organismi può essere sfruttato e i bassi costi dei materiali di recupero potrebbero bilanciare i costi per cui la biocatalisi spesso non è competitiva.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J.M. Choi *et al.*, *Biotechnol. Adv.*, 2015, **33**, 1443.
- [2] V.B. Urlacher, M. Girhard, *Trends Biotechnol.*, 2012, **30**, 26.
- [3] T. Sakaki, *Biol. Pharm. Bull.*, 2012, **35**, 844.
- [4] Y. Tsujita *et al.*, *Annu. Per. Sankyo Res. Lab.*, 1997, **49**, 1.
- [5] I. Watanabe *et al.*, *Gene*, 1995, **163**, 81.
- [6] J. Sasaki, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1992, **38**, 152.
- [7] K. Sonomoto *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1983, **45**, 436.
- [8] K. Suzuki *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, **1203**, 215.
- [9] G. Di Nardo *et al.*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2007, **12**, 313.
- [10] G.E. Tsotsou *et al.*, *Chemistry*, 2012, **18**, 3582.
- [11] G. Di Nardo *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, **13**, 15901.
- [12] K.R. Kim, D.K. Oh, *Biotechnol. Adv.*, 2013, **31**, 1473.
- [13] A.J. Warman *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.*, 2005, **33**, 747.
- [14] I.N.A. Van Bogaert *et al.*, *FEBS J.*, 2011, **278**, 206.
- [15] H. Schewe *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **78**, 55.
- [16] H. Schewe *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, **83**, 849.
- [17] H. Ichinose, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2013, **60**, 71.
- [18] J. Yan *et al.*, *Biotechnol. Biofuels.*, 2015, **26**(8), 34.
- [19] R.D. Ceccoli *et al.*, *Front. Microbiol.*, 2014, **5**, 1.
- [20] D. Minerdi *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemoth.*, 2015, **60**, 64.
- [21] W.J.H. van Berkel *et al.*, *J. Biotechnol.*, 2006, **124**, 670.
- [22] G. de Gonzalo *et al.*, *ChemBioChem*, 2010, **11**, 2208.
- [23] E. Beneventi *et al.*, *J. Mol. Catal. B*, 2009, **58**, 164.
- [24] S. Riva *et al.*, Dipharma SpA, US 20070087422, 2007.
- [25] G. Huisman, Communication to 13th Dutch Congress in Biotechnology, Amsterdam, The Netherlands, 2010.
- [26] G. Catucci *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, **14**, 2707.
- [27] I. Braun *et al.*, *Synthesis*, 2007, **24**, 3896.
- [28] I. Braun *et al.*, *Angew. Chem.*, 2006, **118**, 5667.
- [29] I. Braun *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2006, **45**, 5541.
- [30] M.D. Mihovilovic *et al.*, *Chem. Commun.*, 2006, **30**, 3214.
- [31] G. Gilardi *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, 2002, **17**, 133.
- [32] E. O'Reilly *et al.*, *Chem. Commun. (Camb.)*, 2011, **47**, 2490.
- [33] P.C. Cirino, F.H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2003, **42**, 3299.

Use of Monooxygenases in Industrial Biocatalysis

Monooxygenases have a high potential for biocatalysis and some industrial processes are already using these enzymes. The possibility to combine them with degradative enzymes for the valorization of biomass and waste products or with mild chemical processes in the field of green chemistry is also an interesting perspective.