



University of Zagreb
FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Mehmet Mervan Çakar

REACTION ENGINEERING AIDED SYNTHESIS OF SIALIC ACIDS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Mehmet Mervan Çakar

SINTEZA SIJALINSKIH KISELINA POTPOMOGNUTA REAKCIJSKIM INŽENJERSTVOM

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.

ABSTRACT

This dissertation explores the enzymatic synthesis of sialic acids, particularly N-acetylneuraminic acid and its analogs, by employing sialic acid synthases N-acetylneuraminic acid synthase from *Neisseria meningitidis* (*NmNeuS*) and putative N-acetylneuraminic acid synthase homolog 5 (PNH₅) from Prozomix. Recognizing the limitations of traditional chemical synthesis methods, which often involve environmentally toxic processes and limited scalability, this research investigates biocatalysis as a sustainable alternative. Through rigorous screening of metagenomic enzyme libraries, *NmNeuS* and PNH₅ were identified as key biocatalysts, with each enzyme showing distinct catalytic properties: *NmNeuS* demonstrated broad substrate tolerance and high efficiency with monosaccharides, notably N-acetylmannosamine, positioning it as a strong candidate for large-scale sialic acid production. In contrast, PNH₅ exhibited a narrower substrate scope limited specificity and activity with monosaccharides, making it suitable for targeted applications with the potential for enhancement through reaction and enzyme engineering.

Furthermore, this study examined promiscuous aldol addition reactions catalyzed by 3-Deoxy-7-phosphoheptulonate synthase and 3-Deoxy-8-phosphooctulonate synthase enzymes, highlighting their capacity for C–C bond formation with a range of aromatic aldehydes. The substantial substrate promiscuity of these enzymes, coupled with their high substrate conversions to select substrates such as benzyloxyacetaldehyde, underscores their utility in synthesizing complex chiral intermediates with potential pharmaceutical applications. Optimization of solvent systems, particularly through DMF concentration adjustments, was shown to significantly influence enzyme activity, marking an important step in fine-tuning reaction conditions for higher yields and improved enantioselectivity.

A robust mathematical modeling approach underpinned the reaction engineering strategies in this work, facilitating kinetic parameter estimation and enabling reaction optimization to enhance enzyme performance across various conditions. By integrating these models with experimental data, this research successfully scaled up Neu5Ac synthesis, demonstrating the practical feasibility of biocatalysis for industrial applications. The findings from this dissertation advance the potential for sustainable biocatalytic synthesis of sialic acids and derivatives, paving the way for their application in antiviral, antibacterial, and anticancer therapies.

Keywords: biocatalysis, mathematical modelling, sialic acids, Neu5Ac, reaction engineering

SAŽETAK

Ovaj doktorski rad istražuje enzimsku sintezu sijaliskih kiselina, posebno N-acetilneuraminske kiseline (Neu5Ac) i njezinih analoga, primjenom sintaza sijaliske kiseline *NmNeuS* i PNH₅. Uzimajući u obzir ograničenja tradicionalnih metoda kemijske sinteze, koje često uključuju procese štetne za okoliš i ograničenu primjenu, ovo istraživanje promatra biokatalizu kao održivu alternativu. Kroz pretraživanje metagenomskih knjižnica enzima, *NmNeuS* i PNH₅ identificirani su kao ključni biokatalizatori, pri čemu je svaki enzim pokazao različita katalitička svojstva: *NmNeuS* je pokazao široku toleranciju na supstrate i visoku učinkovitost s monosaharidima, posebno s N-acetilmanozaminom, što ga čini snažnim kandidatom za proizvodnju Neu5Ac-a u uvećanom mjerilu. Suprotno tome, PNH₅ je pokazao uži spektar supstrata, s većom specifičnošću prema heksozama, ali ograničenom aktivnošću prema, što ga čini prikladnim za ciljane primjene s potencijalom za poboljšanje kroz enzimsko inženjerstvo.

Nadalje, ovo istraživanje ispitalo je promiskuitetne aldolne adicije katalizirane enzimima 3-deoksi-7-fosfoheptulonat sintaza i 3-deoksi-7-fosfoheptulonat sintaza, naglašavajući njihovu sposobnost stvaranja C–C veza s nizom aromatskih aldehida. Značajna promiskuitetnost supstrata kod ovih enzima, u kombinaciji s visokim konverzijama kod odabranih supstrata poput benziloksiacetaldehida, naglašava njihovu korisnost u sintezi složenih kiralnih intermedijera s potencijalnom farmaceutskom primjenom. Optimizacija sustava otapala, posebno kroz prilagodbu koncentracije DMF-a, pokazala je značajan utjecaj na aktivnost enzima, čime je obilježen važan korak u finoj prilagodbi reakcijskih uvjeta za postizanje viših prinosa i poboljšane enantioselektivnosti.

Robustan pristup matematičkog modeliranja naglasio je strategije reakcijskog inženjerstva u ovom radu, olakšavajući procjenu kinetičkih parametara i omogućavajući optimizaciju reakcije za poboljšanje performansi enzima u različitim uvjetima. Integracijom modela s eksperimentalnim podacima, u ovom istraživanju uspješno je provedena sinteza Neu5Ac na uvećanom mjerilu, pokazujući praktičnu izvedivost biokatalize za industrijske primjene. Kinetički modeli ne samo da su vodili optimizaciju procesa za sintezu Neu5Ac već su uspostavili okvir primjenjiv i na druge biokatalitičke sustave. Rezultati ove disertacije unapređuju potencijal za održivu biokatalitičku sintezu sijalinskih kiselina i njihovih derivata, otvarajući put za njihovu potencijalnu primjenu u antivirusnim, antibakterijskim i antitumorskim terapijama.

Ključne riječi: biokataliza, matematičko modeliranje, sijalične kiseline, Neu5Ac, reakcijsko inženjerstvo