



LUCIA TAMBORINI^A, MARTINA CONTENTE^B, DIEGO ROMANO^C

^ADIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE (DISFARM), UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

^BSCHOOL OF CHEMISTRY, UNIVERSITY OF NOTTINGHAM

^CDIPARTIMENTO DI SCIENZE PER GLI ALIMENTI LA NUTRIZIONE, L'AMBIENTE (DEFENS), UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

LUCIA.TAMBORINI@UNIMI.IT; DIEGO.ROMANO@UNIMI.IT

OSSIDORIDUZIONI BIOCATALIZZATE IN REATTORI A FLUSSO

L'integrazione della biocatalisi con la flow chemistry può portare a procedure più produttive, controllate ed ecosostenibili. In questo contesto, abbiamo concentrato l'attenzione su reazioni redox biocatalizzate che possono essere interessanti poiché spesso avvengono con regio- e stereo-selettività e in condizioni blande. Nei nostri studi sono state utilizzate sia cellule intere che enzimi isolati e sono state sfruttate procedure di purificazione in linea per isolare i prodotti con elevato grado di purezza.

La sintesi in continuo di principi attivi farmaceutici e di sostanze chimiche a valore aggiunto è cresciuta enormemente negli ultimi dieci anni [1-3]. Questo cambiamento, tuttavia, è stato prevalentemente incentrato sulla chimica organica sintetica, e solo recentemente l'uso di biocatalizzatori in sistemi a flusso continuo sta diventando popolare. Le reazioni enzimatiche effettuate in reattori per flow chemistry possono beneficiare di una migliore miscelazione e trasferimento di massa e di un eccellente controllo dei parametri di reazione, quali temperatura, tempo di residenza e pressione. Inoltre, nel caso di utilizzo di biocatalizzatori immobilizzati impaccati in reattori a colonna, è possibile garantire un'alimentazione continua del substrato e una rimozione del prodotto, oltre ad un'elevata concentrazione locale di biocatalizzatore, aumentando considerevolmente la produttività [4].

In questo contesto, unendo le nostre competenze di flow chemistry e di biocatalisi, da alcuni anni dedichiamo parte delle nostre ricerche allo studio di reazioni biocatalizzate in continuo, concentrandoci sulla sintesi di intermedi e prodotti di interesse farmaceutico e nutraceutico. Gli enzimi utilizzati in questi processi sono da noi isolati da microrganismi (batteri, lieviti, eu-

miceti filamentosi) selezionati in base all'attività di interesse, prodotti in forma ricombinante in *E. coli*, ed opportunamente immobilizzati.

Da un punto di vista metodologico e tecnologico, l'attività di ricerca è rivolta alla messa a punto di protocolli ecosostenibili e scalabili accoppiati a purificazioni in linea grazie all'impiego di reattivi supportati (scavenger immobilizzati), utili a rimuovere sottoprodotti, o a strategie di *catch and release*, che consentono il facile recupero del prodotto desiderato in elevata purezza, semplificando e accelerando significativamente le procedure di purificazione (Fig. 1).

In questo breve report, ci soffermeremo sui nostri recenti studi in flow di reazioni redox biocatalizzate. Il nostro interesse in questo campo si basa sul-

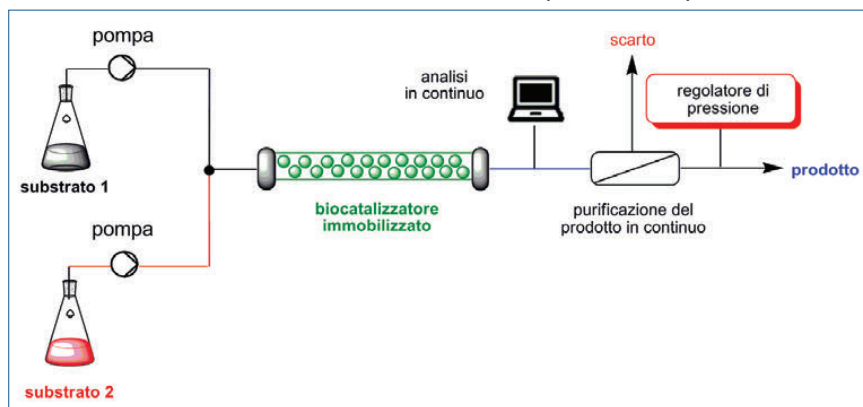
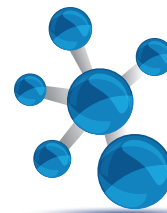


Fig. 1 - Rappresentazione schematica di una possibile configurazione di reattori in continuo



la considerazione che spesso reazioni enzimatiche di ossidoriduzione avvengono con elevata regio- e stereo-selettività, in condizioni blande e potrebbero rappresentare un'alternativa sostenibile ai classici metodi chimici. Tuttavia, un punto cruciale da considerare, quando si impiegano ossidoreduttasi in reattori a flusso, è che questi enzimi necessitano di cofattori organici spesso costosi e non spontaneamente rigenerati nel ciclo catalitico [5].

Nei nostri studi, abbiamo affrontato questa problematica sia attraverso la co-immobilizzazione di enzimi sia attraverso l'uso di cellule intere. L'utilizzo di enzimi isolati immobilizzati (Immobilized Enzyme Reactors, IMERs) presenta indubbi vantaggi rispetto all'approccio con cellule intere, essendo assenti parete e membrana cellulare, che rappresentano una barriera aggiuntiva tra substrato e catalizzatore, e non essendo presenti attività enzimatiche collaterali. D'altra parte, l'utilizzo di cellule intere è favorevole in reazioni redox in quanto la rigenerazione dei cofattori può essere garantita *in situ* dal metabolismo nativo cellulare. A seconda del microorganismo, le cellule intere possono essere impaccate nel reattore come tali, o, nel caso ne risultasse un'eccessiva contropressione, possono essere immobilizzate (Immobilized Whole Cells Reactors, IWCRs).

Un primo studio in questo ambito ha riguardato l'ossidazione regio- e stereo-selettiva di una serie di 1,3-dioli prochirali per l'ottenimento dei corrispondenti idrossiacidi utilizzando cellule di *Acetobacter acetii* intrappolate in sfere di alginato di calcio. Questa forma di immobilizzazione è risultata economica, di facile preparazione e, in studi precedenti da noi svolti, ha garantito un'elevata stabilità operativa in processi in continuo [6]. Da un punto di vista tecnologico, è stato necessario applicare un regime segmentato gas/liquido per fornire l'ossigeno necessario per la reazione (Fig. 2).

Per tutti i substrati, la conversione è risultata quasi quantitativa in soli 10 minuti. Da notare che, in batch, uno stesso livello di conversione si ottiene dopo circa tre ore. Nel complesso, la produttività del processo

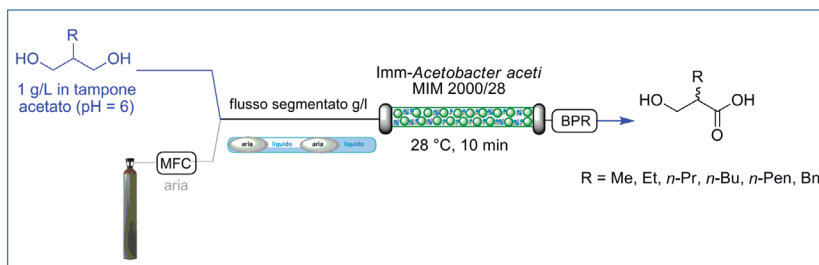


Fig. 2 - Ossidazione regio-e stereo-selettiva di 1,3-dioli. MFC: mass flow controller; BPR: back pressure regulator

in continuo è risultata di 10 volte maggiore rispetto a quella in batch. Per l'isolamento dei prodotti, è stata sfruttata una strategia di *catch and release* in linea, utilizzando una resina basica (Ambersep 900 OH) per bloccare l'acido carbossilico e un successivo flow stream acido per il rilascio. Come accennato sopra, l'utilizzo delle cellule intere per la reazione di ossidazione offre l'importante vantaggio di non richiedere un sistema per il ripristino del cofattore.

Uno degli acidi ottenuti, l'acido (*R*)-3-idrossi-2-metilpropanoico, è stato usato, dopo liofilizzazione, per la sintesi chimica in continuo del Captopril, un farmaco antiipertensivo [7]. Il processo in continuo in tre passaggi presenta diversi vantaggi rispetto alla sintesi tradizionale in batch: in primo luogo, il tempo complessivo è stato drasticamente ridotto e la resa complessiva è stata aumentata dal 45% al 65%. Inoltre, è stato possibile effettuare procedure di neutralizzazione e purificazione in linea, evitando in questo modo la purificazione degli intermedi e consentendo di ridurre i tempi. Va sottolineato come sia stata necessaria soltanto una purificazione mediante cromatografia al termine della sintesi. Come accennato, l'utilizzo di enzimi isolati in reazioni redox in flow richiede la messa a punto di un opportuno sistema per il ricircolo del cofattore. In questo ambito, abbiamo sviluppato un bioreattore costituito da un letto misto contenente due enzimi immobilizzati

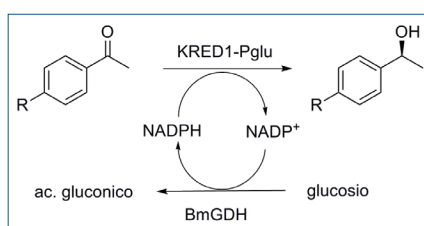


Fig. 3 - Schema di ricircolo del cofattore

su agarosio opportunamente attivato: una chetoreduttasi da *Pichia glucozyma* (KRED1-Pglu) e una glucosio deidrogenasi da *Bacillus megaterium* (*BmGDH*), necessaria per il ripristino del cofattore (Fig. 3) [8]. Tale bioreattore è stato utilizzato per la riduzione regio- e stereo-se-

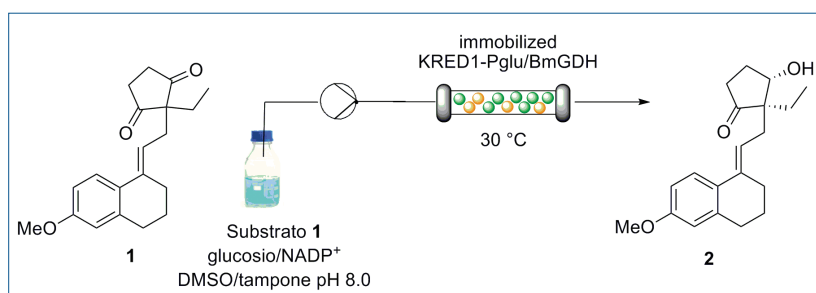


Fig. 4 - Bioreattore per la riduzione stereoselettiva di di-chetoni

lettiva di una serie di chetoni e di-chetoni, tra i quali il composto **1**, intermedio per l'ottenimento di una serie di contraccettivi (Fig. 4). I parametri di reazione (stechiometria, concentrazione, temperatura, pressione e tempo di residenza) sono stati ottimizzati ed è stata osservata una conversione completa con tempi di residenza compresi fra 7 minuti e 3 ore ottenendo il mono-alcool con un elevato eccesso enantiomerico su scala analitica. Il bioreattore si è dimostrato molto stabile ed è stato utilizzato nelle condizioni di lavoro ottimizzate per settimane, anche in presenza di concentrazioni di DMSO nel tampone fino al 20%, senza modifiche significative nella composizione del flusso di uscita.

In questo ambito, ci siamo anche occupati, in collaborazione con il gruppo della prof.ssa Francesca Paradisi (School of Chemistry, University of Nottingham), di studiare l'ossidazione di ammine aromatiche nei corrispondenti derivati carbonilici interessanti come aromi e fragranze, utilizzando per la prima volta una transaminasi S-selettiva derivante dal batterio alo-adattato *Halomonas elongata* (HEWT) opportunamente immobilizzata [9, 10]. Tale bioreattore è stato sfruttato anche nella reazione opposta per l'ottenimento di ammine a partire dalle corrispondenti aldeidi [11]. In entrambi i casi, i prodotti sono stati ottenuti con rese eccellenti (90-99%), con tempi di reazione molto brevi (1-15 minuti) e produttività superiori rispetto a quelle ottenute in batch [12].

Concludendo, le biotrasformazioni condotte in fase eterogenea in sistemi in continuo possono beneficiare di un'elevata concentrazione locale di biocatalizzatore e di un migliore trasferimento di massa e di calore rispetto alle reazioni in batch, consentendo di ridurre notevolmente i tempi di reazione e di incrementare significativamente la produttività. Dalla nostra esperienza è emerso che la stabilità del biocatalizzatore immobilizzato è in genere maggiore quando utiliz-

zato in un reattore a colonna in quanto non è sottoposto a stress meccanici e il controllo della temperatura e della pressione è estremamente accurato. Inoltre, l'utilizzo di reattori per sintesi in continuo offre la possibilità di effettuare work-up e purificazioni in linea e di effettuare reazioni enzimatiche a cascata utilizzando diversi biocatalizzatori compartimentalizzati in reattori a colonna.

BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Baumann, I.R. Baxendale, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2015, **11**, 1194.
- [2] J. Britton, T.F. Jamison, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2017, **129**, 8949.
- [3] M.B. Plutschack *et al.*, *Chem. Rev.*, 2017, **117**, 11796.
- [4] L. Tamborini *et al.*, *Trends Biotechnol.*, 2018, **36**, 73.
- [5] R. Yuryev *et al.*, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2011, **7**, 1449.
- [6] P. Zambelli *et al.*, *Food Chemistry*, 2016, **190**, 607.
- [7] V. De Vitis *et al.*, *ChemistryOpen*, 2017, **6**, 668.
- [8] F. Dall'Oglio *et al.* *Catal. Commun.*, 2017, **93**, 29.
- [9] M. Planchestainer *et al.*, *Green Chem.*, 2017, **19**, 372.
- [10] C. Mateo *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **76**, 269.
- [11] M.L. Contente *et al.*, *ChemCatChem*, 2017, **9**, 3843.
- [12] M.L. Contente, L. Tamborini, *La Chimica e l'Industria*, 2018, **100**(3), 22.

Continuous Flow Reactors for Redox Biocatalysis

The integration of biocatalysis and flow reactor technology can lead to more productive, controlled and sustainable procedures. In this context, we focused the attention on biocatalysed redox reactions that are attractive since they often occur with regio- and stereo-selectivity under mild conditions. In our studies, both whole microbial cells and isolated enzymes have been used and in-line purification procedures have been exploited to isolate highly pure products.