

Enzimas en medios no convencionales

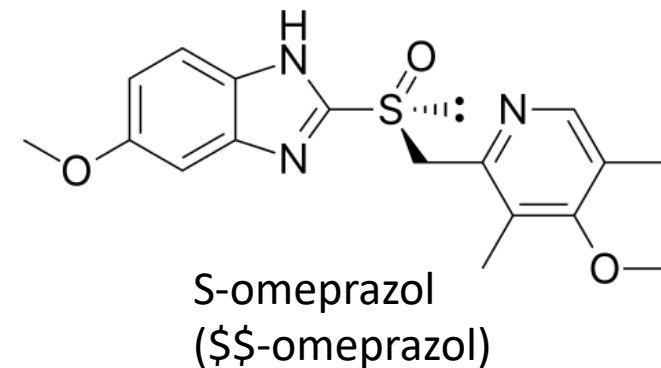
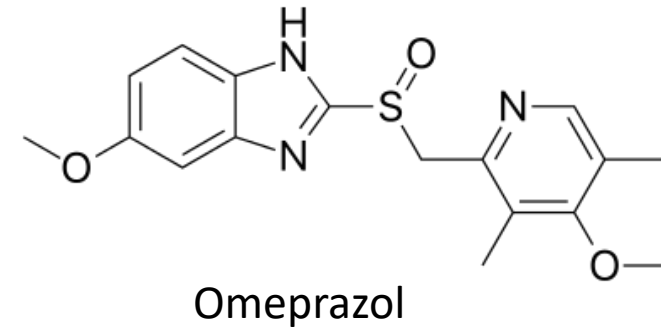


Enzimología, reacciones enzimáticas

- Necesitamos enzimas
- Las enzimas se sintetizan en ... medio acuoso
- Reaccionan en ... medio acuoso
- Pueden trabajar en otro medio?
- Sirve para algo?
- Who cares?

Who cares?

- Síntesis de compuestos. Estereoselectividad
 - Difícil de lograr en reacciones orgánicas
 - Producción de precursores quirales
 - Resolución de mezclas
- Condiciones “suaves” de reacción
- Catálisis!!
- “Green chemistry”



Por qué meter una enzima en medio orgánico?

- Solubilidad de reactivos hidrofóbicos
- Revertir hidrólisis para dar condensación
- Separación de la enzima del medio (no se disuelve!!)
- Las enzimas son ... más estables en solventes anhidros que en H₂O (!!!)
 - Lisozima, 100 °C, 50% actividad:
 - 30 s (pH 8)
 - 100' (pH 4)
 - 140h (ciclohexano)
- Especificidad/selectividad “tuneables” en distintos solventes

Qué reacciones pueden ser útiles

(i) *Hydrolysis*



(ii) *Synthesis*. Reactions under this category can be further separated into the following categories.

(a) *Esterification*



(b) *Interesterification*



(c) *Alcoholysis*

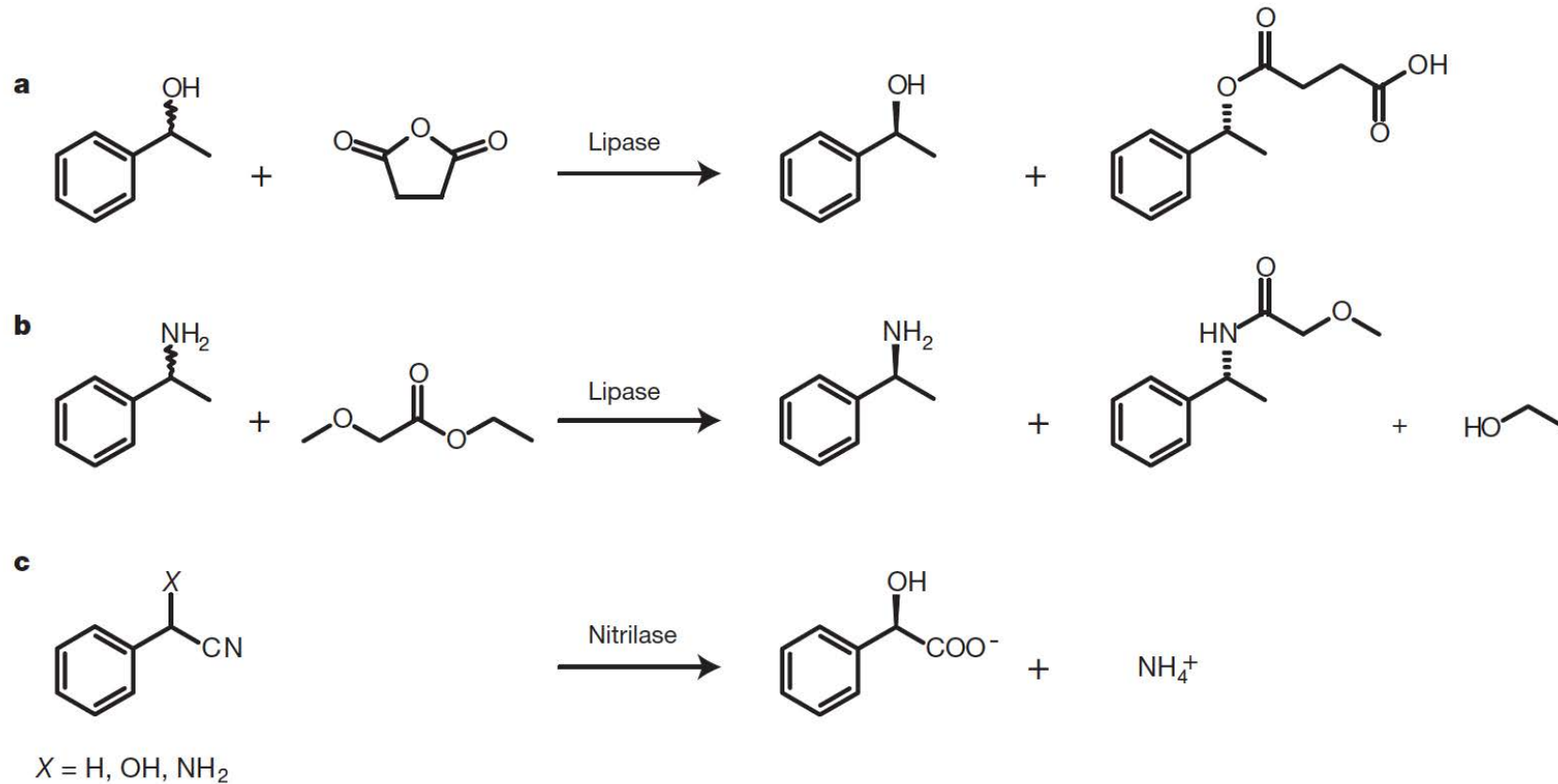


(d) *Acidolysis*

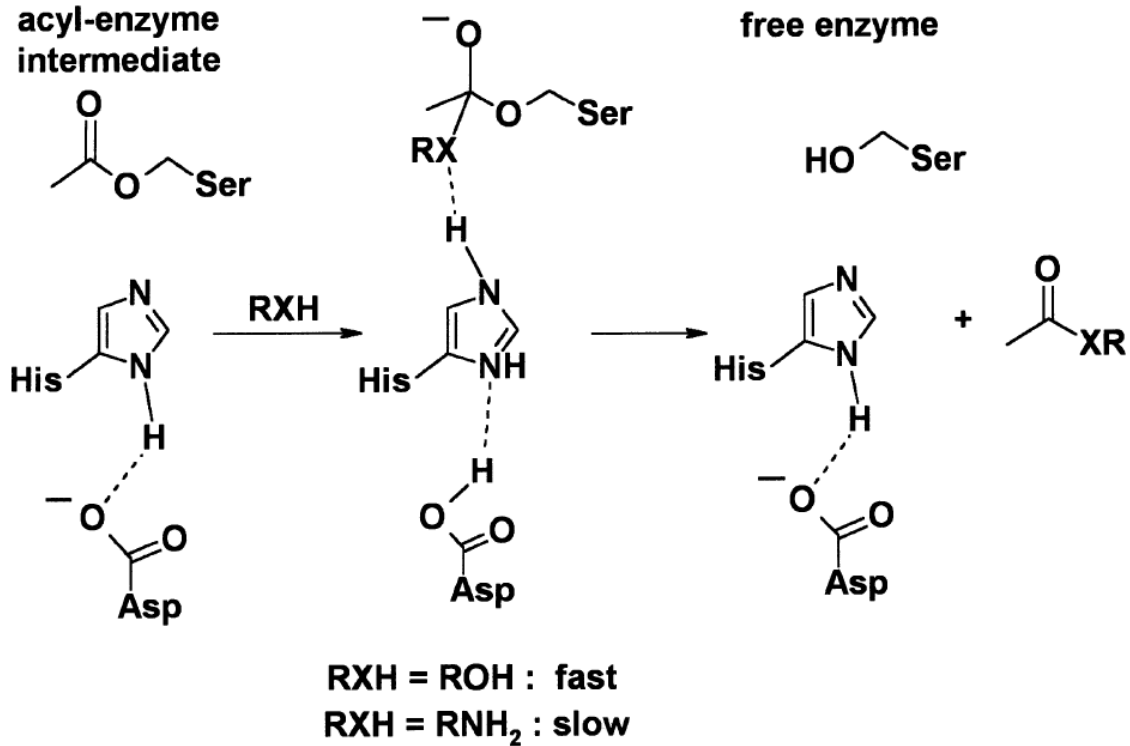


- Hidrolasas (lipasas)
- H₂O sustrato
- Reversible!!

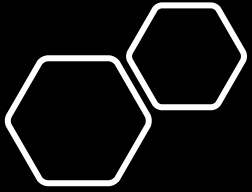
Resoluciones (BASF)



Aminólisis

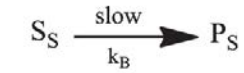
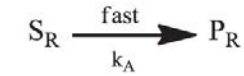


- Las hidrolasas en ausencia de H₂O pueden catalizar aminólisis
- Es más lenta que alcoholisis (o hidrólisis...)



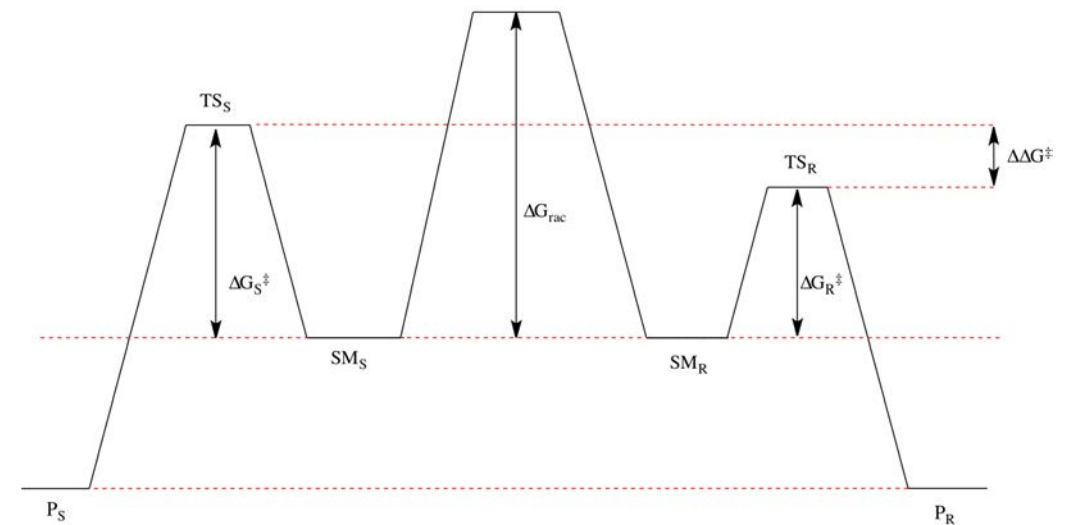
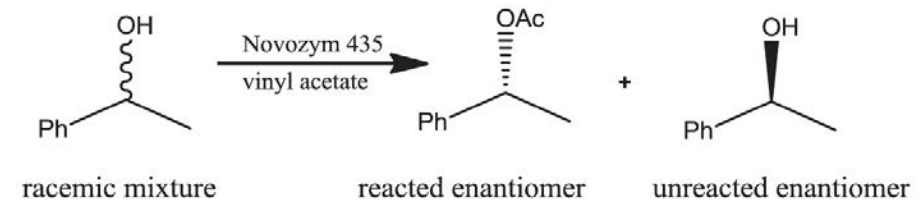
Hidrolasas, resolución de racematos y síntesis asimétricas

- Enzimas, naturalmente quirales
- Resolución de mezclas (A;B) por reactividad diferencial de la enzima hacia las dos formas
- Energía de enantiómeros idéntica
- Resolución por diferentes energías de activación en la reacción



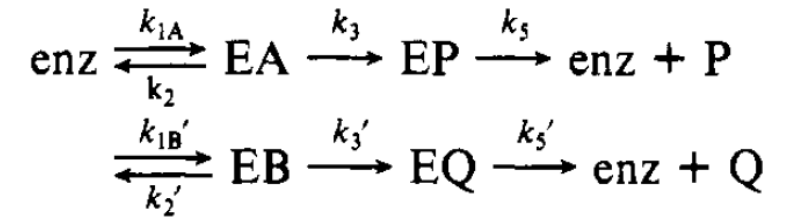
S_R, S_S : substrate enantiomers

P_R, P_S : product enantiomers



Selectividad, extensión de la reacción y exceso enantiomérico

- La enzima reacciona a diferentes velocidades con cada enantiómero (A vs. B)
- Selectividad (E) $\rightarrow$ relación entre velocidades para cada enantiómero
- Exceso enantiomérico (ee) $\rightarrow$ diferencia de fracciones de cada enantiómero
- c $\rightarrow$ extensión de la conversión
- Suponiendo reacción de (pseudo) primer orden, se puede calcular el ee para cada c con una dada E

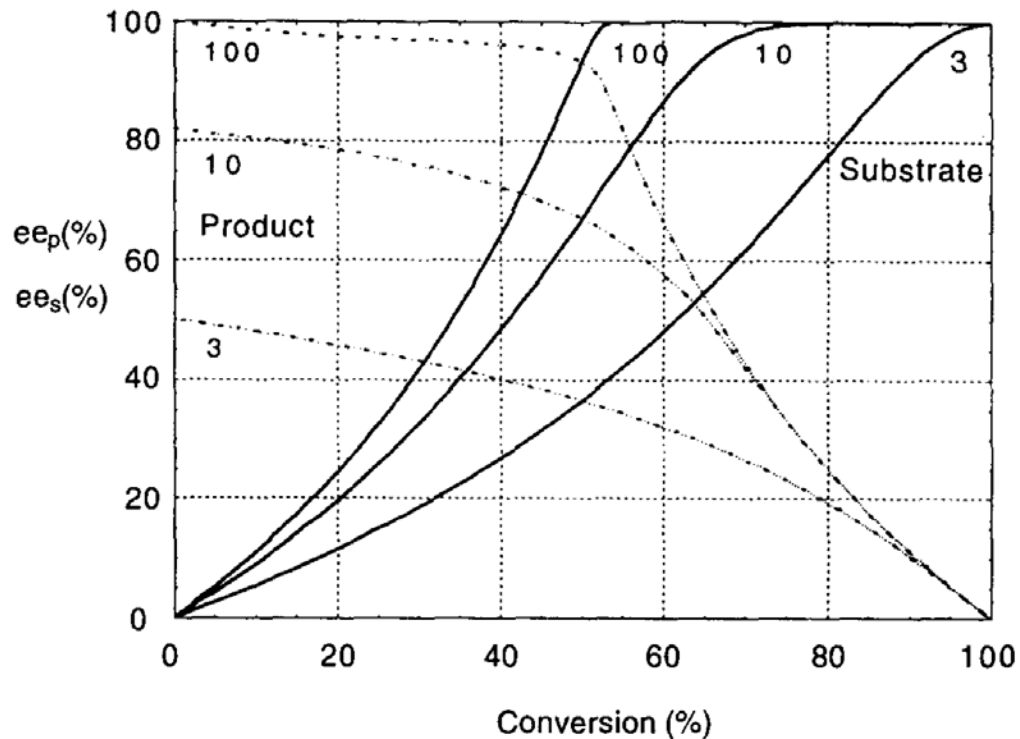


$$\frac{\ln (A/A_0)}{\ln (B/B_0)} = \frac{V_A/K_A}{V_B/K_B} = E$$

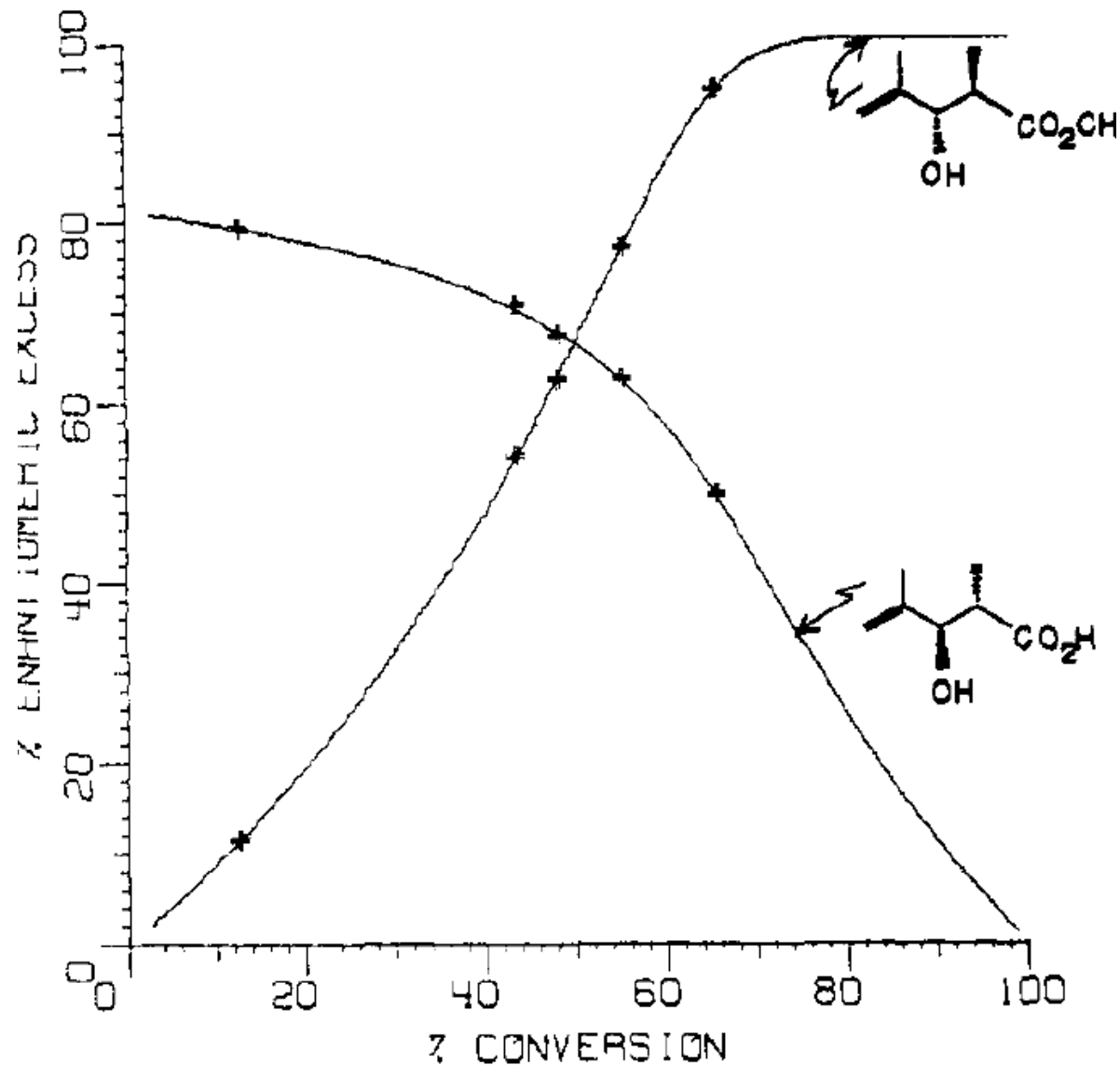
$$\frac{\ln [(1-c)(1-ee(S))]}{\ln [(1-c)(1+ee(S))]} = \frac{V_A/K_A}{V_B/K_B} = E$$

$$c = 1 - \frac{A+B}{A_0+B_0} \quad ee(S) = \frac{B-A}{A+B}$$

Que se resuelve más fácil?



- Enzimas con distintos E (3; 10; 100)
- --- = ee_p → exceso enantiomérico de producto
- ___ = ee_s → exceso enantiomérico de sustrato
- Puedo resolver totalmente sustrato aun con bajo E!
- Producto solo es eficaz a altos E

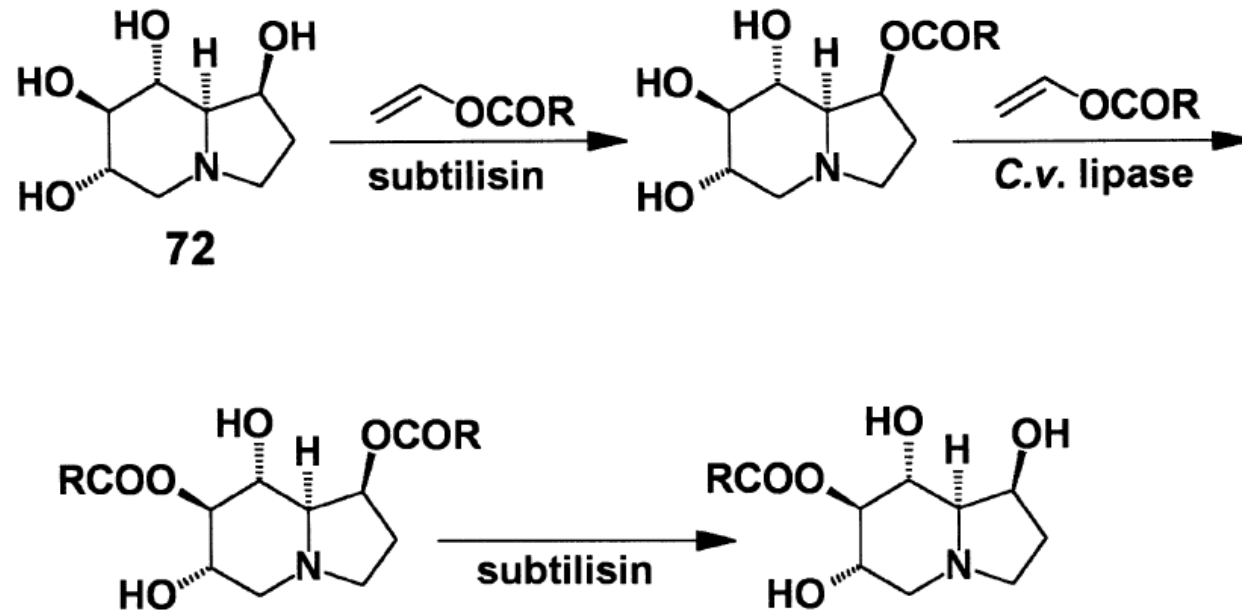


Datos experimentales

Pig liver esterase para resolver un threo ester

Regioselectividad... ingenio

- Castanospermina
- Derivados acilados específicos
 - Subtilisina
 - Lipasa
 - Esterificación
 - Hidrólisis



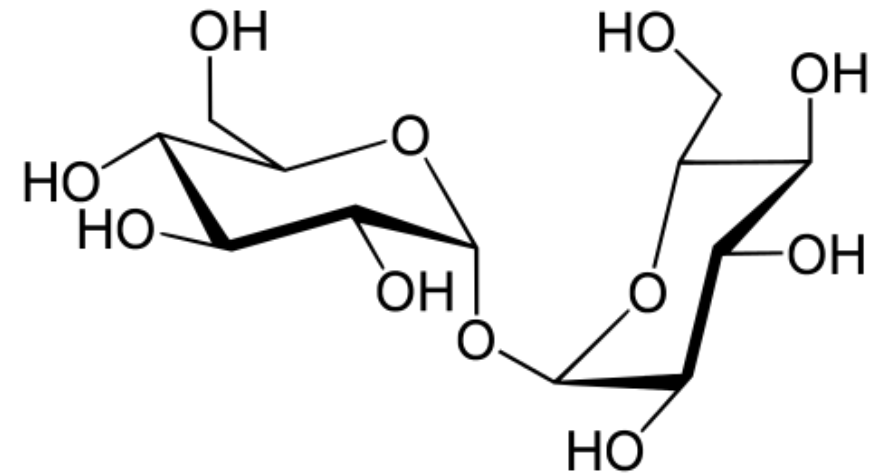


Enzimas en medio orgánico. Plan A, liofilización y adentro!

- Enzimas liofilizadas
- Agregado directo a la fase orgánica
- Baja k_{cat}/K_M !!
 - Se desnaturalizan?
- Liofilización... mala!!!
 - Congelado → desnaturalizante
 - Deshidratación → desnaturalizante
- Pero... regreso a H_2O , recuperan actividad → no es irreversible!
- Que hacemos?

“Activación” de enzimas para medios orgánicos

- Crioprotectores
 - Azúcares → reemplazan H₂O en la sup
 - Lo mejor, trehalosa (natural en ambientes “secos”)
 - Sales (KCl) → ?
 - Polímeros hidrofílicos (PEG)
- Preactivación
 - Liofilización en presencia de sustrato
 - “Memoria”
- Otros
 - Modificación química
 - Crosslinking
 - Inmovilización en superficies
 - Agregación



Más hidrofóbico el medio... mejor

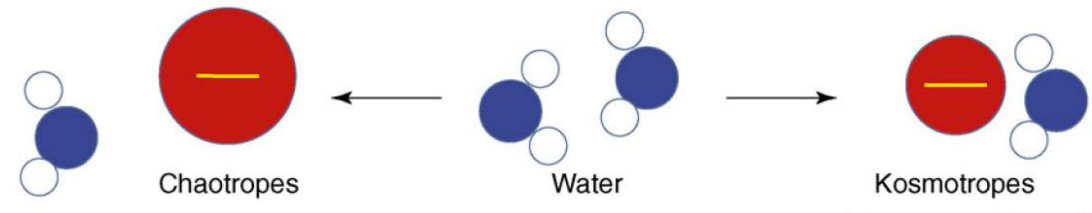
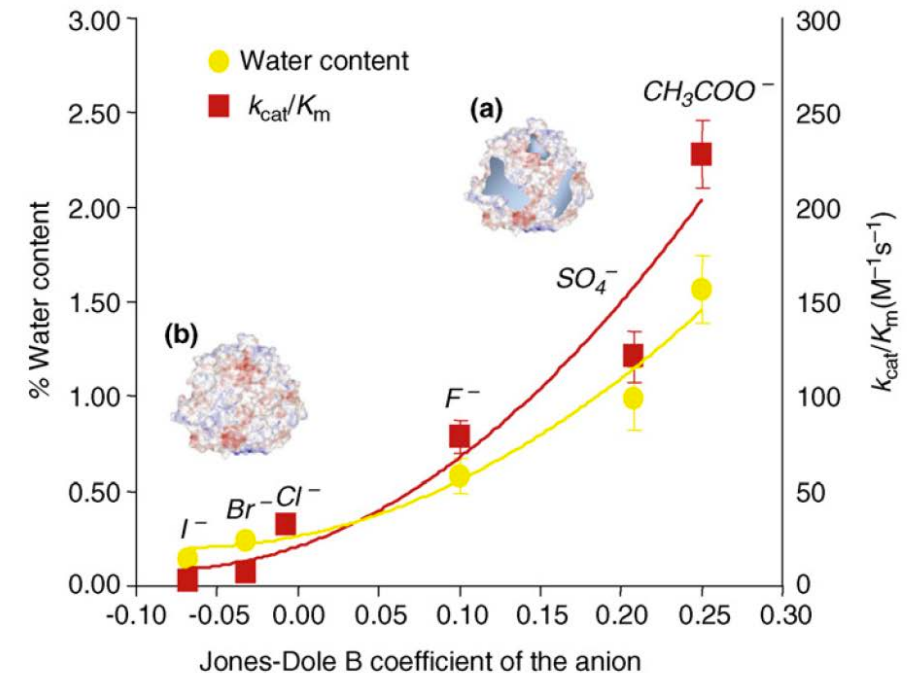
- Log P = particion 1-octanol/H₂O
- Log P<2 no sirve
- Log P>4 OK
- Competencia por H₂O
 - Enzima tritiada (³H)
 - Suspendida en medios, medición de ³H (agua "desorbida")
 - 0.4% en hexano
 - 62% en metanol

TABLE I
LOG *P* VALUES OF ORGANIC SOLVENTS USED IN BIOCATALYTIC PROCESSES

Dimethyl sulfoxide	-1.3	Chloroform	2.0
Dioxane	-1.1	Benzene	2.0
<i>N,N</i> -dimethylformamide	-1.0	Toluene	2.5
Methanol	-0.76	Dibutylether	2.9
Acetonitrile	-0.33	Styrene	3.0
Ethanol	-0.24	Tetrachloromethane	3.0
Acetone	-0.23	Pentane	3.0
Tetrahydrofuran	0.49	Xylene	3.1
Ethylacetate	0.68	Cyclohexane	3.2
Pyridine	0.71	Hexane	3.5
Diethylether	0.85	Heptane	4.0
Cyclohexanone	0.96	Decane	5.6
Cyclohexanol	1.5	Hexadecane	8.8

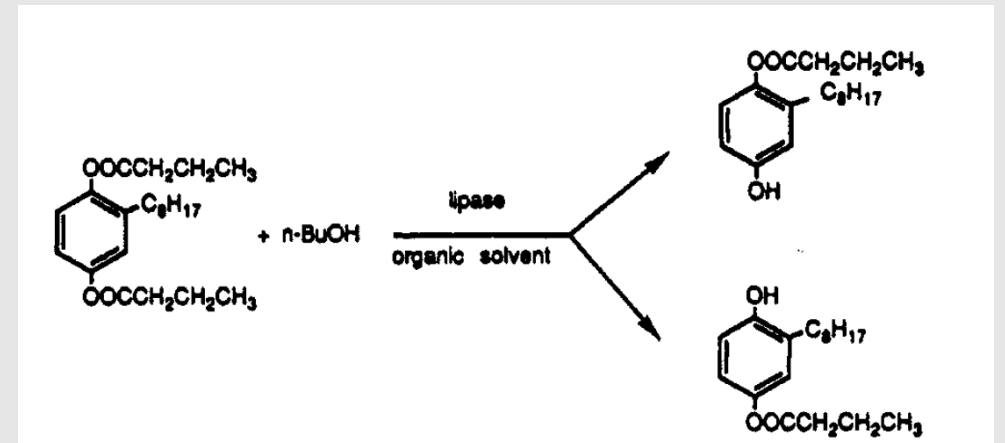
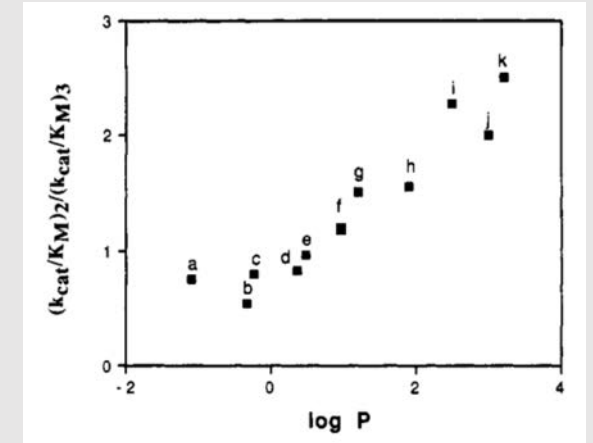
Activación por sal

- Coeficiente de Jones-Dole B (JDB)
 - Cambio de la viscosidad del agua con la sal
 - Aumento → cosmotrópicos
 - Disminución → caotrópicos
- Subtilisina Carlsberg, serie "cosmotropicidad"
 - Aumenta contenido de agua final de la enzima liofilizada
 - Aumenta correspondientemente la actividad
- Funciona con distintas enzimas y en distintos medios
- Mejor si anión cosmotrópico y catión caotrópico
- Mecanismo ... (?)
 - Aumento en H₂O unida?
 - Aumento en movilidad de H₂O unida?



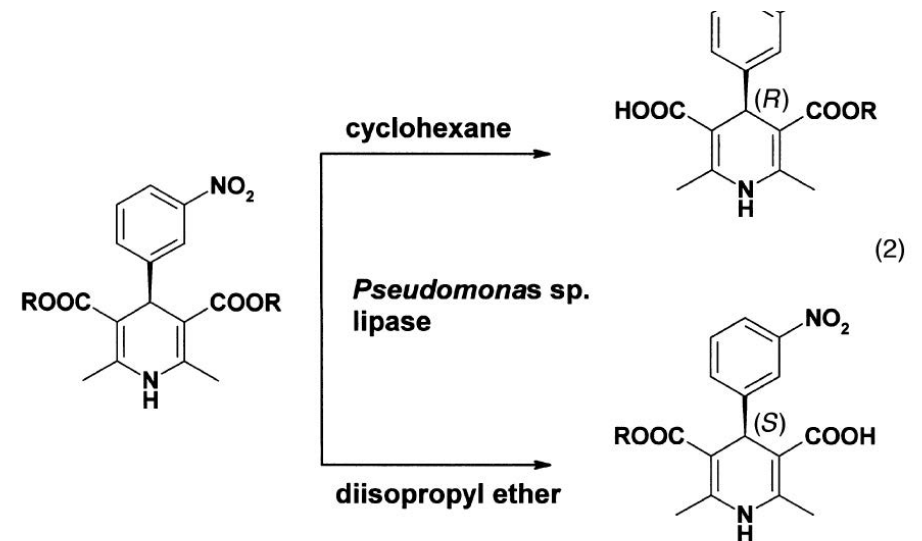
Modulación por solvente: regioselectividad

- Lipasa P. cepacia
- Hidrólisis de octylhydroxiquinona butirada
- Correlación de selectividad con log P



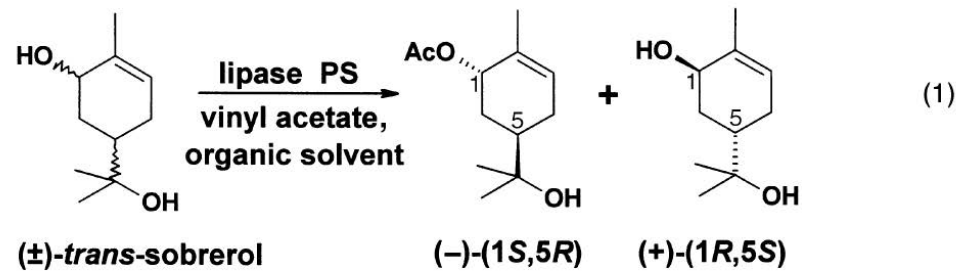
Modulación por solvente: estereoselectividad

- Nifedipine → antagonista de Ca(II),
terapia cardiovascular
- Una configuración activa!
- Resolución con lipasa de *Pseudomonas*
- Reversión **total** de estereoselectividad
con solvente



R	solvent	configuration	ee [%] of hemiester
<i>t</i> BuC(O)OCH ₂	cyclohexane	<i>R</i>	88.8
<i>t</i> BuC(O)OCH ₂	diisopropyl ether	<i>S</i>	> 99
EtC(O)OCH ₂	cyclohexane	<i>R</i>	91.4
EtC(O)OCH ₂	<i>iso</i> -propyl ether	<i>S</i>	68.1

Optimización de enantioselectividad por solvente



solvent	$\log P$	ϵ_r	E
<i>tert</i> -amyl alcohol	1.4	5.8	518
3-pentanone	0.80	17	212
dioxane	-1.1	2.2	178
acetone	-0.23	20.6	142
vinyl acetate	0.31	-	89
tetrahydrofuran	0.49	7.6	69

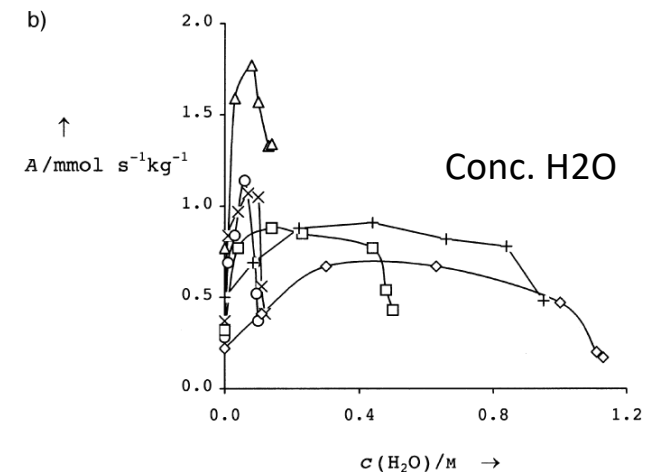
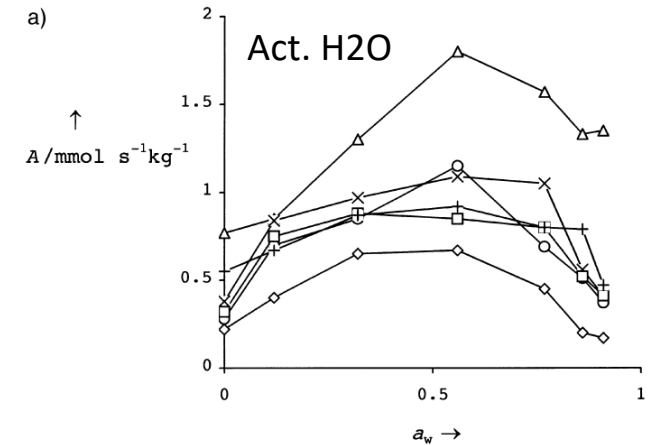
- Resolución de trans-sobrerol
- La lipasa transesterifica solamente una forma!
- Resolución de sustrato

La actividad depende de la “actividad del agua”

- Actividad del agua (a_w)
 - $a_w = X_w \cdot g_w$
 - X_w = fracción molar de agua
 - g_w coeficiente de actividad (depende de hidrofobicidad)
- NO es concentración de agua!
- Lipasa en Hexano, tolueno, tricloroetileno, diisopropileter, 3-pentanona, ácido dodecanoico-dodecanol
 - Mismos datos, distinto eje x
 - Óptimo de actividad $a_w \approx 0.5$

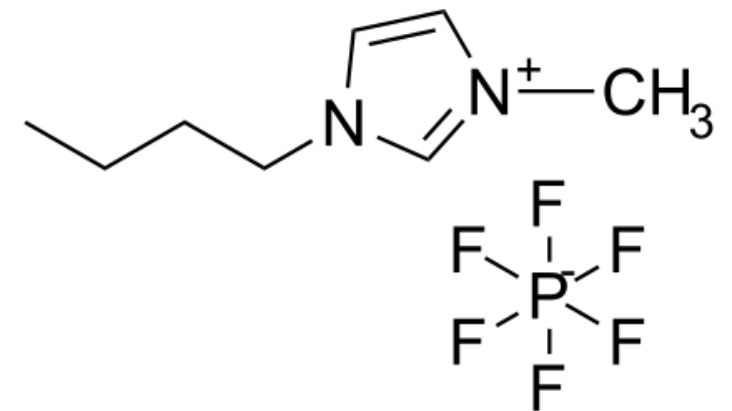
6/10/23

Biotechnología de enzimas



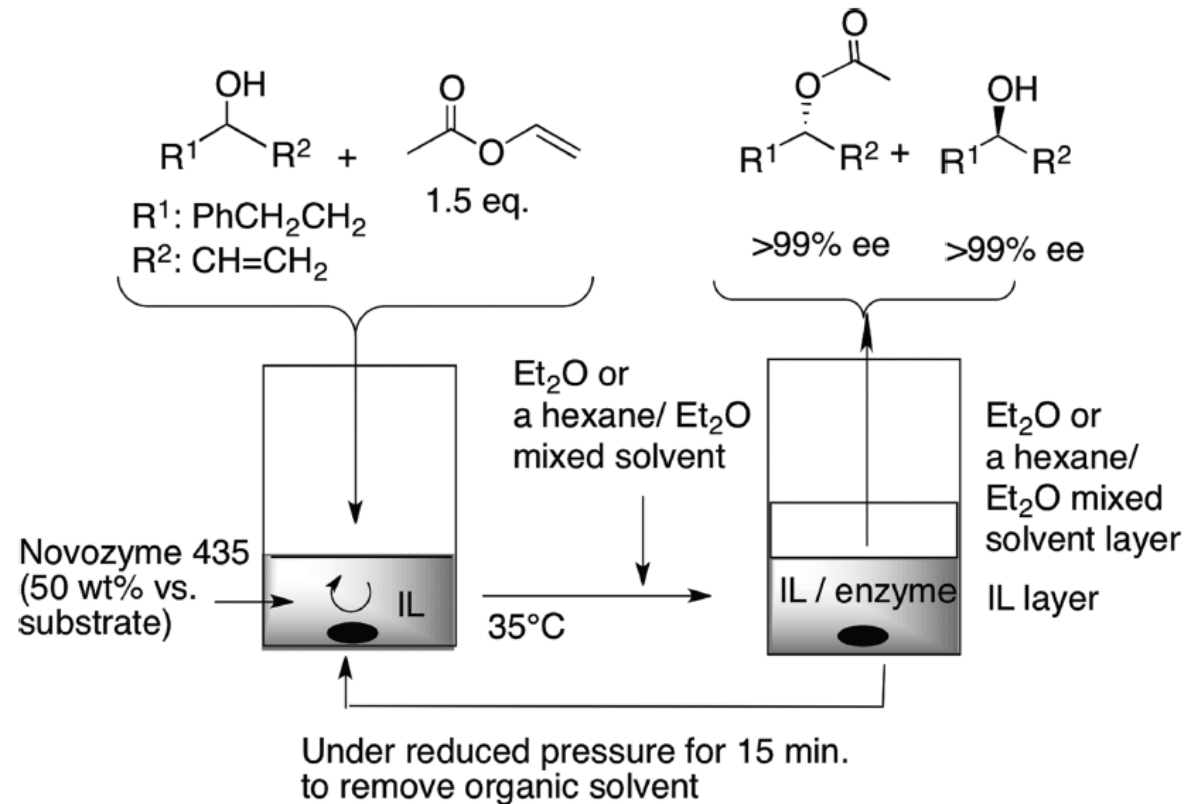
Líquidos iónicos

- Sales en estado líquido
 - Catión y anión “bulky”
- Propiedades favorables
 - Baja volatilidad
 - No inflamables
 - Baja toxicidad
 - Solubilidad de materiales orgánicos e inorgánicos
- Las enzimas se rompen en solventes polares!
- Líquidos iónicos andan bien con lipasas

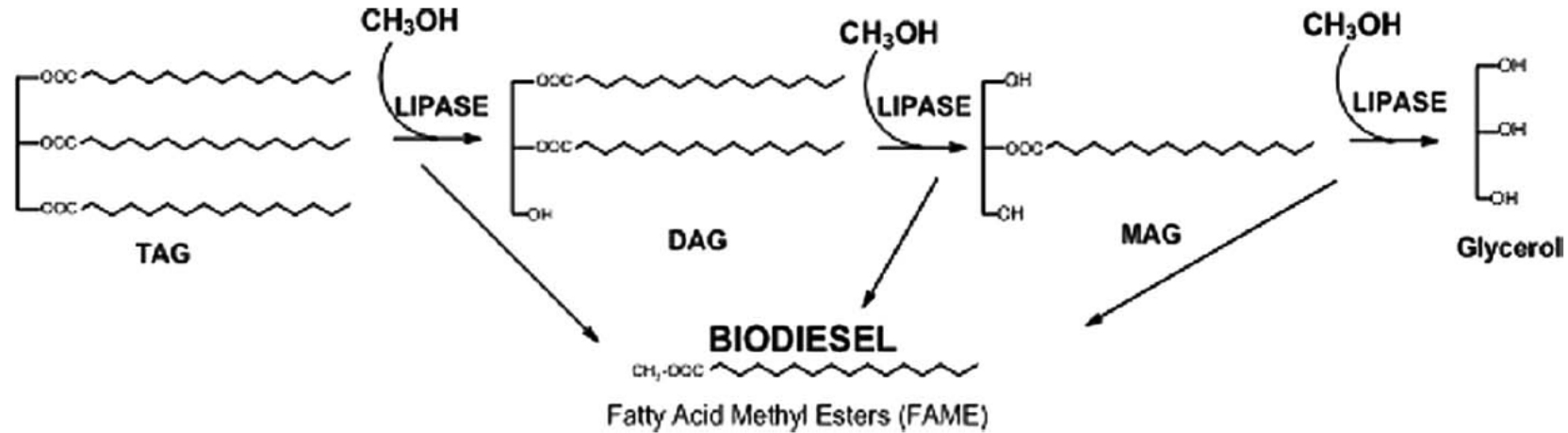


Líquidos iónicos

- Transesterificación
 - 4-fenilbutil-1-en-3-ol
 - Acetato de vinilo
- Extracción de producto en eter/hexano
- Lipasa queda en fase IL! Reciclable
- Enantioselectividad tuneable por el anión



X	Rate (%conv./h)	E value
PF ₆	9.4	>580
BF ₄	14	>640
SbF ₆	0.77	>360
OTf	1.8	>450
TFA	0.25	227

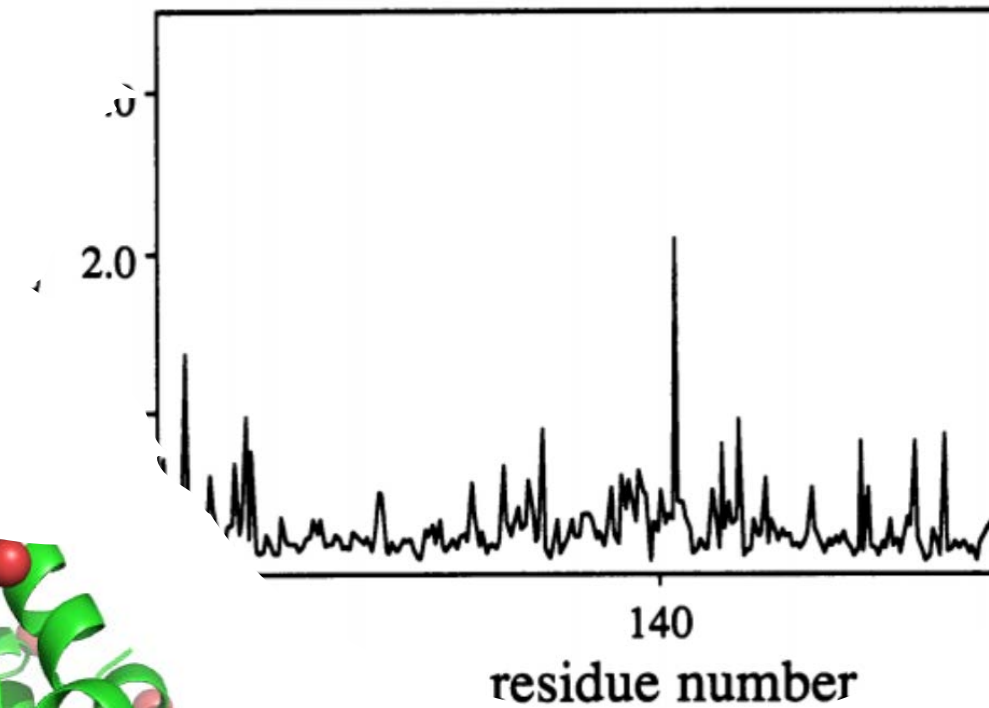
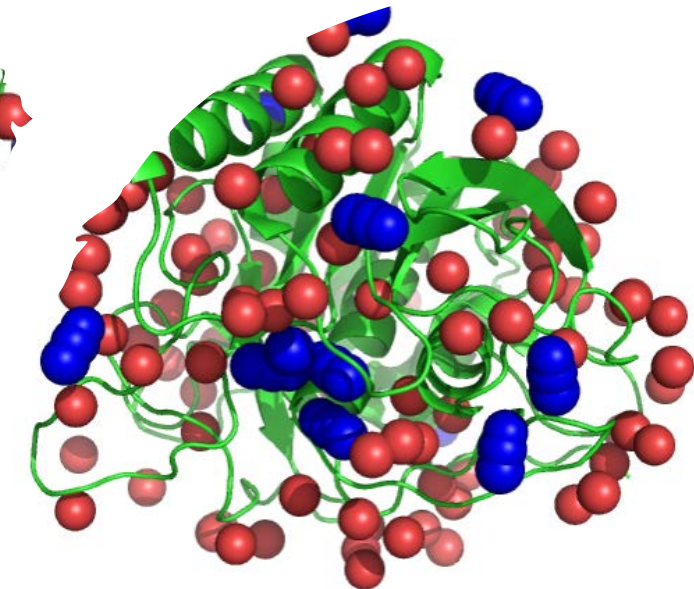
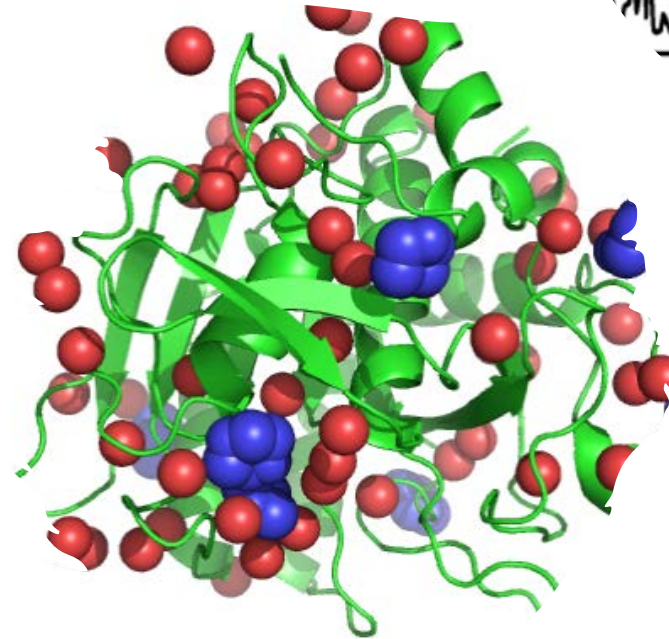


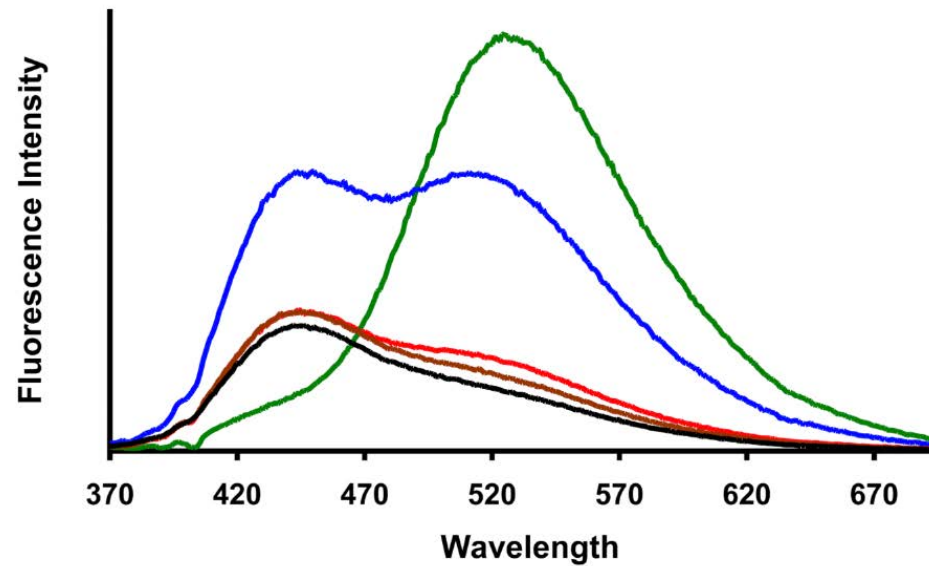
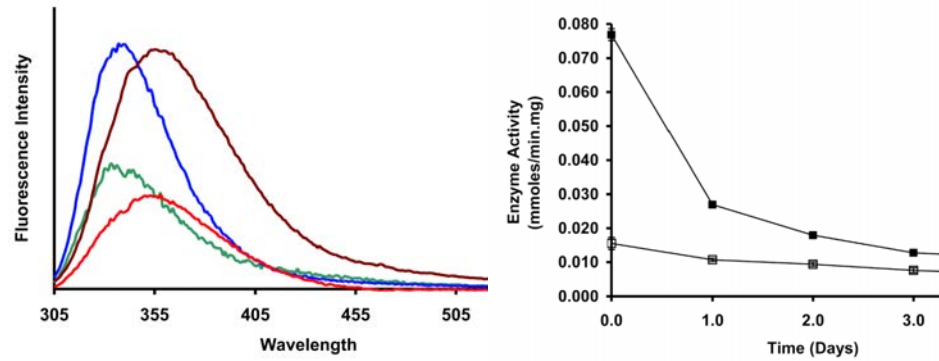
Producción de biodiesel en líquido iónico con lipasa

- En aceite el metanol no es soluble y desactiva la enzima
- C₁₆MIM NTf₂ → Medio de reacción homogéneo. Al final de reacción, tres fases
 - FAMEs
 - Glicerol
 - Líquido iónico (con la enzima activa!)
- El LI se puede solidificar para extraer el resto más fácil

Como luce una enzima en medio no acuoso

- Klibanov '90s
- Subtilisina Carlsberg
- Xtales en H₂O
 - Crosslink
 - Intercambio con acetonitrilo o dioxano
- Estructuralmente, casi idénticas
- Siguen teniendo agua!!
- Solvente pegado en lugares particulares





Como afecta el tiempo en solvente polar

- Subtilisina Carlsberg PEGilada
 - Medición transesterificación alcohol sec-fenetílico y butirato de vinilo
 - Producto determinado por cromatografía
 - Pierde actividad en el tiempo
- Fluo intrínseca
 - Rojo= Buffer; verde=dioxano; azul=acetonitrilo; marrón=no PEG
 - W se “esconde” en el solvente polar
- Inhibición con cloruro de dansilo (sitio activo)
 - Verde a negro= 0 a 4 días
 - Reducción de polaridad con el tiempo

Micelas reversas

- Microemulsiones
- Una fase, termodinámicamente estables
- Dispersión de la enzima en la fase orgánica
- Mantiene el H₂O
- Surfactante, AOT
 - “Trapezoidal”
 - Forma micelas invertidas espontáneamente
- [H₂O] y [AOT]
 - Ratio determina tamaño micelas
 - Concentración, cantidad
 - $w_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$
 - $r \approx 0.175 w_0 \text{ (nm)}$

