

UNIVERSITATEA "POLITEHNICA" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE CHIMIE INDUSTRIALĂ ȘI INGINERIA MEDIULUI

Ing. Peter Francisc

**SINTEZA UNOR CLASE DE COMPUȘI ORGANICI ÎN
CONDIȚII ENERGETICE AVANTAJOASE**

Teză de doctorat

BIBLIOTECA CENTRALĂ
UNIVERSITATEA "POLITEHNICA"
TIMIȘOARA

**Conducător științific:
Prof. Dr. Chim. Csunderlik Carol**

624. 725
181 Δ

Timișoara, 1999

CUPRINS

	Pag.
Introducere	1
Partea I. Studiu documentar despre lipaze și reacții catalizate de lipaze	5
1. Obținerea, purificarea și caracterizarea lipazelor	5
1.1. Obținerea lipazelor din culturi microbiene	5
1.1.1. Culturi pe medii solide	7
1.1.2. Culturi submerse	7
1.1.2.1. Factori care influențează biosinteza lipazelor în culturi submerse	7
1.1.2.2. Condiții de biosinteză pentru lipaze microbiene comerciale	13
1.1.3. Purificarea și caracterizarea lipazelor microbiene	14
1.2. Obținerea, purificarea și caracterizarea lipazelor pancreatice	20
1.3. Structura proteică a lipazei și conformația centrului activ	23
1.4. Specificitatea lipazelor	26
2. Cinetica și mecanismul reacțiilor catalizate de lipaze	29
2.1. Cinetica hidrolizei trigliceridelor emulsionate	30
2.2. Cinetica hidrolizei enzimatică cu lipaze în sisteme bifazice apă-solvenți organici	35
2.3. Cinetica reacțiilor de esterificare și transesterificare în solvenți organici, catalizate de lipaze	42
2.4. Mecanismul catalitic al reacțiilor catalizate de lipaze	49
3. Utilizarea lipazelor drept biocatalizatori în sinteze organice	52
3.1. Reacții de hidroliză catalizate de lipaze	52
3.1.1. Hidroliza trigliceridelor în cataliză enzimatică	53
3.1.2. Reacții de hidroliză enantioselectivă catalizate de lipaze	56
3.2. Reacții de esterificare și transesterificare catalizate de lipaze	64
3.2.1. Sinteze de esteri prin reacții de esterificare directă catalizate de lipaze	64
3.2.1.1. Sinteza esterilor glicerinei cu lipaze	66
3.2.1.2. Sinteze de esteri ai alcoolilor monohidroxilici primari și secundari	69
3.2.2. Sinteze de esteri ai hidraților de carbon în prezență de lipaze	75
3.2.3. Reacții de modificare a trigliceridelor prin trans- și interesterificare	76
Partea II. Contribuții originale. Reacții de esterificare și transesterificare prin biocataliză cu lipaze	82
4. Obținerea și caracterizarea unor biocatalizatori enzimatici cu activitate lipazică	82
4.1. Determinarea activității lipazice	82
4.2. Obținerea prin biosinteză și purificarea lipazei din <i>Aspergillus niger</i> IC	84
4.2.1. Culturi pe medii solide	84
4.2.2. Culturi pe medii lichide	85
4.2.3. Purificarea extractelor brute din mediile de cultură	86

4.2.3.1.	Purificarea extractului brut de la cultura pe mediu solid prin precipitare cu sulfat de amoniu	87
4.2.3.2.	Purificarea extractului brut de la cultura pe mediu lichid prin precipitare cu sulfat de amoniu	88
4.2.3.3.	Purificarea extractului brut de la cultura pe mediu lichid prin gel-filtrare	88
4.2.4.	Concluzii	89
4.3.	Obținerea și purificarea lipazei din pancreas de porc	89
4.3.1.	Obținerea preparatului brut	90
4.3.2.	Extracția lipazei din preparatul brut de pancreas	91
4.3.3.	Purificarea lipazei din extractele brute	92
4.3.3.1.	Purificarea prin gel-filtrare pe Sephadex G-100 urmată de precipitare cu acetonă	92
4.3.3.2.	Purificarea prin precipitare cu acetonă	95
4.3.4.	Activarea lipazei pancreatice prin precipitare la pH controlat	96
4.3.4.1.	Dependența activității hidrolitice și a specificității de substrat de pH-ul la care are loc precipitarea	97
4.3.4.2.	Studiul activității de esterificare și transesterificare a preparatelor lipazice obținute prin precipitare la pH controlat	99
4.3.4.2.1.	Analiza 1-pentanolului prin cromatografie gaz-lichid	100
4.3.4.2.2.	Testarea preparatelor lipazice în reacția de esterificare	104
4.3.4.2.3.	Testarea preparatelor lipazice în reacția de transesterificare	105
4.3.5.	Concluzii	106
5.	Modelul cinetic al reacțiilor de esterificare și transesterificare catalizate de lipază	108
5.1	Expresia matematică a modelului cinetic	108
5.2.	Validarea modelului pentru reacții de esterificare și transesterificare catalizate de lipaza pancreatică	112
5.2.1.	Reacția de esterificare a acidului hexanoic cu 1-pentanolul	112
5.2.2.	Reacția de transesterificare a tributiratului de glicerină cu 1-pentanol	115
5.2.3.	Reacția de esterificare a acidului oleic cu glicerina	116
5.2.4.	Reacția de acilare a 1,3-butandiolului cu acetat de n-butyl	118
5.3.	Concluzii	120
6.	Influența parametrilor de reacție asupra activității de esterificare a lipazei pancreatice în mediu de solvent organic	121
6.1.	Dependența vitezei inițiale de concentrația de enzimă	124
6.2.	Influența naturii și polarității solventului organic	126
6.3	Influența cantității inițiale de apă din sistemul de reacție	130
6.4	Influența temperaturii	133
6.5	Influența concentrației inițiale a substratului	134
6.6.	Concluzii	136
7.	Determinarea specificității de substrat a lipazei pancreatice în reacții de esterificare prin metoda cinetică a vitezelor inițiale	137
7.1.	Specificitatea în raport cu acizii monocarboxilici	137
7.2.	Specificitatea în raport cu alcoolii monohidroxicilici	141
7.3.	Concluzii	144

8.	Sinteze enzimatică de esteri ai unor alcooli di- și trihidroxilici	145
8.1.	Studiul esterificării glicerinei cu acidul oleic în sistem bifazic	145
8.1.1.	Calculul vitezelor inițiale	147
8.1.2.	Studiul parametrilor care influențează reacția de esterificare a glicerinei cu acid oleic	149
8.1.2.1.	Dependența vitezei inițiale aparente de esterificare de natura emulgatorului	149
8.1.2.2.	Dependența vitezei inițiale aparente de esterificare de concentrația emulgatorului	150
8.1.2.3.	Dependența vitezei inițiale aparente de esterificare de raportul molar al reactanților	151
8.1.2.4.	Dependența vitezei inițiale aparente de esterificare de raportul molar apă/acid oleic	153
8.1.2.5.	Discuții și concluzii	154
8.2.	Acilarea enzimatică a diolilor prin reacții de transesterificare	158
8.2.1.	Acilarea enzimatică a unor dioli cu două grupări hidroxil primare	159
8.2.1.1.	Relațiile de calcul și modelul cinetic	160
8.2.1.2.	Influența lungimii catenei hidrocarbonate a diolului și agentului de acilare asupra randamentului și vitezei de reacție	163
8.2.2.	Acilarea enzimatică regioselectivă a unor dioli având o grupă hidroxil primară și una secundară	165
8.2.3.	Concluzii	168
	Concluzii generale	169
	Bibliografie	174

INTRODUCERE

Reducerea consumurilor energetice în procesele chimice reprezintă una din preocupările primordiale ale ingineriei chimice și utilizarea de catalizatori cu eficiență și specificitate din ce în ce mai ridicată reprezintă o cale importantă pentru atingerea acestui obiectiv. În aceste condiții a fost normal ca atenția chimiștilor organicieni să fie îndreptată și asupra enzimelor, a căror extraordinară putere catalitică a fost recunoscută încă din secolul trecut. Enzimele, care sunt biocatalizatori de natură proteică, acționează în medii apoase neutre și la temperatura ambiantă, reușind să intermedieze desfășurarea unor reacții de o complexitate formidabilă. După ce progresele înregistrate în domeniul biotehnologiei au făcut posibilă obținerea unui număr mare de enzime la un preț accesibil, utilizarea lor drept catalizatori în sinteze organice a cunoscut o dezvoltare explozivă și la ora actuală se estimează că au fost publicate peste 8000 de lucrări științifice în acest domeniu. Realizarea unor procese industriale competitive cu cele clasice mai necesită însă o serie de eforturi și în primul rând înțelegerea bazelor chimice ale catalizei enzimaticice.

Tehnologiile care utilizează enzime pot fi incluse în ramura biotehnologiilor, întrucât utilizarea deliberată a capacității catalitice a enzimelor reprezintă esența oricărei biotehnologii, de la cele mai simple care cuprind transformări biochimice sub acțiunea unei singure enzime, până la cele complexe care se realizează prin tehnici de inginerie genetică (figura 1).

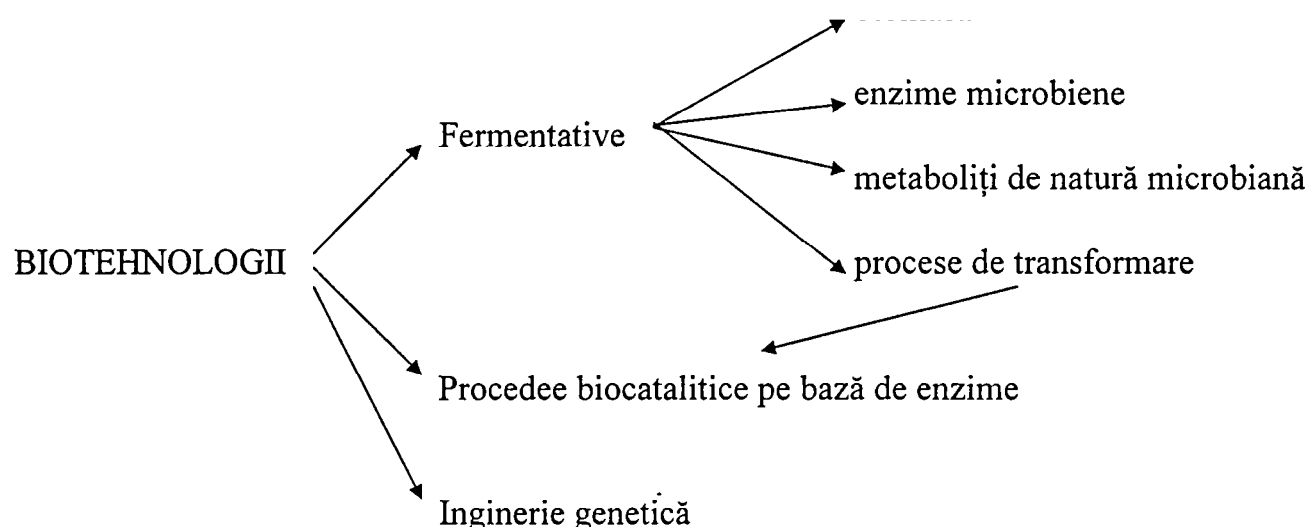


Figura 1. Locul tehnologiilor pe bază de enzime în cadrul biotehnologiilor

Tehnologiile fermentative clasice constau în cultivarea unor microorganisme: bacterii, drojdii, ciuperci, pe medii nutritive potrivite care reprezintă substratul pentru metabolismul acestora. În funcție de scopul urmărit, avem patru tipuri de asemenea procese:

- procese care produc celule microbiene sau biomasă
- procese care produc enzime microbiene
- procese care realizează metaboliți de natură microbiană
- procese de transformare, care realizează modificarea unui compus chimic introdus în mediul de cultură.

Tehnologiile enzimatică ar putea fi considerate derivate din această ultimă categorie, întrucât realizează transformarea chimică a unor substanțe utilizând potențialul biocatalitic al enzimelor. Însă realizarea unor asemenea reacții direct în mediul de cultură este anevoioasă din cel puțin două motive:

- procesul este însoțit de obținerea unei cantități însemnate de biomasă, iar concentrația produsului dorit este mică, ceea ce face dificilă separarea sa;
- în general microorganismele produc o serie întreagă de enzime, chiar în condiții de cultură controlate, ceea ce face posibilă apariția unor reacții secundare nedorite.

Din aceste motive s-au dezvoltat tehnologiile bazate pe izolarea enzimelor din medii de cultură microbiene, dar și din țesuturi vegetale și animale și pe utilizarea lor "in vitro".

Cea mai importantă proprietate a enzimelor din punctul de vedere al capacității lor biocatalitice este specificitatea, care poate fi de următoarele două tipuri: specificitate de reacție și specificitate de substrat (figura 2).

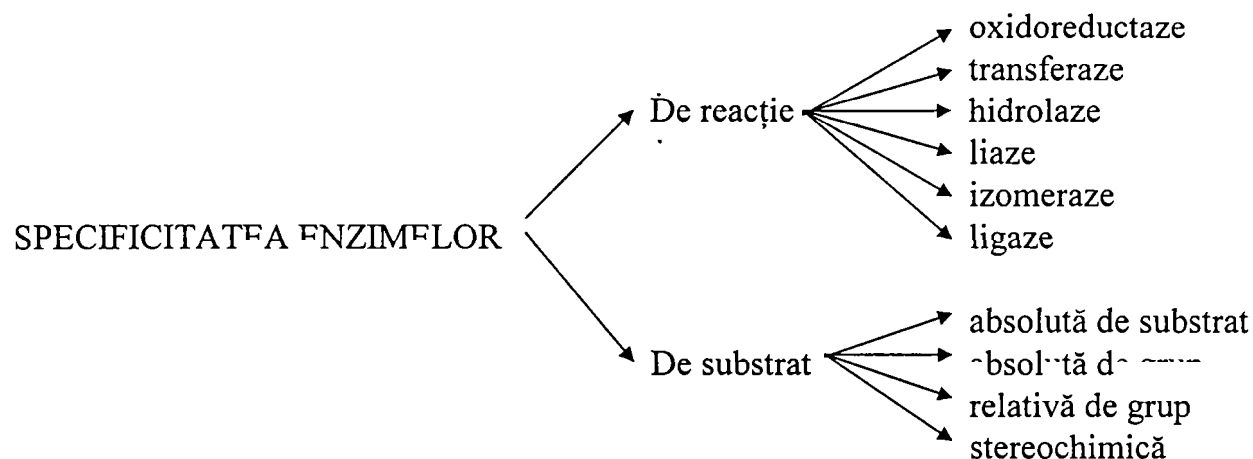


Figura 2. Specificitatea enzimelor

Pe baza specificității de reacție, enzimele se împart în cele 6 clase cunoscute.

Specificitatea de substrat, la rândul ei, poate fi:

- specificitate absolută de substrat, care se manifestă față de un singur compus chimic;
- specificitate absolută de grup, care se manifestă față de un anumit tip de legătură și o anumită grupare de atomi;
- specificitate relativă de grup (numită și slabă specificitate de substrat), care se manifestă numai față de un anumit tip de legătură;
- specificitate stereochimică, ce se manifestă față de unul din izomerii optici ai unor compuși ce conțin centre de asimetrie.

În acest sens trebuie menționat că majoritatea reacțiilor catalizate de enzime în organismele vii sunt enantiospecifice. Enantiospecificitatea poate să se manifeste concomitent cu oricare dintre celelalte trei tipuri de specificitate de substrat.

Dintre cele peste 2500 de enzime cunoscute și clasificate la această oră, doar un număr relativ mic au fost investigate în vederea utilizării cu rol catalitic în sinteze chimice organice. Mai mult de jumătate dintre aceste utilizări sunt datorate unor enzime din clasa hidrolazelor, urmate de oxidoreductaze. O serie dintre aceste enzime s-au dovedit a fi, datorită specificității de substrat reduse pe care o manifestă, catalizatori eficienți pentru transformarea unui mare număr de compuși.

Dezvoltarea extraordinară a acestui domeniu în ultima perioadă fost stimulată de două descoperiri esențiale:

- menținerea activității pentru o serie de enzime în sisteme bifazice apă-solvent organic și chiar în medii organice practic anhidre, conținând doar urme de apă, descoperire ce se datorează în mare măsură cercetărilor de pionierat ale Profesorului Alexander M. Klibanov de la Massachusetts Institute of Technology din Statele Unite ale Americii. Deși în mod convențional s-a considerat că enzimele au nevoie de apă pentru exercitarea activității catalitice, întrucât apa participă, direct sau indirect, la toate interacțiunile necovalente care mențin conformația catalitică activă a enzimei, practica a arătat că această cantitate de apă necesară poate fi extrem de mică. În esență, enzima are probabil nevoie pentru menținerea conformației catalitice active doar de un strat foarte subțire, chiar monomolecular, de molecule de apă dispus în jurul macromoleculei enzimatică.

- manifestarea stereoselectivității enzimelor și asupra unor substraturi total diferite de cele ale căror transformări le catalizează în mod uzual.

Aceste descoperiri au permis extinderea biocatalizei la un număr foarte mare de reacții de sinteză fină organică, astfel încât la ora actuală au fost sau sunt pe cale de a fi sintetizate, chiar la nivel industrial, o serie de produse natural-identice, farmaceutice sau agrochimice de mare valoare a căror obținere pe căile de sinteză clasice este de multe ori extrem de anevoioasă.

Dezvoltarea cunoștințelor despre structura enzimelor a fost de asemenea foarte spectaculoasă, datorită progreselor înregistrate în domeniile biologiei și biochimiei, ceea ce în unele cazuri a făcut posibilă cunoașterea chiar a structurii și conformației centrului catalitic activ al enzimei.

Din punct de vedere al utilizării capacității biocatalitice a enzimelor, un rol foarte important are sistemul de reacție folosit. Sistemele posibile de reacții biocatalitice sunt în principiu de trei tipuri (figura 3):

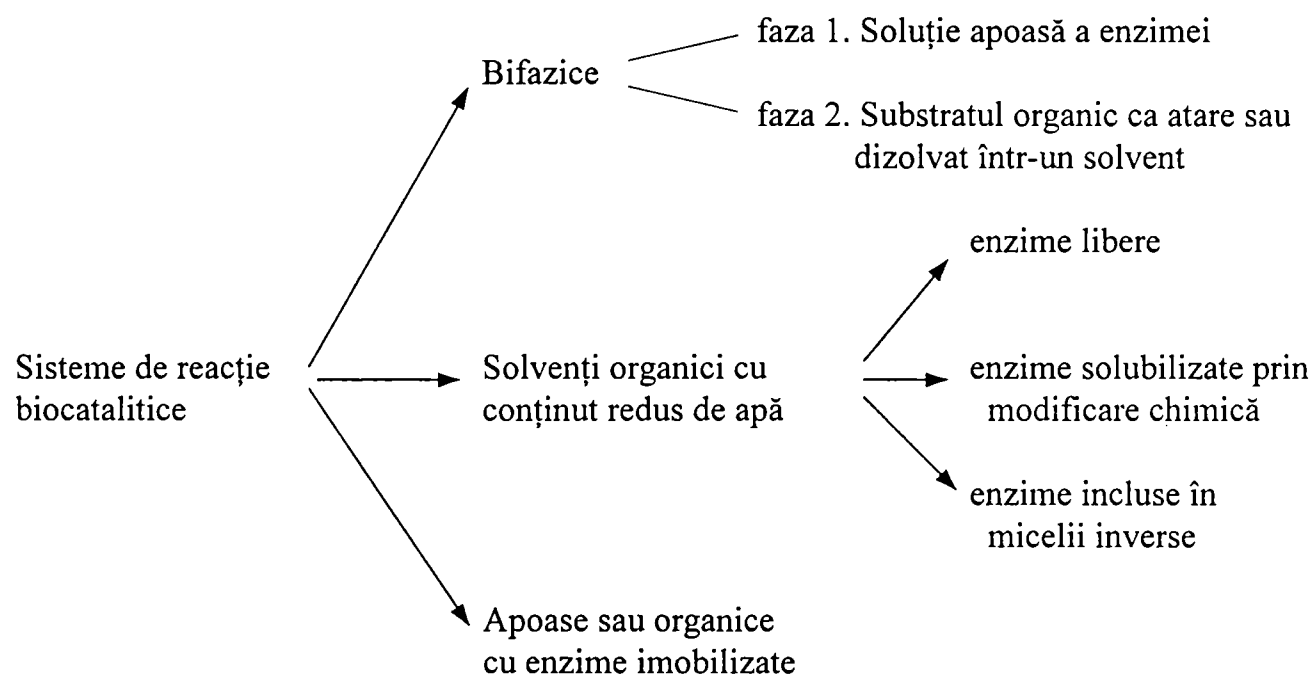


Figura 3. Tipuri de sisteme de reacție biocatalitice

a. Sisteme de reacție bifazice lichid-lichid, în care substratul insolubil în apă dizolvat într-un solvent organic, sau substratul lichid însuși, este amestecat cu o soluție apoasă de enzimă. Drept rezultat, sistemul se scindează în două faze și enzima rămâne în faza apoasă sau include doar concentrații mici ale speciilor organice nepolare.

b. Sisteme de reacție în solvenți organici, în care enzima este fie suspendată, fie solubilizată prin includere într-un miceliu invers sau prin creșterea caracterului hidrofob al proteinei enzimatică prin modificare chimică. Așadar aceste sisteme vor fi monofazice (omogene) sau bifazice lichid-solid.

c. Sisteme de reacție cu enzime imobilizate pe suporturi insolubile, care au fost testate atât în mediu apos cât și în mediu de solvenți organici, catalizatorul reprezentând în aceste cazuri întotdeauna o fază distinctă în amestecul de reacție. Aceste sisteme vor fi deci, după caz, bi- sau trifazice.

Este evident că stabilirea sistemului de reacție optim trebuie făcută pentru fiecare caz în parte, iar ingineria unor asemenea procese reprezintă o problemă extrem de complexă, care încă în multe situații constituie principalul obstacol în calea utilizării industriale a procedurilor biocatalitice.

Interesul pentru utilizarea enzimelor drept biocatalizatori a crescut foarte mult în ultimii ani. Reacțiile catalizate de enzime sunt foarte specifice iar reacțiile secundare sunt practic neglijabile. În cazul unor enzime care prezintă o specificitate de substrat foarte strictă, pot fi realizate reacții regio- și stereoselective. Reacțiile chimice obișnuite, pentru a putea fi realizate în mod eficient, necesită adeseori temperaturi sau presiuni înalte, în timp ce cu ajutorul enzimelor aceleași procese pot fi înfăptuite în condiții blânde. În afară de aceasta, utilizarea enzimelor este recomandată și din considerente toxicologice și de protecție a mediului, comparativ cu procesele chimice uzuale.

Lipaza este o enzimă care, conform clasificării adoptate pe baza recomandărilor Comisiei de Enzimologie a Uniunii Internaționale de Biochimie, face parte din clasa hidrolazelor, subclasa ester-hidrolazelor și sub-subclasa carboxil-ester-hidrolazelor, având denumirea sistemică triacilglicerol acil-hidrolază și codul E.C. 3.1.1.3. Ea are rolul biologic de a hidroliza legăturile esterice ale trigliceridelor. S-a demonstrat însă că lipazele pot îndeplini rol catalitic și într-o serie de alte reacții, cum ar fi esterificări, transesterificări, aminolize, bineînțeles în condiții de reacție corespunzătoare. Reacțiile catalizate de lipaze au o serie de perspective de aplicare industrială dincolo de hidroliza grăsimilor și uleiurilor la sinteza esterilor, modificarea grăsimilor și uleiurilor prin transesterificare, obținerea unor compuși optic activi și altele. Lipazele fac parte la ora actuală dintre enzimele a căror utilizare va putea revoluționa în următorii ani chimia și tehnologia organică.

Cercetările care fac obiectul prezentei teze se încadrează în tematica de cercetare abordată în ultimii 15 ani în cadrul Colectivului de Cataliză de la Institutul de Energetică Chimică și Biochimică, devenit din 1991 Laboratorul de Sinteze Organice Fine și Biotehnologii din cadrul Institutului de Științe Chimice și Tehnologice Timișoara, iar din anul 1996 Colectivul de Biocataliză de la Institutul de Electrochimie Timișoara. Acest colectiv, care a fost înființat de Prof. Dr. Radu Bacaloglu, a avut un rol de pionierat în domeniul biocatalizei în țara noastră. Cu toate deficiențele generate de lipsa unor metode moderne de investigare analitică și structurală atât de importante în acest domeniu, el a reușit să obțină rezultate notabile, cum ar fi realizarea primei tehnologii omologate pe bază de enzime din România.

Toate aceste cercetări au fost realizate cu ajutorul unui număr important de colaboratori de diverse specialități și doresc să fie doar un pas în direcția cunoașterii și utilizării extraordinarei capacități biocatalitice a enzimelor lipolitice.

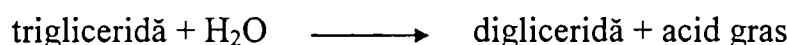
PARTEA I. Studiu documentar despre lipaze și reacții catalizate de lipaze

1. Obținerea, purificarea și caracterizarea lipazelor

Lipazele (E.C. 3.1.1.3) sunt enzime care fac parte din clasa hidrolazelor, având un rol important în metabolismul grăsimilor. Ele hidrolizează grăsimi și uleiuri cu formare de acizi grași liberi, gliceride parțiale și glicerină.

Trebuie arătat însă că există destule confuzii cu privire la semnificația exactă a termenilor de lipază și esterază, întrucât ambele hidrolizează legăturile esterice ale acizilor carboxilici. Confuzia provine și din faptul că mulți cercetători au utilizat enzime nepurificate care conțineau probabil și lipază și esterază, sau au folosit substraturi neemulsionate sau chiar solubile.

Conform nomenclaturii adoptate de Uniunea Internațională de Biochimie, lipaza catalizează reacția [1]:



Această definiție nu este completă din mai multe motive:

- reacția de hidroliză poate continua până la obținerea de monogliceride și chiar glicerină.

- nu ține cont de faptul că lipaza poate hidroliza și esteri ai acizilor carboxilici inferiori cu glicerina sau esteri ai acizilor grași cu alți alcooli.

Unii cercetători consideră că deosebirea esențială dintre lipaze și esteraze constă în starea fizică a substratului asupra căruia acționează. Astfel, esterazele pot hidroliza substraturi solubile sau dispersate total, iar lipazele nu. De aceea s-a propus de către Wills și Jensen să se definească lipazele drept enzime care hidrolizează esterii la o interfață de tip ulei-apă, într-un mediu insolubil sau eterogen.

Trebuie menționat și faptul că s-a demonstrat că lipazele pot îndeplini un rol catalitic într-o serie de alte reacții cum ar fi esterificări, transesterificări, aminolize, ceea ce poate fi de mare importanță practică, așa cum se va arăta mai departe.

După proveniența lor, lipazele se pot clasifica în [2]:

- lipaze de origine microbiană
- lipaze din plante
- lipaze din lapte
- lipaze pancreatice
- lipoprotein-lipaze
- lipaze hormon-senzitive

Dintre acestea, importanța pentru utilizarea drept biocatalizatori prezintă lipazele microbiene și pancreatice [309].

1.1. Obținerea lipazelor din culturi microbiene

Lipaze microbiene sunt produse de o serie de specii de bacterii, ciuperci (fungi) și drojdii. Cele mai importante microorganisme producătoare de lipază, împreună cu activitățile lipazice maxime obținute în mediile de cultură și condițiile de determinare a activității, sunt prezentate în tabelul 1.1 [3].

Tabelul 1.1. Surse de lipaze microbiene

Specia microbiană	Modalitatea de biosinteză	Activitatea (EU ^a /ml)	Condiții de determinare a activității ^c
A. Bacterii			
<i>Staphylococcus aureus</i>	flacoane agitate	4,5	37°C, pH 8,0
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	fermentator 2 l	500,0	37°C, pH 9,0
<i>Pseudomonas fragi</i>	fermentator 20 l	75,0	37°C, pH 9,0
<i>Alcaligenes species</i>	fermentator 15 l	800,0	37°C, pH 8,7
<i>Bacillus licheniformis</i>	flacoane agitate	6,0	45°C, pH 8,5
B. Drojdii			
<i>Candida cylindracea</i>	flacoane agitate	^b	30°C, pH 7,0
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	flacoane agitate	40,0	30°C, pH 9,5
<i>Candida lipolytica</i>	fermentator 2 l	1,0	37°C, pH 8,2
C. Fungi			
<i>Aspergillus luchnensis</i>	mediu solid	-	40°C, pH 7,0
<i>Aspergillus niger</i>	flacoane agitate	4,0	37°C, pH 6,5
<i>Rhizopus delemar</i>	submers	60,0	30°C, pH 5,6
<i>Rhizopus arrhizus</i>	fermentator 100 l	350,0	37°C, pH 7,5
<i>Rhizopus delemar</i>	fermentator de tip turn și fermentator 3 l	460,0	30°C, pH 8,5
<i>Geothricum candidum</i>	cultură lichidă statică	6,0	32°C, pH 8,5
<i>Geothricum candidum</i>	flacoane agitate	170,0	30°C, pH 5,6
<i>Mucor lipolyticus</i>	flacoane agitate	90,0	37°C, pH 8,0
<i>Humicola lanuginosa</i>	fermentator 600 l	55,0	45°C, pH 8,0
<i>Phycomyces species</i>	fermentator	160,0	37°C, pH 7,0
<i>Penicillium funiculosum</i>	flacoane agitate	^b	37°C, pH 8,0

^a1 EU = cantitatea de enzimă care determină eliberarea unui μmol acid gras pe minut în condiții date.

^bActivitatea enzimatică este exprimată în alte unități, care cu datele existente nu au putut fi convertite în EU.

^c Drept substrat pentru determinarea activității s-a utilizat în toate cazurile uleiul de măsline

Este un fenomen frecvent ca o singură tulpină să producă mai multe enzime, acestea putând avea origine genetică diferită sau fiind produse drept rezultat al modificării unei singure proteine. Astfel, Iwai și Tsujisaka au identificat trei lipaze (A, B și C) în filtratul unei culturi de *Rhizopus delemar* [4]. După purificarea acestor enzime ei au stabilit că lipazele B și C sunt forme diferite ale aceleiași proteine, în timp ce lipaza A este o proteină diferită.

În mod uzual, lipazele microbiene sunt enzime extracelulare. Lipazele extracelulare pot fi obținute din culturi tinere, de preferință în timpul fazei de creștere logaritmică a celulelor, fiindcă atunci sunt mai puțin afectate de liza celulelor. În cazul unor sisteme ce produc lipaze extracelulare, o mică parte a enzimei apare ca fiind legată de celulă. Anumiți cercetători au raportat existența și a unor lipaze intracelulare, cum ar fi cele produse de bacterii din speciile *Escherichia coli*, *Streptococcus thermophilus* și *Streptococcus lactis*

[5], drojdii din specia *Saccharomyces lipolytica* [6], sau fungi din specia *Rhizopus chinensis* [7].

Capacitatea de a produce lipaze pare a fi o proprietate a majorității bacteriilor, în condiții potrivite, cu toate că productivitatea variază considerabil, chiar în cadrul tulpinilor provenite de la aceeași specie de microorganism.

Parametrii care influențează biosinteza lipazei sunt în general cunoscuți, dar acțiunea lor nu este în mod obligatoriu aceeași.

Lipazele de origine fungică au fost obținute atât din culturi pe medii solide cât și din culturi submerse.

1.1.1. Culturi pe medii solide

Un procedeu de cultură pe mediu solid a fost descris încă în 1949 de către Smythe și Drake pentru lipaza din *Aspergillus luchensis*. Mai târziu, un grup de cercetători japonezi au obținut lipază din *Aspergillus niger* tot din culturi pe mediu solid, dar ulterior ei au considerat că alegerea tipului de cultură trebuie făcută în funcție de tulpina utilizată [3]. În general însă, numărul referințelor privitoare la obținerea de lipaze din culturi pe medii solide este scăzut.

Cercetători mexicani a studiat obținerea lipazei microbiene din culturi pe medii solide, utilizând tărâțe de grâu drept sursă de azot și carbon, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 și MgSO_4 ca săruri minerale [8]. Umiditatea inițială a sistemului a fost de 50%, iar temperatura culturii s-a menținut la 29°C. Dintre fungii filamentoși testați, rezultate bune s-au obținut cu *Mucor miehei*, *Penicillium camemberti* și *Penicillium candidum*. Efectuându-se un studiu comparativ față de culturile submerse, în cazul lipazei din *Penicillium candidum*, autorii consideră culturile pe mediu solid drept o alternativă viabilă pentru obținerea lipazelor microbiene.

1.1.2. Culturi submerse

Majoritatea cercetărilor au stabilit că lipazele se pot obține cel mai avantajos din culturi submerse aerate. În continuare vor fi analizate aceste tipuri de culturi, cu accent pe principalii parametri care influențează biosinteza: compoziția mediului de cultură, temperatura, pH-ul, aerarea mediului, faza de dezvoltare a celulelor.

1.1.2.1. Factori care influențează biosinteza lipazelor în culturi submerse

a. Influența compoziției mediului de cultură

Tipul și concentrația componentelor mediului de cultură pentru biosinteza lipazei diferă foarte mult de la o tulpină la alta și este susceptibilă unor optimizări ulterioare. Aceste medii conțin în general drept sursă de carbon un hidrat de carbon simplu sau complex, însă unele drojdii producătoare de lipază pot fi cultivate de asemenea pe uleiuri sau hidrocarburi. Producția de lipază în general nu depinde decât în mică măsură de natura hidratului de carbon utilizat.

O altă problemă importantă este natura sursei de azot și realizarea unui raport optim azot/carbon în mediul de cultură. Tsujisaka ș.a. au sugerat că lipazele fungice necesită în cursul fermentației concentrații de azot mai mari decât alte enzime [9].

O serie de surse au semnalat că lipaza se obține cel mai bine dacă microorganismul este crescut pe un mediu conținând peptonă. Anumite tipuri de peptone sunt mai puțin potrivite ca și constituenții ai mediului de cultură decât altele, cu toate că dezvoltarea microorganismului nu este afectată. Conform datelor de literatură, randamentul lipazei obținute a crescut considerabil dacă mediul a avut în compoziție hidrolizat de caseină, triptonă, polipeptonă, casitonă sau făină de soia [5].

În cazul lipazei din *Penicillium citrinum* sursa de carbon optimă s-a determinat a fi amidonul, în timp ce ca sursă de azot peptona în concentrație de 5% a dat cele mai bune rezultate, ureea și sulfatul de amoniu dovedindu-se ineficiente [9].

Rhizopus chinensis produce o lipază intracelulară dacă se folosește drept sursă de azot polipeptonă sau extractul de carne [7], iar *Rhizopus microsporus* produce randamentul maxim în lipază dacă mediul conține autolizat de drojdie 0,1% și drojdie furajeră 0,25% [10].

În cazul biosintezei lipazei din *Pseudomonas species*, cea mai potrivită sursă de azot s-a dovedit a fi ureea. Dacă pentru obținerea lipazei se folosește *Candida lipolytica*, rezultatele cercetărilor indică drept sursă de azot sulfatul de amoniu și ureea.

Un mare număr de cercetători au studiat obținerea lipazelor pe medii sintetice sau semisintetice, care conțin adaosuri de diferiți compuși chimici alături de, sau înlocuind mediile naturale [5].

Astfel, un studiu comparativ efectuat pe 41 de medii diferite a dus la formularea unui mediu sintetic pentru biosinteza lipazei din *Pseudomonas fungi* prin înlocuirea peptonei cu un amestec de arginină, lizină, acid aspartic și acid glutamic. S-au obținut randamente în lipază de aproape 90% față de cele obținute pe mediul cu peptonă. Alte cercetări au stabilit că adăugarea unor aminoacizi: leucină, izoleucină și valină determină creșterea producției de lipază din *Pseudomonas fragi*. Producția lipazei din *Pseudomonas aeruginosa* a fost stimulată prin introducerea de alanină în mediul de cultură [3].

Nadkarni a utilizat medii semisintetice conținând aminoacizi, glucoză și extract de drojdie, stabilind că arginina, acidul glutamic și triptofanul determină creșterea biosintezei lipazei, în timp ce prezența glucozei în mediu favorizează acumulara timpurie a lipazei și scurtează timpul de incubare necesar. Alți cercetători au stabilit pentru *Pseudomonas fluorescens* un mediu optim de cultură conținând polipeptonă, glucoză, uree și componente minerale.

Prezența în mediu a unor săruri anorganice duce de asemenea la creșterea randamentului biosintezei lipazei din *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Acinetobacter species* [5].

În ceea ce privește acțiunea vitaminelor asupra biosintezei lipazei, datele de literatură sunt contradictorii, unele menționând că adăugarea de vitamine nu a avut efect asupra producției de lipază, contrar celor afirmate de alți cercetători [5].

Bacterii Gram-negative din specia *Acinetobacter*, izolate din sedimentele din apă, produc o lipază extracelulară dacă sunt cultivate la 20°C pe un mediu complex conținând peptonă 2% și extract de drojdie 0,15%. Dacă s-a folosit un mediu de cultură constituit din amestec de aminoacizi sintetici sau hidrolizat de caseină împreună cu vitamine nu s-a înregistrat activitate lipazică. Totuși, dacă la aceste medii s-a adăugat taurocolat de sodiu, s-a obținut lipază, cel mai mare randament înregistrându-se dacă în sistem a fost prezent și un amestec de di- și polipeptide [11].

Prezența lipidelor în mediul de cultură poate induce, iar în alte cazuri poate inhiba producerea lipazei. Chander și alții au constatat că adăugarea de lipide în mediul de cultură pentru biosinteza lipazelor din *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium solani* și *Geothricum*

candidum inhibă creșterea microorganismelor și determină scăderea producției de lipază [5]. În ce privește lipaza din *Mucor mucedo*, s-a constatat că introducerea de lipide în mediul de cultură are un efect diferențiat. Dintre trigliceridele testate (în concentrație de 0,1 % raportat la mediul de bază), tributirina a determinat creșterea producției de lipază cu 66 %, în timp ce trigliceridele conținând acizi grași nesaturați cu catenă lungă (ulei de măsline, ulei de floarea-soarelui, ulei de muștar, etc.) au avut o acțiune ușor inhibitoare. Efectul inhibitor cel mai puternic l-a avut trioleina, care a cauzat o reducere cu 58 % a producției de lipază. Creșterea randamentului în lipază în prezența tributirinei a fost raportată și pentru *Penicillium roqueforti*, în timp ce prezența uleiului de porumb și a celui de măsline determină inhibarea acestuia cu 21, respectiv 29 % [12].

Drept medii de cultură pentru obținerea lipazelor au fost utilizate și anumite hidrocarburi. Astfel, o cultură de *Candida lipolytica* izolată dintr-o probă de sol îmbibată cu țiței s-a dovedit a fi capabilă de a produce lipază în condițiile cultivării pe un mediu conținând 4% cherozină drept sursă de carbon. Atât creșterea microorganismului cât și producerea enzimei au fost favorizate de adăugarea în mediu a 2 % ulei de măsline drept sursă adițională de carbon. Dintre sursele de azot utilizate, ureea s-a dovedit a fi ușor superioară sulfatului de amoniu [13].

Una din sursele cele mai importante de lipază pentru biotehnologii este *Aspergillus niger*, care are avantajul de a fi o specie nepatogenă și foarte bine caracterizată, fiind folosită pentru obținerea unui mare număr de enzime, chiar la scară industrială de exemplu în cazul amiloglucozidazei. Un studiu cuprinzător referitor la biosinteza lipazei din culturi submerse de *Aspergillus niger* a stabilit compoziția optimă a mediului de cultură, plecând de la un mediu de bază constituit din 0,1% NH_4NO_3 , 0,2 % KH_2PO_4 , 0,04% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 % zaharoză și 1 % ulei de măsline [14].

Efectul diferitelor surse de carbon asupra randamentului în lipază și al creșterii miceliului ciupercii este prezentat în tabelul 1.2.

S-a determinat că sursa optimă de carbon este zaharoza. Glucoza, maltoza și fructoza determină o creștere bună a miceliului, dar randamentul în lipază este mai scăzut în timp ce xiloza, rafinoza, citratul și acetatul de Na determină doar o slabă creștere a ciupercii, fără a se produce lipază. Concentrația optimă de zaharoză din mediul de cultură s-a determinat a fi de 1 %.

În tabelul 1.3 sunt prezentate rezultatele încercărilor cu diverse surse de azot de natură anorganică sau organică. Se poate observa că sursa de azot cea mai bună este azotatul de amoniu, concentrația ei optimă în mediul de cultură fiind 0,1 %.

Tabelul 1.2. Efectul sursei de carbon asupra randamentului în lipază și al creșterii miceliului de *Aspergillus niger* în cultură submersă [14].

Sursa de carbon (1 %)	Activitate lipazică (unități /5 ml mediu de cultură după 96 ore)	Greutatea miceliului uscat (g/l, după 96 h)
glucoză	9,2	13,0
maltoză	7,6	11,5
fructoză	8,2	11,0
amidon solubil	1,6	10,0
lactoză	7,8	8,6
zaharoză	22,2	13,4
xiloză	urme	4,0
rafinoză	urme	2,0
citrat de Na	urme	2,5
acetat de Na	urme	1,8

Tabelul 1.3. Efectul sursei de azot asupra randamentului în lipază și al creșterii miceliului de *Aspergillus niger* în culturi submerse [14].

Sursa de azot (0,1 %)	Activitate lipazică (unități /5 ml mediu de cultură după 96 de ore)	Greutatea miceliului uscat (g/l, după 96 h)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4,0	12,6
NH_4Cl	6,0	11,5
NH_4NO_3	22,0	13,0
NaNO_3	10,2	13,0
uree	4,0	12,0
peptonă	3,0	12,0
triptonă	3,2	6,0
acid aspartic	4,3	6,0
acid glutamic	5,1	6,6

În aceeași cultură a fost determinată și influența sărurilor minerale (tabelul 1.4.). În cazul acestei tulpini prezența ionilor Fe^{2+} și Mg^{2+} favorizează producerea lipazei. Concentrațiile optime determinate au fost 0,1 % pentru FeSO_4 și 0,04 % pentru MgSO_4 . Ionii de K^+ , Na^+ și Ca^{2+} nu influențează randamentul în enzimă.

Tabelul 1.4. Efectul sărurilor minerale asupra randamentului în lipază și al creșterii miceliului de *Aspergillus niger* în culturi submerse [14].

Sarea minerală	Activitate lipazică (unități /5 ml mediu de cultură după 96 de ore)	Greutatea miceliului uscat (g/l, după 96 h)
KCl	2,9	3,5
NaCl	3,1	4,0
K ₂ SO ₄	3,2	4,2
Na ₂ SO ₄	3,0	4,5
CaCl ₂	3,5	3,9
MgSO ₄	5,6	10,5
MgCl ₂	4,5	8,2
FeSO ₄	7,2	6,5
Mediu de control*	3,0	3,8

* Conținând zaharoză, ulei de măsline, (NH₄)₂HPO₄ și acetat de amoniu.

Necesitatea utilizării unei surse de fosfat în mediul de cultură nu este menționată decât rareori în cazurile citate din literatura de specialitate, fiind indicat fosfatul de amoniu monoacid. În cazul acestei tulpini de *Aspergillus niger* însă prezența KH₂PO₄ în concentrație de 0,2 % duce la obținerea de randamente mai bune decât cele obținute cu (NH₄)₂HPO₄ [14].

Un caz mai special l-a constituit încercarea unor cercetători japonezi de a obține o lipază microbiană care să aibă proprietățile caracteristice lipazei pancreatice. Sursa căutată s-a dovedit a fi o bacterie Gram negativă din specia *Alcaligenes* [15]. Sursa de carbon optimă pentru cultura acesteia a fost fructoza (în concentrație de 1,25 %), iar ca sursă de azot cele mai bune rezultate le-a dat NaNO₃ (în concentrație de 0,75 %). De asemenea, s-a stabilit că prezența în mediu a unor agenți activi de suprafață favorizează producerea lipazei, cel mai eficient dovedindu-se polioxietilen-stearil-eterul în concentrație de 0,5 %. Dintre sărurile minerale, FeSO₄ și FeCl₃ au favorizat biosinteza enzimei, în timp ce CoCl₂ a avut o puternică acțiune inhibitoare [16].

b. Influența temperaturii

În afară de compoziția mediului de cultură, producerea lipazei este influențată de o serie de alți factori, în primul rând parametrii fizico-chimici care caracterizează cultura.

Temperatura optimă pentru biosinteza lipazei diferă de la o specie la alta. Astfel, pentru specia *Pseudomonas* temperatura optimă se situează în general în domeniul 20-30°C. Totuși, pentru *Pseudomonas mephitica* var. *lipolytica* producția maximă de lipază s-a observat la 37°C, în timp ce pentru *Pseudomonas fragi* randamentul maxim în lipază s-a obținut menținând cultura timp de 3 zile la 15°C, la 30°C neobservându-se activitate lipazică [5]. În cazul culturilor de *Geothricum candidum* și *Rhizopus nigricans* randamentele maxime în lipază s-au înregistrat la 30°C, iar la *Penicillium roqueforti* temperatura optimă a fost de 27°C [5].

Obținerea lipazei din *Aspergillus niger* a avut loc cu randament maxim la 35°C, [14]. În cazul lipazei din *Mucor mucedo*, randamentul optim s-a obținut prin menținerea culturii timp de 3 zile la 30°C [12], în timp ce în cazul unei tulpini de *Penicillium citrinum* temperatura optimă de incubare a fost 22°C [9].

c. Influența pH-ului

pH-ul inițial al mediului de cultură reprezintă de asemenea un parametru important pentru producerea de lipază. Pentru o serie de microorganisme producătoare de lipază: *Pseudomonas fragi*, *Rhizopus arrhizus*, *Achromobacter lipolyticum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, sunt indicate valori inițiale neutre ale pH-ului mediului [5]. Pentru *Acinetobacter species*, la valoarea pH-ului de 6,6 se obține randament maxim în lipază, însă dacă valoarea pH-ului scade la 6,0, producerea lipazei este inhibată [11].

În cazul biosintezei lipazei din *Penicillium citrinum* randament bun în lipază s-a obținut doar la pH neutru (pH optim 7,2), activitatea lipazică în mediu scăzând de 8-10 ori chiar la modificări relativ mici ale pH-ului, la 6 și respectiv 8 [9].

Randamentul maxim în lipază pentru culturile de *Mucor mucedo* s-a obținut la pH 7, ca și pentru *Penicillium camemberti*, în timp ce datele furnizate pentru *Rhizopus nigricans* indică un pH optim de 6 [12].

În cazul culturilor submerse de *Aspergillus niger*, activitatea lipazică cea mai mare în mediu s-a obținut de asemenea la pH neutru [14].

La obținerea lipazei alcaline din culturi de *Alcaligenes species* pH-ul final al mediului de cultură se situează în domeniul bazic, între 8,0-8,7 [16].

d. Influența aerării

Cercetările au evidențiat creșterea producerii de lipază în cazul culturilor aerate pentru majoritatea microorganismelor producătoare de lipază, însă gradul de aerare necesar pare să difere de la o specie la alta. Chander și alții au constatat accelerarea dezvoltării celulelor și a producerii de lipază în culturi agitate de *Penicillium species*, *Rhizopus species* și *Geothricum species*. Alți cercetători au constatat același lucru pentru *Penicillium roqueforti* și *Pseudomonas mephitica* var. *lipolytica* [5].

În cazul lipazei din *Mucor mucedo* activitatea lipazei pentru culturi în flacoane agitate a fost mai mare cu 40 % decât în cazul flacoanelor neagitate [12].

Efectul aerării nu este însă întotdeauna pozitiv asupra producției de lipază. S-a constatat de exemplu că în cazul culturilor de *Pseudomonas fragi*, aerarea intensă determină reducerea activității lipazice. În cazul microorganismelor *Candida lipolytica*, *Pseudomonas fragi* și *Pseudomonas fluorescens* s-a observat că utilizând culturi agitate se obține o creștere mai pronunțată a celulelor și în faza inițială o creștere a producției de lipază, urmată însă de o scădere rapidă a activității lipazice în cazul continuării agitării [5].

Un studiu efectuat asupra influenței concentrației de oxigen asupra producției de lipază din culturi de *Rhizopus delemar* a arătat că concentrații scăzute de oxigen afectează negativ metabolismul acestuia. Utilizând un reactor cu amestecare totală s-a constatat că producția de lipază depinde foarte mult de concentrația de oxigen la valori scăzute ale acesteia. La reducerea concentrației de oxigen la valoarea de 47 $\mu\text{moli/l}$ se înregistrează nu numai o scădere bruscă a cantității de lipază, ci și o modificare a metabolismului, substratul limitativ devenind oxigenul în locul carbonului [17].

e. Influența fazei de dezvoltare a celulelor

Un alt factor important este relația dintre creșterea celulei și formarea lipazei în timpul cultivării microorganismelor. Majoritatea cercetărilor au demonstrat că cea mai mare cantitate de lipază se produce în timpul fazei logaritmice de creștere, de exemplu în cazul microorganismelor *Acinetobacter species*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudomonas fragi* și *Pseudomonas aeruginosa* [5].

Pentru culturile de *Acinetobacter calcoaceticus* activitatea lipazică a fost maximă în timpul fazei logaritmice, după 19 ore de incubare, ea scăzând drastic în timpul fazei staționare, la doar 23 % din valoarea precedentă după 24 de ore [18].

Unii cercetători au arătat însă că în anumite cazuri eliberarea lipazei în mediul de cultură începe la sfârșitul fazei logaritmice de creștere și acumularea enzimei are loc în timpul fazei staționare. Astfel în cazul culturilor de *Pseudomonas fluorescens*, activitate lipazică în mediu s-a detectat doar după 4-5 zile de incubare. *Chromobacterium viscosum* a produs lipază după 3 zile, iar *Staphylococcus aureus* după 4-5 zile [5].

1.1.2.2. Condiții de biosinteză pentru lipaze microbiene comerciale

În prezent o serie de lipaze microbiene sunt oferite de diverse firme producătoare, sursele cele mai importante fiind *Rhizopus arrhizus* și *Aspergillus niger*. Sunt de asemenea accesibile și preparate din *Geothricum candidum*, *Candida cylindracea* și *Mucor miehei*. Cu toate acestea, datele existente despre biosinteza lipazelor la o scară mai mare decât cea de laborator sunt foarte puține.

Laboureur și Labrousse au realizat biosinteza lipazei din culturi de *Rhizopus arrhizus* într-un fermentator de 100 l, utilizând un fermentator pentru inocul de 3 l și obținând o activitate lipazică de 350 EU/ml în condițiile redată în tabelul 1.5 [3].

Ținând cont de potențialele utilizării ale lipazelor în industrie drept catalizatori de transesterificare cât și în detergenți casnici, cercetătorii firmei Novo au inițiat obținerea unei lipaze la un cost mai redus decât cele accesibile pe piață în acest moment. Se pare că utilizarea unei tehnologii de ADN recombinat este foarte importantă în realizarea acestui scop. S-a plecat de la *Rhizomucor miehei*, care secretă o lipază activă și care a fost caracterizată anterior. Prin tehnici de inginerie genetică s-a reușit folosirea de *Aspergillus oryzae* drept organism gazdă pentru sintetizarea, producerea și secreția în mediul de cultură a lipazei de *Rhizomucor miehei* recombinată [19].

Tabelul 1.5. Condiții de biosinteză pentru lipaza din *Rhizopus arrhizus* [3].

Componenta mediului	Concentrații (g/l)
a. Etapa de flacoane agitate (50 ml mediu în flacoane de 150 ml): 30°C, 18-24 h	
Amidon fluidificat cu α -amilază	40,0
Porumb lichefiat	50,0
Sulfat de amoniu	10,0
Carbonat de calciu	15,0

Componența mediului	Concentrații (g/l)
b. Prima etapă de fermentație (3 l): 29°C, 22-26 h Amidon fluidificat cu α -amilază Hidrolizat de caseină Sulfat de amoniu Carbonat de calciu pH-ul inițial ajustat la 7,0 cu H ₂ SO ₄ Ulei antispumant	20,0 5,5 5,0 10,0
c. Fermentația principală Condițiile identice de la etapa precedentă Se continuă până la valoarea staționară a activității, după 40 - 45 h pH-ul scade ușor până la o valoare staționară în jur de 6,5.	

1.1.3. Purificarea și caracterizarea lipazelor microbiene

Marea majoritate a enzimelor obținute prin izolare din țesuturi vegetale sau animale sau din culturi microbiene trebuie purificate până la eliminarea enzimelor care pot cataliza reacții secundare nedorite. Aceasta poate sau nu să însemne purificare până la omogenitate.

În cazul enzimelor extracelulare, cum sunt majoritatea lipazelor microbiene, care sunt secretate în mediul de cultură, după terminarea fermentației microorganismele se separă de mediu prin centrifugare sau filtrare. Soluția rezultată poate fi uneori concentrată pentru a nu se manipula volume prea mari. Pentru aceasta se pot folosi membrane de ultrafiltrare [20].

Următoarea etapă este separarea diferitelor tipuri de proteine prin precipitare fracționată. Se știe că distribuția resturilor hidrofobe și hidrofile la suprafața moleculei de proteină influențează puternic solubilitatea ei în diferiți solvenți. Capacitatea de solvatare a diferitelor proteine de către apă poate fi modificată în sensul reducerii solubilității prin schimbări de pH, tărnie ionică, adăugare de solvenți organici miscibili cu apa, de alte substanțe dizolvate inerte sau polimeri, sau prin combinarea acestor metode, împreună cu modificarea temperaturii.

Principalele tehnici de purificare utilizate în cazul lipazelor sunt [20]:

- precipitarea selectivă cu ajutorul sărurilor neutre;
- precipitarea fracționată cu ajutorul solvenților organici miscibili cu apa, cum ar fi etanolul sau acetona;
- gel-filtrarea sau cromatografia prin excluziune sterică;
- cromatografia de interacțiune hidrofobă;
- cromatografia de afinitate.

Există și tehnici mai speciale de purificare a enzimelor cum ar fi cromatografia pe hidroxiapatită, focusarea izoelectrică, electroforeza preparativă și cromatografia de lichide de înaltă performanță preparativă. Acestea s-au dezvoltat în ultima perioadă, fiind tehnici de înaltă rezoluție care permit o separare și purificare foarte avansată a biomoleculelor [20].

O problemă foarte importantă care apare în cursul purificării enzimelor este pierderea de activitate. Enzimele sunt molecule proteice sensibile care dacă sunt scoase din mediul lor natural sunt supuse la o serie de factori perturbatori cărora adeseori nu sunt

capabile să le reziste. Enzimele extracelulare reprezintă un caz fericit, întrucât ele sunt destinate din start să opereze într-un mediu mai ostil. De aceea și purificarea lor se poate face cu șanse de reușită mai mari.

Principalii factori care pot determina dezactivarea enzimelor în cursul operațiilor de purificare sunt [20]:

-denaturarea proteinei enzimaticе, care poate avea loc sub influența temperaturii, pH-ului sau a solvenților organici. Din acest motiv purificarea trebuie făcută la o valoare de pH corespunzător aleasă (în general în domeniul 6-7) și sub răcire, iar precipitarea cu solvenți organici trebuie făcută întotdeauna sub răcire, chiar la temperaturi sub 0°C.

- concentrația prea scăzută a proteinei, întrucât se cunoaște că soluțiile diluate de enzime își pierd repede activitatea. Pentru a preveni această dezactivare este indicată fie concentrarea soluțiilor foarte diluate, fie adăugarea unei proteine inerte, cum este albumina (BSA).

- inactivarea centrului catalitic, care poate fi reversibilă sau ireversibilă. O cauză poate fi de exemplu oxidarea grupelor sulfhidril cu formare de punți disulfidice sau acizi sulfonici (-SOH, reversibil) sau sulfonici (-SOOH, ireversibil). Pentru a preveni această oxidare se recomandă adăugarea de β-mercaptoetanol sau ditiotritol.

- degradarea produsă de proteazele prezente în mediu. Acest lucru poate fi împiedicat prin introducerea în sistem a unor inhibitori ai proteazelor cum ar fi fenilmetil-sulfonil-fluorură sau pepstatină A.

Pentru stabilizarea soluțiilor enzimaticе, în afară de sulfatul de amoniu pot fi utilizați și alți compuși cum ar fi glicerina, care are și avantajul că permite conservarea la temperaturi sub 0°C, fără a îngheța. În locul glicerinei se pot folosi și zaharide sau alcoolii proveniți din reducerea acestora (glucoză, fructoză, lactoză, sorbitol).

Elaborarea unei scheme de purificare a unei enzime trebuie să țină cont de următoarele necesități:

- randament cât mai bun de recuperare a activității totale
- puritate cât mai ridicată a produsului
- reproductibilitatea procesului
- economicitatea utilizării reactivilor și echipamentelor.

Pentru purificarea lipazelor microbiene au fost încercate o serie dintre metodele descrise anterior, cu scopul de a obține preparate enzimaticе cu caracteristici reproductibile, care să fie susceptibile unei utilizări tehnologice sistematice.

O investigație calitativă a enzimelor prezente într-un preparat comercial tehnic de lipază din *Aspergillus niger*, conținând 55 % proteină, a evidențiat alături de lipază prezența și a următoarelor enzime: esterază, protează, amilază, endo-1,4-β-glucanază, xilanază, pectinmetilesterază, poligalacturonază, catalază, β-D-glucozidază și β-D-galactozidază [21]. Pentru purificare, soluția enzimei brute rezultată după ultrafiltrare s-a supus cromatografiei de schimb ionic pe DEAE-Trisacril M. Frațiunile cu activitate lipazică s-au concentrat prin ultrafiltrare și s-au purificat în continuare prin gel-filtrare pe Sephadex 650. În urma acesteia s-au obținut două izoenzime, notate lipază I și lipază II, constatându-se dispariția activității glucozidazice și galactozidazice. Eliminarea impurităților rămase s-a făcut prin cromatografie hidrofobă pe Phenylsepharose CL-4B și recromatografiere pe același gel în condiții diferite. După această purificare s-a constatat, prin focusare izoelectrică, obținerea unor lipaze omogene. Rezultatele acestor procedee de purificare sunt prezentate în tabelul 1.6, observându-se un factor de purificare final de 68 pentru lipaza I și de 13 pentru lipaza II.

Tabelul 1.6. Purificarea enzimei tehnice din *Aspergillus niger* [21].

Etapa de purificare	Volum (ml)	Proteine		Activitate lipazică ^a		Factor de purificare	Randament (%)
		mg/ml	mg total	U/ml	U/mg prot.		
Enzimă brută (4 g dizolvate în 100 ml sol.tampon Tris/HCl, 0,06 M, pH = 7,0)	100	22,0	2200	108,0	4,9	1,0	100
Centrifugare, ultrafiltrare	40	30,0	1200	177,0	5,9	1,2	66
DEAE - Trisacril M	310	1,4	434	25,0	17,8	3,6	78
Ultrafiltrare	8	36,6	293	270,0	21,3	4,3	58
Sephadex G 50							
Lipază I	12	6,4	76,8	240,0	37,5	7,6	27
Lipază II	10	6,1	61,0	90,0	14,7	3,0	8
Phenylsepharose CL-4B							
Lipază I, prima trecere	15	0,36	59,4	110,8	307,8	62,8	15
Recromatografiere	4	0,39	42,1	129,4	331,7	67,7	5
Lipază II, prima trecere	15	0,65	9,8	32,0	49,2	10,0	5
Recromatografiere	22	0,40	8,8	26,3	65,8	13,4	5

^a Determinarea activității s-a făcut utilizând drept substrat tributirina, la 30°C și pH 6,0.

Lipazele I și II au puncte izoelectrice diferite, la 4,0 și respectiv 3,5. Masele moleculare determinate prin gel-filtrare au fost 31.000 și respectiv 19.000 daltoni, iar pH-ul optim s-a situat pentru ambele lipaze între 5 și 6, ele rămânând însă active și la pH între 7 și 8.

Iwai și Tsujisaka au studiat purificarea lipazei din *Rhizopus delemar*, constatând existența a trei izoenzime [4]. Mediul de cultură s-a filtrat iar filtratul s-a adus la pH 4,5 cu HCl 1N și s-a lăsat să stea timp de 30 de minute la 30°C. Pe urmă s-a centrifugat, denumindu-se enzima aflată în precipitat lipază B, iar celelalte două izoenzime, prezente în supernatant, lipază A și respectiv C. Plecându-se de la filtratul culturii inițiale cu activitatea de 3,3 U/mg proteină, după operațiile de purificare s-au obținut:

- lipaza A cu activitatea de 2.333 U/mg proteină cu un randament de regăsire a activității totale de 2 %;
- lipaza C cu activitatea de 11.666 U/mg proteină cu un randament de regăsire a activității totale de 12 %;
- lipaza B cu activitatea de 4.000 U/mg proteină cu un randament de regăsire a activității totale de 4,3 %.

Toate trei izoenzimele din *Rhizopus delemar* au pH-ul optim la 5,6, temperatura optimă fiind în cazul lipazei A de 30°C iar în cazul lipazei B și C de 35°C. S-a ajuns la concluzia că lipaza A reprezintă o proteină diferită de lipazele B și C, având termostabilitate mai mare și stabilitate la pH în limite mai largi.

Aisaka și Terada au constatat că *Rhizopus japonicus* produce extracelular o cantitate mare de lipază și lipoprotein-lipază [22]. Din filtratul mediului de cultură enzima brută s-a precipitat cu sulfat de amoniu până la 60 % saturație și s-a purificat după procedura următoare (toate operațiile efectuându-se la o temperatură sub 5°C): precipitare cu etanol rece (-15°C) până la o concentrație de 80 %, cromatografie pe coloană mai întâi pe Column-lite, apoi pe Heparin-Sephadex 4B și în sfârșit focusare izoelectrică. S-au obținut două fracțiuni de lipază, factorul de purificare fiind de aproximativ 60, iar randamentul total de regăsire a activității enzimatică (în ambele fracțiuni) de 24 %. Masa moleculară a ambelor izoenzime s-a determinat a fi 42.000, iar activitatea lor maximă s-a înregistrat la 35-40°C și un pH între 7,0-8,5.

Tsujisaka ș.a. au purificat lipaza din *Geothricum candidum* până la o formă cristalizată [50]. Filtratul culturii s-a fracționat cu sulfat de amoniu (de la 25 % la 75 % saturație), precipitatul s-a dizolvat în apă deionizată și s-a desalefiat pe o coloană cu Sephadex G-25, iar soluția rezultată s-a purificat prin cromatografie pe o coloană cu DEAE Sephadex, eluându-se cu un gradient liniar de NaCl. Frațiunea cu activitate lipazică s-a concentrat și s-a trecut peste o coloană cu Sephadex G-100. Frațiunile active s-au dializat față de apă și s-au liofilizat. Pulberea liofilizată s-a dizolvat în soluție tampon acetat 0,01 M de pH 5,0 și s-a trecut peste o coloană cu Sephadex G-200. S-a obținut un singur pic de activitate. Frațiunile cu activitate mai mare de 1.000 unități/ml s-au reunit și s-au dializat față de apă distilată. În continuare, soluția obținută s-a concentrat sub presiune redusă. Cristalele au apărut când concentrația proteinei a ajuns în jur de 10 %. Cristalizarea s-a completat lăsând să stea soluția la 8°C sub presiune scăzută timp de 3 zile. Enzima cristalizată s-a separat prin centrifugare și s-a recristalizat prin dizolvare în soluție NaOH 0,1 N la pH 8,8, aducerea pH-ului la 6,0 cu CH₃COOH, eliminarea substanțelor insolubile prin centrifugare, dializă față de apă și cristalizare în aceeași manieră ca anterior. S-a obținut o creștere de 40 de ori a activității față de soluția inițială și un randament de regăsire a activității de 20% față de cea inițială. Prin electroforeză s-a determinat că enzima este omogenă. Masa moleculară s-a determinat a fi între 53.000-55.000, punctul izoelectric la pH 4,3, domeniul optim de pH între 5,6 și 7,0, iar temperatura optimă în jur de 40°C.

Cercetări de inginerie genetică efectuate ulterior de același colectiv au dus la concluzia că lipaza izolată din *Geothricum candidum* conține de fapt două izoenzime [23]. Pentru a le separa s-a purificat mai departe enzima obținută anterior, prin cromatografie de interacțiune hidrofobă. După eluarea cu un gradient descrescător de la 25 % la 0 % saturație de sulfat de amoniu, s-au obținut cele două izoenzime. Prima fracțiune, lipaza I, se obține în cantitate de 8 ori mai mare decât cea de-a doua, lipaza II. Ambele au aproape aceeași activitate, același punct izoelectric și temperatură optimă, dar diferă puțin masa moleculară (64.000, respectiv 66.000), pH-ul optim (8,0 și respectiv 6,0) și stabilitatea termică, lipaza I fiind mai stabilă. De asemenea s-a stabilit că secvențele de aminoacizi terminali sunt diferite, existând deci diferențe atât în ce privește structura primară, cât și cea terțiară a celor două izoenzime. Ulterior s-a stabilit că ambele lipaze sunt constituite din 544 resturi de aminoacizi, din care 457 (deci 84 %) sunt identice [24].

Un preparat comercial brut de lipază din *Geothricum candidum* a fost purificat de Baillargeon prin cromatografie de interacțiune hidrofobă pe Octyl Sepharose [25]. După această operație s-au obținut două picuri de activitate, corespunzătoare la două lipaze, în concordanță cu cele arătate anterior. În continuare, s-a utilizat tehnica cromatofocusării pentru a separa eventualele componente ale celor două lipaze. S-a găsit că prima lipază conține 5 izoenzime, iar cea de-a doua 4. Numărul izoenzimelor s-a redus la două după eliminarea hidraților de carbon. Se pare că aceste două izoenzime sunt proteine diferite, provenind din gene diferite.

Lipaza din *Penicillium cyclopium* a fost purificată prin precipitare cu sulfat de amoniu până la saturație de 75 %, desalefiere pe o coloană cu Sephadex G-25 și cromatografie de schimb ionic pe o coloană cu DEAE Sephadex A-50, obținând două picuri de activitate, corespunzătoare la două izoenzime. Cea de-a doua enzimă, mult mai activă, s-a purificat prin ultrafiltrare, gel-filtrare pe o coloană cu Sephadex G-75 și focusare izoelectrică, obținând o enzimă omogenă. Rezultatele purificării indică o creștere a activității specifice de 54 de ori și un randament de recuperare a activității enzimatică totale de 15,4 %. Această lipază s-a dovedit a fi o glicerid-hidrolază parțială, fiind nespecifică în raport cu poziția grupării esterice a gliceridei. De asemenea hidrolizează esteri metilici ai acizilor grași cu catenă medie, însă vitezele acestor reacții sunt foarte mici. Temperatura optimă pentru activitatea enzimei este 40°C, iar pH-ul optim 6,0 [26].

Dintre lipazele obținute din culturi de drojdii, cele mai importante sunt cele din genul *Candida*. Studiind un preparat comercial de lipază din *Candida cylindracea*, Brahimi-Horn ș.a. au constatat că el conține mai multe esteraze, având încărcare ionică și hidrofobicitate puțin diferită [27]. Pentru purificare, preparatul brut de lipază s-a suspendat în soluție tampon Tris/HCl 0,01 M, de pH 7,4, s-a dializat față de aceeași soluție și s-a purificat prin cromatografie de schimb ionic pe DEAE-cellulose. Eluarea s-a făcut cu un gradient liniar 0 → 0,5 M NaCl, apoi cu NaCl 1M. S-au obținut două picuri de activitate, ambele prezentând atât activitate esterazică (față de p-nitrofenilacetat) cât și lipazică (față de tributirină), raportul celor două activități fiind de două ori mai mare în primul pic. Electroforeza pe gel de poliacrilamidă a arătat că fiecare din aceste două fracțiuni are aceleași șase componente, în cantități diferite, ceea ce demonstrează că multiplicitatea esterazelor este o caracteristică a acestui preparat. În continuare, fracțiunile rezultate din cromatografia de schimb ionic s-au supus cromatografiei de interacțiune hidrofobă. S-au obținut: un singur pic de activitate pentru prima fracțiune, respectiv trei picuri pentru cea de-a doua fracțiune. Aceste rezultate arată că preparatele comerciale reprezintă de fapt un amestec de enzime cu specificități de substrat diferite.

De altfel, în preparatul comercial de *Candida cylindracea* s-a pus în evidență și o esterază specifică pentru ceruri (E.C. 3.1.1.50.) [28]. Adoga și Matthey au constatat că în

culturi de *Candida lipolytica*, utilizând sirop de porumb 2,5 % ca sursă de carbon, se produce alături de lipază și o esterază extracelulară ce manifestă activitate maximă față de tributirină. Această enzimă se poate purifica prin precipitarea mediilor de cultură cu sulfat de amoniu la saturație de peste 40 %, urmată de fracționare prin gel-filtrare pe Sephadex G-100. Ea are o masă moleculară medie de 5.000, temperatură optimă de 28-30°C și un pH optim foarte scăzut, în jur de 1,0 [51]

Shaw ș.a. au determinat prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă într-un preparat comercial de *Candida rugosa* trei izoenzime ale lipazei, numite A, B și C. Purificarea preparatului brut s-a făcut prin cromatografie de schimb ionic pe o coloană cu DEAE-Sepharose CL-6B, separându-se lipaza A de lipazele B și C care eluează împreună. Pentru lipazele A și C s-au determinat temperaturile optime (52°C, respectiv 37°C) și pH-ul optim (7,0, respectiv 5,0) [29].

O altă drojdie producătoare de lipază este *Saccharomyces lipolytica*, dar majoritatea acestei lipaze este legată în peretele celulei și are proprietăți diferite față de lipaza produsă extracelular [6]. Lipaza legată de celulă s-a solubilizat fără liza peretelui celular prin incubare timp de 2 ore la 30°C cu un mediu conținând 0,1 % Emulgen 950, 0,6 % KH_2PO_4 , 0,2 % K_2HPO_4 și 0,1 % KCl (pH 6,2). După filtrarea celulelor, enzima s-a precipitat cu sulfat de amoniu până la saturație de 85 %, s-a filtrat și s-a dializat față de soluție tampon acetat de pH 5,0. Soluția rezultată s-a trecut peste o coloană cu CM-Sepharose CL-6B, separându-se două izoenzime, lipaza I și lipaza II. Lipaza I, după dializă și ultrafiltrare s-a trecut peste o coloană cu Sephadex G-100, iar lipaza II, după dializă, s-a purificat prin trecere pe o coloană cu DEAE - Sepharose CL-6B, ultrafiltrare și gel-filtrare pe o coloană cu Sephadex G-100, de două ori. Factorul de purificare a fost 69 în cazul lipazei I și 58 în cazul lipazei II, iar randamentul de recuperare a activității a fost de 8 % în total. Ambele lipaze s-au dovedit a fi omogene prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă. Masele moleculare determinate au fost 39.000 și respectiv 44.000.

Lipazele bacteriene se pot purifica utilizând aceleași tehnici. Astfel, lipaza-esteraza din *Lactobacillus casei* a fost purificată de 54 de ori prin cromatografie de schimb ionic și gel-filtrare. Activitatea maximă s-a înregistrat la 37°C și pH 7,2 [30].

Lipaza din *Pseudomonas fluorescens* s-a purificat prin ultrafiltrare, liofilizare și cromatografie de schimb ionic pe o coloană cu DEAE-cellulose, realizând un factor de purificare de 23,6 și un randament de recuperare a activității enzimatică de 12 %. Se consideră că această lipază prezintă o deosebită stabilitate termică și chimică [31].

Lipaza din *Acinetobacter species* s-a purificat prin precipitare cu sulfat de amoniu până la saturație de 50 %, dializă față de apă distilată și gel-filtrare pe o coloană cu Sephadex G-200, obținându-se două picuri de activitate. Frațiunea ce conține majoritatea activității lipazice s-a purificat în continuare prin trecere peste o coloană cu DEAE-Sephadex, obținându-se un factor de purificare de 250, cu o recuperare a activității totale de numai 2,3 %. Temperatura optimă a enzimei a fost între 30-33°C, iar pH-ul optim s-a situat între 8,25 și 8,50. Trebuie menționat însă că stabilitatea termică a lipazei purificate este mai scăzută decât a celei inițiale [32].

Lipaza din *Staphylococcus aureus* s-a purificat din filtratul de cultură prin precipitare cu sulfat de amoniu până la 70 % saturație, dializă, cromatografie pe o coloană cu hidroxilapatită, ultrafiltrare, gel-filtrare pe Sephadex G-200 superfin și gel-filtrare pe Sephadex G-150 superfin. S-a obținut o singură fracțiune de lipază, cu un factor de purificare de 385 și un randament de recuperare a activității totale de 25 % în raport cu filtratul culturii inițiale. Masa moleculară, determinată prin gel-filtrare, este 34.000, punctul izoelectric la pH 9,7, iar temperatura optimă s-a determinat a fi 60°C pentru

hidroliza trioleinei. Lipaza obținută nu prezintă specificitate pentru pozițiile 1 și 3 ale trigliceridelor, hidrolizând tot așa de bine și 2-monooleina [33].

Lipaza intracelulară din *Streptococcus thermophilus* a fost eliberată prin acțiunea presiunii asupra celulelor congelate, urmată de fracționare prin centrifugare la 48.000 g timp de 10 minute. Temperatura și pH-ul optim ale acestei enzime sunt 45°C, respectiv 9,0. S-a demonstrat că activitatea ei este mai mare față de tributirină decât față de trigliceridele cu catenă lungă ca uleiul de măsline, uleiul de soia sau uleiul din germeni de porumb [34]

Din datele care au fost prezentate se poate trage concluzia că lipazele microbiene pot fi purificate până la omogenitate, utilizând tehnici de precipitare fracționată și cromatografice. Dintre procedeele cromatografice cele mai utilizate sunt cromatografia pe gel, cromatografia de schimb ionic și cromatografia de interacțiune hidrofobă, în general fiind preferată o combinație a acestora pentru a realiza purificări avansate. În acest mod s-au obținut grade de purificare de la câteva zeci la câteva sute, dar trebuie menționat că nu se poate evita denaturarea unei părți din enzimă, ceea ce se reflectă prin randamente de regăsire a activității enzimatică totale în general sub 10 %. Majoritatea preparatelor enzimatică comerciale de origine microbială sunt de proveniență fungică, de aceea și metodele de purificare sunt mai bine puse la punct în cazul acestora.

1.2. Obținerea, purificarea și caracterizarea lipazelor pancreatice

Cu toate că o serie de organe și țesuturi animale conțin lipaze, importanța cea mai mare o prezintă lipazele pancreatice. Cea mai studiată este lipaza din pancreas de porc, atât datorită concentrației sale ridicate (2,5 % din totalul proteinelor prezente în suc pancreatic), cât și randamentului bun cu care poate fi izolată [1].

Conținutul în lipază pancreatică pentru diferite specii de animale, prezentat în tabelul 1.7, arată diferențe de până la 10 ori în ce privește activitatea (exprimată în μ moli acid gras eliberat într-un minut) raportată la 1 g pancreas proaspăt [35].

Tabelul 1.7. Conținutul de lipază pancreatică în glandele pancreatice ale diferitelor specii de animale.

Specia	Activitatea lipazică (unități/ g pancreas proaspăt)
Porc	13.000
Pui	9.000
Iepure	4.700
Cal	4.300
Bou	2.800
Oaie	1.750

Este deci evident că cea mai avantajoasă metodă pentru obținerea de lipază pancreatică este izolarea și purificarea ei din pancreas de porc. Trebuie arătat că pancreasul conține și alte enzime, cum ar fi: monoglicerid-lipază, carboxilesterază, colesterol-esterază, care de asemenea catalizează hidroliza di- și trigliceridelor, dar sunt diferite de triglicerid-lipaza care ne interesează. Ele sunt în general mai puțin specifice în privința esterilor primari în raport cu cei secundari, au randamente scăzute de recuperare și utilizează de preferință substraturi solubile [36]. S-a constatat că într-un preparat proaspăt de pancreas,

obținut prin extracția pancreasului măcinat cu soluție tampon Tris/HCl 0,05 M de pH 8,0 și centrifugare, activitatea lipazică a fost de 2,7 ori mai mare decât cea esterazică [37].

Procedeul inițial pentru izolarea, purificarea și caracterizarea lipazei din pancreas de porc, elaborat de Desnuelle ș.a. în 1957, cuprindea obținerea unei pudre acetonice, precipitarea fracționată cu sulfat de amoniu, acetonă și alcool și electroforeză pe gel de amidon. Această tehnologie a fost modificată în cursul anilor, ajungându-se la o variantă finală ce cuprinde ca primă etapă o degresare avansată a pancreasului prin extracție cu solvenți [35]. Rezultatele cele mai bune s-au obținut prin degresarea pancreasului înainte de extracția cu apă a lipazei. Această etapă trebuie făcută cu multă atenție, pentru a obține probe de lipază reproductibile. Au fost detectate lipide mai strâns legate, care rămân asociate cu lipaza în timpul purificării din pancreasul omogenizat. Este recomandabil a se controla conținutul total de lipide rămase, care se pot extrage cu amestec $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2/1 în volume). Trebuie reamintit că pulberea acetonică pancreatică nu este lipsită de grăsimi, deoarece acetona singură nu este un solvent universal pentru lipide.

Extractele apoase de lipază, obținute în continuare și conținând 1 mM diizopropilfluorofosfat (DFP) s-au fracționat cu sulfat de amoniu, îndepărtându-se un fosfolipid cu caracter acid prin repartiție între n-butanol și sulfatul de amoniu. Apoi urmează cromatografia pe DEAE-celuloză (la pH 8,0), gel-filtrare pe o coloană cu Sephadex G-100 și o separare a izoenzimelor lipazei prin cromatografie pe CM-cellulose, eluarea făcându-se cu un gradient de pH între 5,0 și 5,3. Utilizarea unor inhibitori ai serin-proteinazelor cum ar fi DFP sau benzamidină și fenil-metil-sulfonil-fluorură în cursul tuturor acestor etape de purificare, pentru a preveni proteoliza lipazei, este esențială. Aceeași metodă, fără prima etapă de degresare, este aplicabilă și pentru obținerea lipazei din suc pancreatic.

Conform unui brevet german [38] lipaza pancreatică se poate obține prin autoliza și degresarea simultană a țesutului pancreatic tocat, utilizând un amestec de solvenți. Astfel, 100 kg pancreas congelat s-au tocat și apoi s-au tratat cu 75 l toluen și 25 l butanol timp de 4 ore la 15°C. Resturile de țesuturi s-au eliminat prin centrifugare, iar soluția albă lăptoasă de supernatant s-a precipitat cu acetonă. Precipitatul s-a uscat, obținându-se un randament de 10 %, raportat la pancreas. Într-o altă variantă a procedurii, amestecul de solvenți a fost constituit din 75 l toluen sau hexan, 15 l acetonă și 20 l butanol, obținându-se de data aceasta un randament de 11,8 %, dar o activitate puțin mai mică.

O rețetă pentru obținerea lipazei din pancreas de porc a fost elaborată de Meyer ș.a. [39]. 5 kg de glande pancreatice de porc se răcesc la 0°C în cel mult 4-6 ore de la sacrificarea animalului. Menținându-se la această temperatură, glandele se curăță de țesuturile grase și conjunctive și se macină de câteva ori până se obține o pastă destul de fluidă (cca 2,5 l). Aceasta se agită timp de 4-6 ore cu 2,5 l acetonă și apoi se centrifughează. Reziduul se extrage de încă 3 ori cu același volum de acetonă, de 2 ori cu amestec acetonă-eter etilic 1:1 și de două ori cu eter. Produsul se usucă timp de 48 de ore în vid, obținând o pudră. Se poate obține un preparat solubil, dacă se tratează această pudră cu o soluție de glicerină 87 %. Atât pudra cât și soluția în glicerină sunt la fel de stabile ca activitate.

Pentru purificarea lipazei pancreatice se propune următoarea succesiune de etape:

- 60 g pulbere pancreatică se extrag timp de 36 de ore la 4°C cu 840 ml soluție MgSO_4 0,1 M, la care se adaugă 1 ml toluen și 2 picături alcool decilic. Materialul insolubil se elimină prin centrifugare, iar supernatantul se aduce la pH 4,5 cu HCl 0,1 N.

- la soluția rece se adaugă 1 l amestec apă-acetonă (60 % în volume) răcit în prealabil la -20°C. Se agită 20 de minute, se centrifughează și se îndepărtează

supernatantul. Nu se poate preveni din păcate pierderea a 28 % din activitate în această etapă.

- precipitatul se amestecă, încet, cu 730 ml apă distilată răcită la 0°C, se agită 10 minute și apoi se centrifughează. Supernatantul se aruncă.

- precipitatul se tratează cu 40 ml soluție MgSO₄ 0,5 M apoi cu 320 ml apă cu gheață și 12 ml acid acetic 0,2 M. Se agită 10 minute și se centrifughează. Enzima se află în supernatant, căreia i se adaugă un volum egal de apă distilată, iar materialul care precipită se elimină din nou prin centrifugare.

- supernatantului i se adaugă 1,4 l apă cu gheață conținând 12 ml acid acetic 0,2 M și se agită 15 minute. Puținul precipitat care se formează se izolează prin centrifugare. El conține 21,5 % din activitatea extractului brut, iar factorul de purificare este 17,2.

Tehnologia purificării a fost îmbunătățită de Verger ș.a., conform unei proceduri ce conține următoarele trei etape: obținerea pancreasului degresat, extracția lipazei și purificarea prin afinitate utilizând granule de sticlă hidrofobă și cromatografie pe DEAE - Cellulose [36]. Rezultatele acestei purificări sunt prezentate în tabelul 1.8.

Tabelul 1.8. Rezultatele purificării lipazei din pancreas de porc [36]

Procedeul de purificare	Volum (ml)	Activitate totală ^a (Unități x 10 ⁻⁴)	Proteine totale (mg)	Activitate specifică (Unități/mg)	Randament (%)
Extracția pancreasului degresat	190 ± 7	96 ± 13	(1,1 ± 0,1)x10 ⁻⁴	87	100
Concentrarea eluatului de pe granulele de sticlă	107±16	35 ± 14	220 ± 90	1590	36
Cromatografia pe DEAE-celuloză					
Fracțiunea I	189	21,1	33,0	6360	7,3
Fracțiunea II	170	9,7	17,1	5610	3,3
Fracțiunea III	224	12,4	24,0	5120	4,3

^a O unitate de activitate înseamnă 1 μmol acid butiric eliberat într-un minut

Fracțiunea I obținută în urma cromatografiei pe DEAE-celuloze s-a dovedit a fi omogenă în cromatografia pe gel de poliacrilamidă și identică cu izoenzima cunoscută sub numele de lipază B, având mai puțin de 2 % colipază. Reprezintă 40 % din lipaza purificată obținută. Fracțiunea III conține două izoenzime, lipazele A și B în amestec cu aproximativ 50 % colipază. Fracțiunea II conține de asemenea o cantitate apreciabilă de colipază. Dacă se consideră necesar, ele pot fi purificate în continuare pentru eliminarea colipazei, dar trebuie menționat că contaminarea cu colipază este caracteristică pentru majoritatea lipazelor pancreatice purificate.

Contaminarea cu colipază se poate determina prin aducerea pH-ului la 2,0 sau prin încălzire la 70°C timp de 30 minute, condiții în care lipaza se dezactivează, în timp ce colipaza este stabilă. După aceasta se ia câte o probă din aceste preparate și se determină influența lor asupra activității lipazei pure. Întrucât există o diferență a activității lipazei în prezența sărurilor acizilor biliari în absența colipazei (activitate directă) și în prezența unui exces de colipază adăugată (activitate potențială), se poate estima colipaza prezentă în preparatul de bază. Este probabil că prezența unor cantități variabile de colipază în probele

de lipază este legată de eficiența primei etape de degresare. Acest lucru este demonstrat de faptul că dacă obținerea lipazei s-a făcut din sucul pancreatic lipsit de lipide, nu s-a observat contaminarea cu colipază.

Lipaza formează cu colipaza un complex în raport molar de 1:1. Constanta de disociere a legăturii, care este atât electrostatică cât și hidrofobă, este de 5×10^{-7} M în soluție tampon. În soluție de săruri ale acizilor biliari, această legătură este mai slabă însă în prezență de acid oleic devine de aproape 100 de ori mai puternică, același efect avându-l și alte lipide, ceea ce explică dificultatea separării lipazei de colipază în prezența lipidelor. S-a demonstrat că în prezența colipazei în lipază are loc o modificare de conformație [40].

Colipaza are un rol esențial în digestia grăsimilor din organism. Se știe că lipaza pancreatică hidrolizează grăsimile la interfața lipid-apă a miceliilor. Adsorbția lipazei la această interfață este inhibată de sărurile acizilor biliari. Colipaza elimină efectul inhibitor servind ca o "ancoră" pentru lipază la această interfață [41].

S-a mai propus și o altă metodă de purificare a lipazei din pancreas de porc, prin cromatografie de afinitate utilizând un derivat de acid fenilboronic. Procedul poate fi utilizat în diferite etape ale purificării. S-a determinat o creștere a activității specifice de 20 de ori [35].

1.3. Structura proteică a lipazei și conformația centrului activ

Cele mai multe studii referitoare la structura și mecanismul de acțiune au fost efectuate asupra lipazei pancreatice. S-a stabilit că ea este constituită din două izoenzime, lipaza A și lipaza B care diferă doar prin faptul că lipaza A este mai acidă. În stare normală, așa cum s-a arătat, aceste două enzime sunt asociate cu câte o coenzimă. Aceste coenzime sunt constituite din catene polipeptidice aproape similare, având masa moleculară în jur de 11.000 [42].

Masa moleculară a lipazei din pancreas de porc a fost estimată la 45.000-50.000 [43]. Structura primară completă a lipazei pancreatice a fost determinată de De Caro ș.a [44]. S-a stabilit că ea este formată dintr-un singur lanț de 449 aminoacizi. Această secvență corespunde unei mase moleculare a enzimei de 49.859, la care se adaugă un rest de hidrați de carbon (restul de glucan) cu masa moleculară în jur de 2.000, cea ce dă o masă moleculară totală în jur de 52.000. Au fost determinate structurile primare și pentru o serie de lipaze de origine bacteriană [52-54] sau fungică [55, 56].

În ce privește succesiunea aminoacizilor în secvența primară a lipazei pancreatice, două aspecte trebuie menționate : regiunea (206-217) în care succesiunea a 11 aminoacizi hidrofobi este întreruptă de un singur rest de asparagină și regiunea (336-349) în care există o alternanță regulată a aminoacizilor polari și nepolari [35].

Lipaza pancreatică conține 14 resturi de cistină, a căror distribuție este neuniformă. Ele formează șase punți disulfidice prin legături S-S, rămânând două grupări SH libere.

Dintre acestea, prima grupare SH_I a fost localizată pe Cys-181 și se consideră că rolul ei nu este important pentru activitatea lipazei. Pentru cea de-a doua grupă tiolică SH_{II} s-a sugerat existența a doi izomeri, SH_{II} fiind fie pe Cys-101 fie pe Cys-103. Rolul acestei grupe în activitatea catalitică a lipazei nu este încă elucidat.

Reprezentarea schematică a lanțului polipeptidic al lipazei pancreatice, cu localizarea grupărilor sulfhidril și a punților disulfidice este dată în figura 1.1. [45].

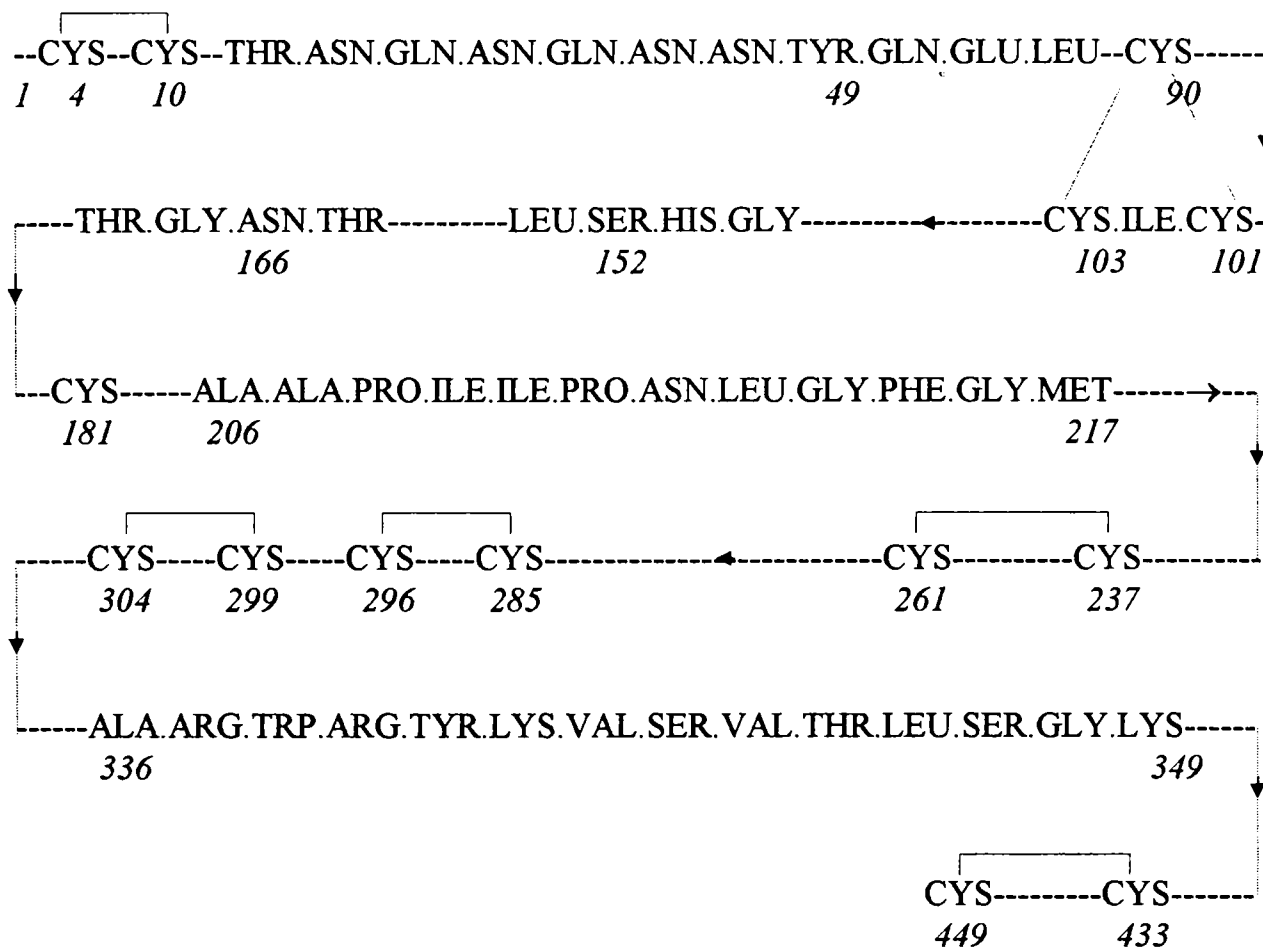


Figura 1.1. Structura primară a lipazei pancreatice

Referitor la structura secundară a lipazei pancreatice, s-a presupus o structură α -elicoidală doar pentru 5% din lanțul peptidic, lucru confirmat de datele de dicroism circular. Energia de formare a structurilor secundare s-a interpretat ca fiind legată de posibilitatea de existență a două domenii separate al căror punct de demarcație este situat între resturile de aminoacizi 240-320 [45].

Răspunsul final la problemele de structură a lipazei îl vor da probabil studiile de raze X [35]. Structura terțiară a lipazei cristalizate din *Geothricum candidum* a fost determinată printr-o asemenea metodă. S-a stabilit că molecula enzimei are o formă elipsoidală, cu dimensiunile 50 x 50 x 70 Å și posedă o deschizătură largă în dreptul centrului moleculei, unde se presupune că ar fi localizat centrul activ [57].

În ce privește structura centrului catalitic activ al lipazei și a resturilor de aminoacizi implicate în activitatea catalitică, la început nu s-au putut face decât supoziții [2]. S-a presupus că lipaza este enzimă de tip serină-histidină ca multe alte esteraze și proteinaze cum ar fi chimotripsina sau elastaza. Lipaza pancreatică nu este inhibată de diizopropil-fluorofosfat (DEP), inhibitorul standard al esterazelor care au serina drept aminoacid reactiv în centrul activ, însă este inhibată de dietil-p-nitrofenil-fosfat (DNP) [2]. Așa cum s-a demonstrat ulterior, DEP reacționează cu tirozina neesențială Tyr-49, în timp ce DNP reacționează cu serina esențială Ser-152, aceeași care probabil participă la fixarea la interfață a lipazei în secvența His-Ser-Leu-Gly (151-154) [44].

În ultimii 20 de ani însă s-au făcut pași importanți în direcția elucidării compoziției centrului activ al lipazelor. S-a stabilit că toate lipazele a căror structură primară a fost determinată posedă secvențe omoloage, dintre care una semnificativă de tip His-X-Y-Gly-

Z-Ser-W-Gly sau Y-Gly-His-Ser-W-Gly (W, X, Y și Z fiind aminoacizi nespecificați) fiind conservată în toate aceste enzime [58].

Prezența histidinei în centrul activ a fost confirmată de determinările activităților lipazice după modificarea selectivă a acestui aminoacid prin fotooxidare [59], reacție cu etoxiformiat [60] sau cu dietil-pirocarbonat [61]. S-a studiat de asemenea activitatea lipazei din pancreas de porc față de două substraturi, p-nitrofenilacetat și tributirat de glicerină și dependența acestora de etoxiformilarea histidinei [46]. Anhidrida etoxiformică reacționează rapid cu resturile de histidină din moleculele proteice. În cazul lipazei această reacție duce la inactivarea enzimei. S-a stabilit că fragmentul care constituie secvența C-terminală a lipazei (336-449) păstrează capacitatea lipazei de a cataliza hidroliza p-nitrofenilacetatului. Primul rest de histidină care reacționează cu anhidrida etoxiformică, atât în lipază cât și în acest rest, a fost His-354. S-a observat dispariția activităților față de p-nitrofenilacetat, însă menținerea nealterată a activității enzimei față de tributirină. Utilizând un exces mai mare de anhidridă etoxiformică, s-au etoxiformilat alte două resturi de histidină ale lipazei, His-156 și His-175, iar hidroliza tributirinei a fost inhibată. Prin tratare cu hidroxilamină s-a reactivat în mare parte atât lipaza cât și fragmentul de lipază. Prin aceste rezultate s-a demonstrat că cele două activități nu sunt asociate aceluiași centru activ, deci lipaza pancreatică are doi centri activi: unul pentru hidroliza trigliceridelor și unul pentru hidroliza p-nitrofenilacetatului.

Mecanismele asociate acestor două tipuri de cataliză s-au presupus a fi diferite: în cazul hidrolizei trigliceridelor lipaza împreună cu centrul ei activ posedă un domeniu topografic delimitat, reponsabil de interacția enzimei cu interfața lipid-apă. Această interacție este urmată de activarea enzimei. În cazul acțiunii lipazei asupra p-nitrofenilacetatului, acțiunea este mult mai simplă, însă activitatea enzimei mult mai mică (6 % raportată la hidroliza tributirinei). În ce privește rolul restului Ser-152, s-a considerat că sunt necesare investigații suplimentare.

Referitor la inhibarea activității de hidroliză a tributirinei se pot formula două ipoteze [46]:

1. His-156 și/sau His-75 fac parte din centrul activ și acilarea duce la împiedicarea funcționării lor (lui) în acest sens.
2. Etoxiformilarea determină modificări conformaționale în arhitectura moleculară, care nu sunt favorabile formării centrului activ.

O altă confirmare a prezenței histidinei în centrul activ este faptul că valorile pK pentru resturile de aminoacizi responsabile pentru actul catalitic au fost raportate de mai mulți autori ca fiind într-un domeniu specific histidinei [62, 63].

În ce privește prezența serinei în centrul activ, aceasta a fost confirmată de influența asupra activității lipazei a derivatizării cu dietil-p-nitrofenilfosfat [64], utilizării unor inhibitori specifici pentru serină [65], reacției cu diizopropilfluorofosfat [66] sau alchilizocianați [67]. Plecându-se de la pierderea activității enzimatică prin modificarea chimică a restului Ser-152 a lipazei din pancreas de porc, s-a presupus rolul esențial al acestui rest în cataliză, dar alți autori au acreditat ideea rolului său în așa-numita "recunoaștere la interfață", avansându-se ideea existenței unui "centru de recunoaștere", distinct din punct de vedere topologic de centrul catalitic activ și controlat de Ser-152. Un studiu efectuat asupra lipazei din pancreas uman a demonstrat că în acest caz, Ser-152 este restul nucleofil esențial pentru cataliză, făcând parte dintr-o triadă Asp-Ser-His, care este analogă chimic, dar diferită structural de cea din serin-proteinaze [47].

Lucrările apărute în ultima vreme referitoare la structura tridimensională a lipazelor caută să explice cum pot niște enzime solubile să acționeze la suprafața unor lipide. Încă în 1958, Desnuelle a sugerat că acțiunea lipazelor trebuie considerată mai curând în suprafața

bidimensională a unui miceliu decât în volumul tridimensional al unei soluții. Ultimele cercetări par să demonstreze această viziune, susținând varianta acestei schimbări conformaționale față de forma solubilă, atunci când lipaza se leagă de interfață [48]. Este cunoscută creșterea importantă a activității lipazei la interfața lipid-apă, fenomen cunoscut sub denumirea de "activare la interfață". Din fericire, după 1994 au fost determinate structurile tridimensionale pentru mai mult de 10 tipuri de lipaze, prin studii de raze X [111]. Pe baza unui asemenea studiu efectuat asupra lipazei din pancreas uman și a celei microbiene din *Rhizomucor miehei* s-a determinat că în ambele enzime centrii activi conțin triade Asp-Ser-His cu structură omoloagă, care sunt complet ecranate datorită unui scurt segment elicoidal. Autorii presupun că în momentul activării la interfață are loc deplasarea acestui "capac" elicoidal și centrul activ al enzimei este dezecranat [49]. Atunci când lipaza acționează într-un solvent organic, de exemplu etanol sau 2-(2-etoxietoxi)-etanol conținând trioleină, nu se observă această activare la interfață chiar dacă concentrația trioleinei crește peste limita sa de solubilitate în mediul respectiv, deci are loc formarea interfeței. Acest fapt s-a explicat prin faptul că în solvenți organici nu are loc adsorbția enzimei la interfață, probabil datorită absenței efectului hidrofob care este forța motrice a adsorbției lipazei din soluții apoase la interfețe hidrofobe. Absența adsorbției la interfață și a activării la interfață sugerează faptul că acel "capac" elicoidal rămâne închis, determinând reducerea activității în mediile organice [108].

În ce privește structura cuaternară a lipazelor, există date experimentale ce demonstrează că unele lipaze pot fi constituite din două [68], patru [69] și chiar șase [52] subunități. De asemenea, unele lipaze pot fi asociate cu resturi glicozidice ca în cazul lipazei pancreatice [44], sau cu resturi lipidice [70].

1.4. Specificitatea lipazelor

Există cinci tipuri de specificitate a lipazelor [71]:

- specificitate în funcție de clasele de lipide;
- specificitate de poziție;
- specificitate în funcție de natura acidului gras;
- stereospecificitate;
- specificitate combinată a celor menționate.

Primul tip este mai puțin răspândit, existând totuși anumite lipaze care manifestă selectivitate față de o anumită clasă de gliceride, de exemplu o lipază din *Penicillium cyclopium* față de monogliceride [26].

În privința specificității de poziție, lipazele obținute din surse naturale pot fi nespecifice sau pot manifesta specificitate față de pozițiile 1,3 respectiv 2 ale trigliceridelor. Cele nespecifice hidrolizează în mod egal toate cele trei legături esterice, exemple din această categorie fiind lipazele din *Chromobacterium viscosum* [72], *Pseudomonas fluorescens* [73], *Candida cylindracea* [74], *Geothricum candidum* [75] și *Penicillium cyclopium* [76, 77]. În schimb, s-a demonstrat că lipaza pancreatică manifestă o specificitate de poziție, hidrolizând preferențial legăturile esterice din pozițiile 1 și 3 ale trigliceridelor. Secvența de reacție a hidrolizei trigliceridelor este cea redată în figura 1.2.

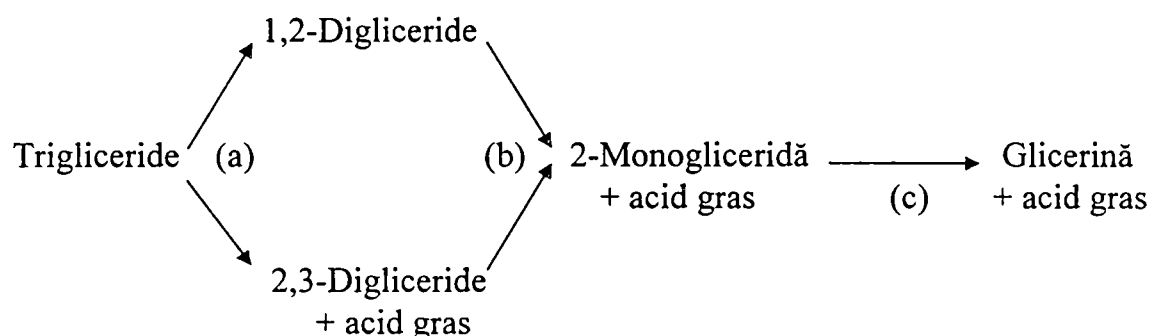


Figura 1.2. Secvența reacției pentru hidroliza trigliceridelor, catalizată de lipaza pancreatică

Reacția (a) este foarte rapidă, (b) are loc cu viteză scăzută, iar (c) foarte scăzută. Faptul că hidrolizatele de gliceride conțin și 1-monogliceride, trebuie atribuit izomerizării 2-monogliceridelor respective în timpul lipolizei. Alte lipaze care manifestă 1,3-specificitate sunt cele provenite din *Rhizopus arrhizus* [77, 78], *Aspergillus niger* [75, 76, 79], *Rhizopus delemar* [75, 76] și *Mucor miehei* [79]. Specificitatea față de poziția 2 a trigliceridelor este întâlnită extrem de rar.

O serie de lipaze au proprietatea de a ataca preferențial acele legături esterice în urma hidrolizei cărora sunt puși în libertate acizi grași cu o anumită lungime a catenei hidrocarbonate sau cu un anumit grad de nesaturare. Este acceptat în general faptul că lipaza pancreatică manifestă o specificitate în funcție de lungimea catenei hidrocarbonate a esterilor acizilor grași din trigliceride. Cei cu catenă scurtă sunt hidrolizați mai repede decât cei cu catenă lungă, viteza maximă înregistrându-se în cazul tributirinei [38]. Lipaza din *Mucor miehei* manifestă specificitate față de acizii grași C_4 și C_6 [80]. Datele experimentale au arătat că lipazele din *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* și *Rhizopus arrhizus* manifestă în reacțiile de esterificare o specificitate ce are formă de clopot, cu maximul de activitate centrat asupra alcoolilor cu catenă de 6, 4 și respectiv 2 atomi de carbon [81]. Putem avea și specificitate bimodală, atunci când există două zone de lungimi de catenă preferate de lipază, de exemplu pentru C_3 - C_4 și C_8 - C_{10} în cazul lipazelor din *Penicillium cyclopium* și *Rhizopus delemar* [58]. Ea se poate explica prin existența mai multor centri activi în molecula lipazei [47]. În general însă trebuie menționat că acest tip de specificitate variază foarte mult în raport cu natura lipazei și tipul reacției catalizate, de aceea trebuie determinat pentru fiecare caz în parte.

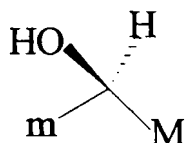
La aceeași lungime a catenei hidrocarbonate, lipaza pancreatică și o serie de alte lipaze manifestă specificitate pentru esterii acizilor grași nesaturați, iar viteza cu care este atacat substratul pare să crească cu numărul de duble legături din catena hidrocarbonată [58]. Totuși unele studii mai complete au arătat că de fapt și aici avem o distribuție sub formă de clopot a vitezei de reacție asupra substratului în funcție de numărul de legături duble din catena hidrocarbonată [72]. După unele surse, există și lipaze cu specificitate numai pentru acizii grași C_{18} cu o dublă legătură în poziția cis-9, care deci vor duce la obținerea doar a acestor acizi în urma hidrolizei [83]. Prin imobilizare, specificitatea față de acizii grași se poate schimba, de exemplu lipaza din *Mucor miehei* imobilizată pe un schimbător de ioni de tip Duolite manifestă activitate de hidroliză mai mare în direcția acizilor saturați C_{14} și C_{16} decât enzima liberă [82].

Proprietatea de enantiospecificitate a lipazelor nu a fost cunoscută multă vreme, însă la ora actuală există o literatură extrem de bogată referitoare la sinteze enantioselective catalizate de lipaze [84]. Majoritatea acestora se referă la obținerea unor alcooli și esteri

optic activi prin rezoluția unor substraturi racemice netrigliceridice. O parte dintre acestea vor fi menționate în capitolul referitor la aplicațiile reacțiilor catalizate de lipaze.

În multe reacții enantioselective catalizate de lipaze, s-a observat obținerea acelorași izomeri, ceea ce pe de o parte confirmă structura asemănătoare a lipazelor, iar pe de altă parte conduce la ideea că în unele situații se poate enunța o regulă care să prevadă enantiomerul ce se va obține.

Această regulă empirică se referă la alcoolii secundari și se bazează pe diferența de mărime a substituenților de la atomul de carbon secundar. Formularea regulii se face pe baza reprezentării schematice a orientării substituenților de la atomul de carbon menționat [300].



Când gruparea hidroxilică este în afara planului hârtiei, enantiomerul care este ales de lipază și care va reacționa cel mai repede este acela care în dreapta grupării -OH are substituentul cel mai voluminos (M), respectiv în stânga grupării -OH substituentul mai puțin voluminos (m).

Gradul de enantioselectivitate variază pentru diferiți alcooli și enzime, însă toate lipazele testate au reacționat conform regulii de mai sus.

2. Cinetica și mecanismul reacțiilor catalizate de lipaze [310]

În general, viteza inițială (v) a unei reacții enzimaticice crește cu concentrația substratului (S) până la o limită superioară (V_m). Curba care redă dependența $v = f(S)$, denumită curbă Michaelis, are forma unui arc de hiperbolă echilaterală a cărei asimptotă este orizontală. Interpretarea acestui fenomen este că enzima (E) adsoarbe reversibil substratul pentru a da un așa-zis complex enzimă-substrat ES^* , iar produsul reacției (P) este eliberat pe măsura formării sale, odată cu regenerarea enzimei libere. Viteza de reacție este deci proporțională cu numărul moleculelor complexului și curba Michaelis poate fi asimilată cu o izotermă de adsorbție [85-89].



Un caz particular îl reprezintă însă acele reacții enzimaticice unde substratul este insolubil în apă, reacția având loc deci într-un mediu eterogen. O astfel de reacție este hidroliza trigliceridelor acizilor grași catalizată de lipaza pancreatică și s-a constatat că lipaza face parte dintre acele enzime care acționează preferențial asupra substraturilor emulsionate. Acest lucru face ca emulsifierea cât mai bună a substratului să fie esențială pentru buna desfășurare a lipolizei, motiv pentru care este indicată prezența în sistem a unui emulgator.

În cazul enzimelor care acționează într-un mediu eterogen, cum ar fi lipaza, nu mai putem vorbi despre o concentrație de substrat propriu-zisă, dar s-a constatat că viteza de hidroliză crește cu cantitatea de fază emulsionată, tinzând spre o valoare limită. S-a demonstrat că prima etapă a catalizei este și de această dată o adsorbție specifică ce duce la formarea unui complex enzimă-substrat, numai că în loc de adsorbția substratului la enzimă are loc adsorbția enzimei la interfața dintre substratul emulsionat și faza apoasă în care se găsește enzima. Când cantitatea de fază emulsionată este mică, majoritatea enzimei rămâne în soluție și viteza de hidroliză este redusă. Crescând cantitatea de fază emulsionată se favorizează adsorbția lipazei și viteza de hidroliză crește până în momentul când toate moleculele de enzimă se găsesc fixate la interfață, exercitându-și acțiunea catalitică [110].

În cazul reacțiilor catalizate de lipaze în solvenți organici, sistemul de reacție se poate prezenta, în principiu, în două variante:

- sisteme de reacție bifazice în care substratul insolubil în apă, dizolvat într-un solvent sau substratul lichid însuși, este amestecat cu o soluție apoasă de lipază [90].

- sisteme de reacție în care enzima este suspendată într-un solvent organic sau solubilizată prin intermediul unui miceliu invers, existând doar o cantitate mică de apă care este dispusă în jurul macromoleculei enzimaticice pentru a menține conformația catalitic activă [91].

Se remarcă faptul că, în ambele situații, acțiunea lipazei are loc în mediu eterogen, la interfața a două faze nemiscibile, dintre care una este constituită din apă. Rezultă în mod logic că cinetica și mecanismul reacțiilor catalizate de lipaze în solvenți organici nu pot fi bine înțelese fără o aprofundare a cineticii hidrolizei trigliceridelor emulsionate, care a fost foarte mult studiată, mecanismele proceselor fiind probabil asemănătoare sau identice. Bineînțeles că fiind vorba de un proces extrem de complex, în care intervin o mulțime de factori, modul de abordare a studiului cinetic diferă mult de la autor la autor, iar uneori și concluziile la care se ajunge sunt diferite. În continuare vor fi prezentate câteva modele cinetice din literatura de specialitate care au fost considerate semnificative pentru reacțiile catalizate de lipaze.

2.1. Cinetica hidrolizei trigliceridelor emulsionate

Una din caracteristicile cele mai importante și interesante ale acestor reacții o constituie activarea enzimei la interfață. Diferența esențială dintre lipaze și esteraze este chiar această activare la interfață în cazul primelor. Această particularitate apare nu numai în cazul emulsiilor ci de exemplu și la adsorbția gliceridei pe granule sferice de sticlă siliconică, situație în care se formează de asemenea o interfață. S-a arătat că în acest mod viteza de hidroliză a tripropionatului de glicerină crește de 1000 de ori [92].

Definirea și măsurarea concentrației substratului insolubil constituie un prim obstacol în calea studierii cineticii enzimatică la interfață. În cinetica Michaelis - Menten clasică, concentrația substratului se exprimă în moli/l. Reacțiile care au loc la interfața ulei-apă dobândesc un caracter bidimensional, ceea ce determină o dependență importantă a cineticii de starea fizică a substratului și nu atât de concentrația lui.

Pentru a explica mersul lipolizei, o serie de cercetători au propus o adsorbție reversibilă la, sau o pătrundere a enzimei în interfață. Pe lângă aceasta, s-a presupus că prima etapă precede formarea complexului enzimă-substrat și poate fi în anumite condiții etapa determinantă de viteză.

Un model cinetic al acțiunii enzimei la interfață este prezentat în figura 2.1. [93].

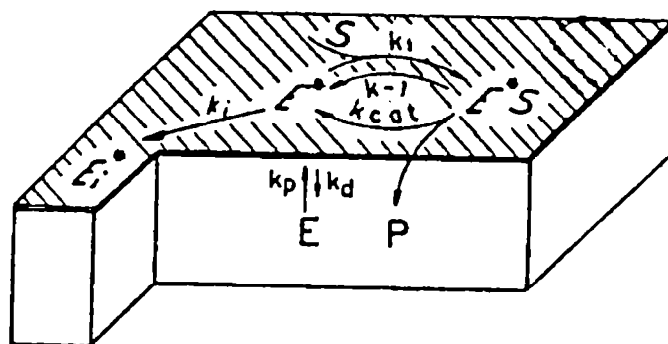


Figura 2.1. Modelul cinetic al acțiunii lipazei la interfața ulei-apă

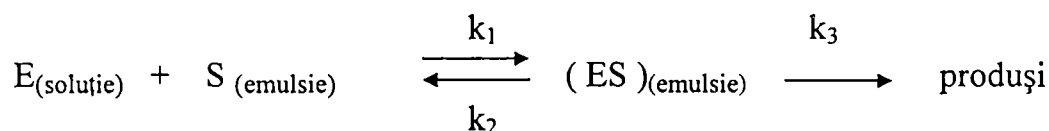
Au loc două echilibre succesive. Prima constă în pătrunderea enzimei solubilizate în apă în interfață ($E \rightleftharpoons E^*$). În al doilea echilibru, o moleculă de enzimă pătrunsă în interfață leagă o moleculă de substrat, dând complexul E^*S . Acesta reprezintă echivalentul echilibrului Michaelis-Menten clasic în sistem bidimensional. Odată ce s-a format complexul E^*S are loc etapa catalitică, regenerând enzima în forma E^* odată cu eliberarea produșilor. Ulterior, la această schemă s-a adăugat o etapă de transformare a enzimei din forma E^* într-o formă inactivă E_i^* , fapt constatat experimental într-o serie de cazuri. Ca o consecință a acestor etape consecutive de pătrundere și inactivare, ne putem aștepta ca cinetica lipolizei să fie controlată calitativ de o interfață de adsorbție, responsabilă pentru o perioadă inițială de rămânere în urmă și de o influență de inactivare, care duce la scăderea vitezei de reacție. Cineticile sunt strict liniare fie dacă cele două influențe se echilibrează temporar, fie dacă etapa de penetrare este rapidă și viteza de inactivare este neglijabilă [93].

Se poate considera că pătrunderea enzimei în interfață conferă enzimei o conformație nouă (E^*) având o eficiență catalitică mult mărită față de enzima solubilă (E). Etapa de pătrundere este deci distinctă de orice adsorbție mai generală și nespecifică ce

putea să o precede. Modificarea conformațională a fost confirmată de măsurători spectroscopice la anumite lipaze. Trebuie menționat că acest model este valabil nu numai pentru enzimele lipolitice, ci și pentru orice enzime solubile care acționează asupra unui substrat insolubil.

Utilizând drept substrat o emulsie de ulei de măsline, s-a demonstrat că lipaza se adsorbe pe particulele emulsionate și că această adsorbție urmează o izotermă de tip Langmuir [89].

În continuare s-a măsurat activitatea lipazei în funcție de cantitatea de emulsie (exprimată în unități arbitrare). Corelația observată dintre adsorbție și activitatea enzimei poate fi exprimată prin următoarea schemă [89]:



Asemănarea formală a acestei scheme cu binecunoscutul model Michaelis-Menten a tentat mulți cercetători să determine constantele K_m și V_{\max} pentru enzime ce acționează asupra unor substraturi insolubile. Benzonana și Desnuelle au demonstrat influența pe care o are cantitatea de interfață, determinată de mărimea picăturilor de emulsie, asupra constantei Michaelis K_m . Ei au comparat vitezele de lipoliză în cazul unor emulsii grosiere și fine și au găsit valori diferite pentru K_m (fig 2.2, •---•). Dacă însă concentrația substratului este exprimată în unități de suprafață/volum în loc de masă/volum, reprezentările Lineweaver-Burk pentru cele două emulsii ale aceluiași substrat coincid și se obține o singură valoare K_m , indiferent de gradul de dispersie (fig 2.2, ○---○) [110].

Importanța determinării unei constante superficiale K_m care să aibă dimensiuni exprimate în suprafață/volum în loc de masă/volum a fost pusă sub semnul întrebării de alți cercetători. Astfel, Brockerhoff susține că o astfel de constantă K_m trebuie să fie constanta de disociere a complexului enzimă-interfață (k_3 fiind foarte mic), fiind independentă de natura chimică a substratului și presupune că exact aceleași valori ale lui K_m vor fi găsite pentru combinații cu totul diferite de interfață ulei-apă și proteină, adică interfețele ulei-apă s-ar comporta ca suprafețe nespecifice care adsorb numeroase proteine cu aceeași afinitate [93]. Mattson susține că orientarea moleculei de ester la interfața ulei-apă și specificitatea enzimei pentru substratul respectiv sunt principalii factori care determină viteza de hidroliză. În realitate, se pare că această controversă este doar aparentă, deoarece nu s-a investigat aceeași etapă a reacției lipolitice. Brockerhoff și Mattson au utilizat concentrații superficiale saturate ale substratului, în care toate moleculele de enzimă erau adsorbite la interfață și au studiat afinitatea enzimei pentru substratul său specific la interfață. De aceea, ei susțin, probabil în mod justificat, că orientarea moleculei de substrat la interfața ulei-apă este cel mai important factor al lipolizei. Benzonana și Desnuelle, pe de altă parte, au studiat adsorbția enzimei solubilizate în apă la interfața apă-lichid, etapă ce precede reacția la interfață și au definit o constantă de afinitate între enzimă și interfață, definiție ce accentuează influența mărimii suprafeței emulsiei asupra vitezei reacției enzimatică.

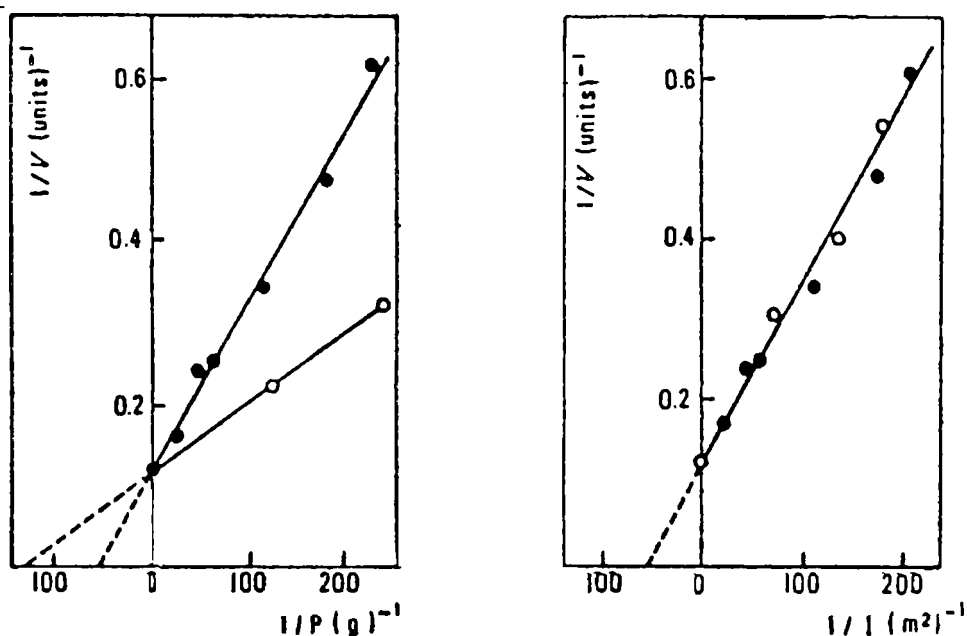


Figura 2.2. Reprezentarea Lineweaver-Burk pentru lipoliza a două emulsii de ulei, grosieră (●---●) și fină (○---○) [110]

Trebuie menționat că determinarea unei constante superficiale K_m necesită ca interfața ulei-apă să rămână neschimbată în cazul experimentului, deoarece cantitatea enzimei adsorbite variază în funcție de calitatea interfeței ulei-apă. O obiecție mai serioasă la propunerea lui Benzonana și Desnuelle de a determina valoarea constantei superficiale K_m în unități de suprafață/volum este de natură practică și anume că este relativ greu a se determina precis aria suprafeței picăturilor de emulsie. În plus, dacă se folosesc substanțe tensioactive la stabilizarea emulsiei, exprimarea lui K_m în unități de suprafață/volum este îndoielnică, deoarece nu se cunoaște suprafața ocupată de emulgator la interfață.

Acesta este principalul argument pentru care cercetătorii care au studiat cinetica reacțiilor enzimice la interfață au căutat interfețe ulei-apă care pot fi caracterizate mai bine decât emulsiile.

Până acum s-a discutat despre substraturi emulsionate, care favorizează formarea unor picături de emulsie destul de mari. Pentru stabilizarea acestor emulsii se folosesc adeseori cantități mici de agenți activi de suprafață, care se concentrează la interfața ulei-apă și la atingerea concentrației critice micelare formează sisteme micelare disperse. Aceste soluții sunt transparente, prezentând marele avantaj că miceliul poate fi ușor atacat de enzimă și se obțin deseori cinetici liniare datorită îndepărtării produșilor de reacție de la interfața ulei-apă. În acest scop se utilizează, săpunuri, detergenți ca dodecilsulfonatul de sodiu, săruri ale acizilor biliari, Triton X-100 și altele. În plus, micșorarea valorii pK a acizilor grași cu catenă lungă în prezența anumitor detergenți face posibilă efectuarea titrărilor continue în instalații de tip pH-stat.

Pentru a explica activarea la interfață a lipazelor, care așa cum s-a arătat înseamnă o creștere importantă a vitezelor de reacție, s-au emis o serie de ipoteze [93]:

a. Creșterea concentrației moleculelor de substrat la interfață este cea mai simplă și aparent logică explicație, dar care nu poate, singură, justifica creșteri ale vitezei de reacție de 10^3 - 10^4 ori.

b. Scăderea energiei de activare prin agregarea substratului a fost susținută de mai mulți autori, considerând că agregarea prin ea însăși duce la scăderea entropiei sistemului prin pierderea energiei de rotație și de translație și, în plus, orientarea moleculei de substrat la interfață favorizează mult mai mult interacțiunea cu enzima decât în cazul unor monomeri liberi aflați în soluție.

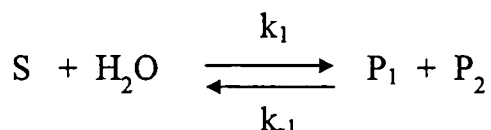
c. Starea de hidratare a substratului este mai redusă la interfață în raport cu cea existentă în soluția apoasă. Deoarece se consideră că moleculele de apă care asigură hidratarea substratului împiedică atacul enzimei, al cărei centru activ este caracterizat de o nucleofilicitate slabă, prin agregarea și dehidratarea substratului la interfață viteza reacției va crește.

d. Aria interfeței pe moleculă de substrat sau tensiunea superficială constituie, după unii autori, un factor determinant al vitezei de lipoliză. Determinarea experimentală a acestei influențe este însă destul de dificilă și rezultatele în această direcție nu sunt concludente.

e. Orientarea și modificarea conformației enzimei la interfață pare o explicație logică a activării enzimei, care caută să dobândească o orientare în care centrul său activ să ajungă în contact cu o singură moleculă de substrat pe care o transformă. A fost emisă și ipoteza prezenței unei zone, distincte în raport cu centrul activ și responsabilă pentru fixarea reversibilă a proteinei la interfață [94]. Desnuelle a denumit această zonă centru de recunoaștere interfacială, iar alți cercetători au adus dovezi experimentale în direcția existenței sale, așa cum se va discuta mai departe.

Kosugi și Suzuki au elaborat un model cinetic al reacției de hidroliză a trigliceridelor, care poate reda evoluția în timp a acestor reacții [97].

Întrucât este dificil să se țină cont de existența a două reacții consecutive de echilibru, desfășurarea în timp a reacției poate fi privită ca un proces de hidroliză a legăturilor esterice cu formarea unui acid și a unui derivat de alcool.



Deoarece lipaza hidrolizează numai legăturile esterice din pozițiile 1 și 3, concentrația inițială de legături esterice hidrolizabile este: $(LEH)_i = 2 \cdot s_0$, unde prin s_0 am notat concentrația inițială a trioleinei. Gradul de hidroliză la un anumit moment t al reacției poate fi exprimat prin următorul raport:

$$r = (LEH)_t / (LEH)_i$$

unde $(LEH)_t$ reprezintă concentrația de legături esterice hidrolizate până în momentul t egală cu concentrația molară a acidului rezultat.

Reprezentând grafic gradul de hidroliză r în funcție de timp rezultă o curbă cu alură hiperbolică ce seamănă cu curba de saturație a unei izoterme de adsorbție și poate fi descrisă de o funcție de forma:

$$r = \frac{t}{at + b} \quad (2.1)$$

Când t tinde spre infinit:

$$r = \frac{1}{a} = R \quad (2.2)$$

deci punctul de saturare al hiperbolei corespunde gradului de hidroliză final, la echilibru, R . Timpul T în care s-au hidrolizat jumătate din legăturile esterice disponibile este :

$$\frac{R}{2} = \frac{T}{aT + b} \quad (2.3)$$

de unde rezultă:

$$T = \frac{b}{a} \quad (2.4)$$

Ecuția (2.1) poate fi rescrisă în funcție de parametrii R și T obținând relația (2.5), care se poate liniariza, permițând determinarea valorilor parametrilor T și R din reprezentarea grafică $1/r = f(1/t)$:

$$r = \frac{t}{\frac{1}{R}t + \frac{T}{R}} ; \text{ sau} \quad r = \frac{1}{\frac{1}{R} + \frac{T}{R} \cdot \frac{1}{t}} \quad (2.5)$$

$$\frac{1}{r} = \frac{T}{R} \cdot \frac{1}{t} + \frac{1}{R} \quad (2.6)$$

Determinarea parametrilor R și T pentru un anumit sistem permite estimarea gradului de hidroliză la un anumit timp de reacție, respectiv a timpului de reacție după care se va atinge un anumit grad de hidroliză. Considerând schema de reacție dată, se poate exprima concentrația de produs format în funcție de concentrația substratului:

$$[P_1] = [P_2] = s_0 - s \quad \text{unde } s \text{ este concentrația de substrat în momentul } t \text{ al reacției.}$$

Expresia ecuației de viteză pentru reacția de hidroliză a trigliceridelor, considerată reacție de ordinul doi cu două substraturi este :

$$-\frac{ds}{dt} = k_1 [S][H_2O] - k_{-1} [P_1][P_2] \quad (2.7)$$

Concentrația apei se poate considera constantă, fiind mult mai mare decât a esterului, deci ecuația de viteză devine :

$$-\frac{ds}{dt} = k_1' \cdot s - k_{-1} (s_0 - s)^2 \quad (2.8)$$

Gradul de hidroliză r la un moment dat t al reacției se poate exprima în funcție de concentrația substratului s :

$$r = \frac{s_0 - s}{s_0} \quad (2.9)$$

Pornindu-se de la ecuația de viteză (2.8), au fost stabilite următoarele relații pentru constantele de viteză ale reacțiilor directă și inversă, precum și pentru variația gradului de hidroliză în funcție de timp:

$$k_1' = \frac{R}{R-2} \cdot \frac{1}{T} \cdot \ln\left(\frac{1}{3-R}\right) \quad (2.10)$$

$$k_{-1} = \frac{1-R}{R^2} \cdot \frac{1}{s_0} \cdot k_1' \quad (2.11)$$

$$r = \frac{(1-\alpha) \cdot R}{1 + (1-R) \cdot \alpha} \quad (2.12)$$

unde:

$$\alpha = \left(\frac{1}{3-R}\right)^{\frac{1}{T}}$$

Există deci două modalități de a calcula gradul de hidroliză în funcție de timp, fie cu ajutorul ecuației (2.5), fie cu ajutorul ecuației (2.12). Diferența constă în faptul că pornind de la valorile constantelor R și T determinate pe baza datelor experimentale prin optimizarea ecuației (2.5), se pot calcula valorile constantelor de viteză k_1' și k_{-1} .

Acest model a dat rezultate apropiate de cele experimentale în cazul reacției de hidroliză a seului de vită cu lipază din *Pseudomonas fluorescens*.

2.2. Cinetica hidrolizei enzimatică cu lipaze în sisteme bifazice apă-solvenți organici

S-a constatat de mai mulți cercetători că în prezența solvenților organici și a substanțelor tensioactive a crescut stabilitatea emulsiilor și viteza de hidroliză a trigliceridelor.

Acest lucru a fost pus în legătură cu modificarea stării de hidratare a substratului, așa cum s-a arătat în capitolul precedent.

Astfel de solvenți s-au dovedit a fi izooctanul, n-heptanul și n-hexanul [95]. Cele mai bune rezultate s-au obținut în cazul includerii enzimei în micelii inverse apă-agent tensioactiv în solvenți organici. Asemenea micelii se formează în condiții strict determinate și există doar un număr redus de agenți tensioactivi și solvenți organici ce pot fi utilizați în acest scop [96].

Kery ș.a. au stabilit că hidroliza uleiului de măsline catalizată de lipaza pancreatică are loc în sisteme bifazice apă-izooctan în prezența unor emulgatori neionici, conținutul în apă raportat la izooctan putând fi variat în limite largi, fără modificarea apreciabilă a vitezei de reacție. Deci în acest caz nu s-a observat creșterea vitezei de reacție cauzată de prezența solventului organic [96].

Mukataka ș.a. au propus un model cinetic pentru sistemele de reacții bifazice solvent organic/apă catalizate de enzime, model ce a fost testat pe reacția de hidroliză a seului de vită cu lipază din *Candida cylindracea* [95]. În asemenea sisteme, în care triglicerida este dizolvată în solventul organic, în timp ce lipaza este dizolvată într-o soluție apoasă (în general o soluție tampon), reacția are loc tot la interfață. Ecuația vitezei de reacție trebuie să clarifice mecanismul facilitării reacției de către solventul organic, să cuprindă influența raportului celor două faze și a ariei interfaciale dintre acestea.

S-a plecat de la o schemă de reacție de tip Michaelis-Menten clasică:



Concentrația complexului enzimă-substrat se consideră a fi constantă. Dacă se notează cu $(E)_i$, $(S)_i$ și $(ES)_i$ concentrațiile enzimei, substratului și complexului enzimă-substrat la interfață, se poate scrie:

$$\frac{d(ES)_i}{dt} = (E)_i \cdot (S)_i - (k_{-1} + k_2) \cdot (ES)_i = 0 \quad (2.13)$$

Pentru simplificarea mecanismului, s-a presupus că fiecare din aceste concentrații este proporțională cu concentrația speciei respective în faza apoasă, respectiv în faza de solvent organic :

$$(E)_i = \frac{C_1 E}{V(1-\theta)} \quad (2.14)$$

$$(S)_i = \frac{C_2 S}{V \cdot \theta} \quad (2.15)$$

unde E și S reprezintă numărul de molecule de enzimă și respectiv substrat în sistemul de reacție, V este volumul total al amestecului de reacție, θ fracțiunea de solvent organic ce conține triglicerida, iar C_1 și C_2 sunt constante de proporționalitate.

Dacă se notează cu a aria interfacială raportată la unitatea de volum de amestec de reacție, iar cu $(E)_0$ și (S) concentrațiile totale ale enzimei și substratului în amestecul de reacție, ecuațiile (2.14) și (2.15) devin:

$$(E)_i = \frac{C_1}{1-\theta} [(E)_0 - a(ES)_i] \quad (2.16)$$

$$(S)_i = C_2 \frac{S}{\theta} \quad (2.17)$$

După înlocuirea ecuațiilor (2.16) și (2.17) în ecuația (2.13) s-a obținut pentru concentrația complexului enzimă-substrat la interfață relația:

$$(ES)_i = \frac{\frac{1}{a} (E_0)(S)}{\frac{(k_{-1} + k_2) \cdot \theta \cdot (1 - \theta)}{k_1 \cdot C_1 \cdot C_2 \cdot a} + (S)} = \frac{\frac{1}{a} (E_0)(S)}{K_m \frac{\theta(1 - \theta)}{a \cdot C_1 \cdot C_2} + (S)} \quad (2.18)$$

unde:
$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

În consecință, viteza de formare a produsului, raportată la unitatea de volum, se poate reda prin ecuația:

$$v = k_2 \cdot (ES)_i \cdot a = \frac{k_2 \cdot (E_0)(S)}{\frac{\theta}{K_m \cdot \frac{1 - \theta}{a \cdot C_1 \cdot C_2}} + (S)} = \frac{V_m(S)}{K'_m + (S)} \quad (2.19)$$

unde : $V_m = k_2 \cdot (E_0)$

$$K'_m = K_m \cdot \frac{\theta}{a \cdot C_1 \cdot C_2} \quad (2.20)$$

Se observă că s-a obținut o ecuație finală (2.19) similară unei ecuații de tip Michaelis-Menten pentru sistemele de reacție omogene.

Din ecuația (2.20) se vede că valoarea constantei Michaelis aparente K'_m se schimbă în funcție de fracțiunea fazei de solvent organic, chiar dacă constantele de viteză nu se modifică. Ecuația (2.18) nu cuprinde efectul inhibiției produșilor asupra vitezei de reacție, de aceea nu poate fi utilizată pentru modelarea cinetică a evoluției reacției în timp, ci doar pentru investigarea efectului solventului organic asupra parametrilor V_m și K_m pe baza datelor de viteză inițială.

Acest model cinetic a fost testat pentru reacția de hidroliză a seului de vită în trei sisteme bifazice solvent organic/soluție tampon, utilizând n-hexan, n-heptan și izooctan în concentrație de 30 % (vol.) în raport cu faza apoasă și o viteză de agitare în reactor de 500 rot/min. Măsurarea ariei interfaciale s-a făcut experimental, cu ajutorul unor fotografii microscopice. Reactorul a fost prevăzut la unele experimente cu șicane (în număr de 4). Reprezentarea de tip Lineweaver-Burk a arătat o dependență liniară a inversei vitezelor inițiale în raport cu inversele concentrației de substrat, cu valori diferite pentru constantele Michaelis aparente (panta dreptelor) în funcție de natura solventului organic și prezența șicanelor și cu aceeași valoare a vitezei maxime de reacție V_m .

Valorile constantelor Michaelis aparente K'_m și $a \cdot K'_m$ pentru cei trei solvenți organici utilizați sunt dați în tabelul 2.1.

Tabelul 2.1. Constante Michaelis aparente pentru hidroliza seului de vită cu lipază din *Candida cylindracea* în sisteme bifazice apă-solvent organic [95].

Parametrul	Izooctan		n-Heptan		n-Hexan	
	A	B	A	B	A	B
K_m' (kg/cm ³)	0,045	0,065	0,30	0,33	0,46	0,54
a (cm ⁻¹)	110	70	56	52	47	44
$a \cdot K_m'$ (g/cm ⁴)	4,95	4,55	16,8	17,3	21,7	24,0

A = cu șicane; B = fără șicane

Se observă că cea mai scăzută valoare pentru K_m' , care indică cea mai bună afinitate a lipazei pentru substrat, s-a înregistrat în cazul izooctanului. De asemenea, s-a constatat că valoarea constantei Michaelis aparentă este influențată de parametrii care determină mărimea ariei interfaciale dintre cele două faze: existența șicanei, turația, concentrația fazei organice. Pe ansamblu, autorii susțin că acest model, cu limitele arătate, poate fi aplicat pentru cinetica hidrolizei în sisteme bifazice.

Un model cinetic mult mai complex, care ține cont de particularitățile transferului de masă într-un sistem bifazic, a fost elaborat de Miyake ș.a. [98]. Ei au presupus că enzima nu se dizolvă în faza organică, în timp ce substratul este distribuit între cele două faze. Profilele de concentrații pentru produs (P), substrat (S) și enzimă (E) sunt prezentate în figura 2.3.

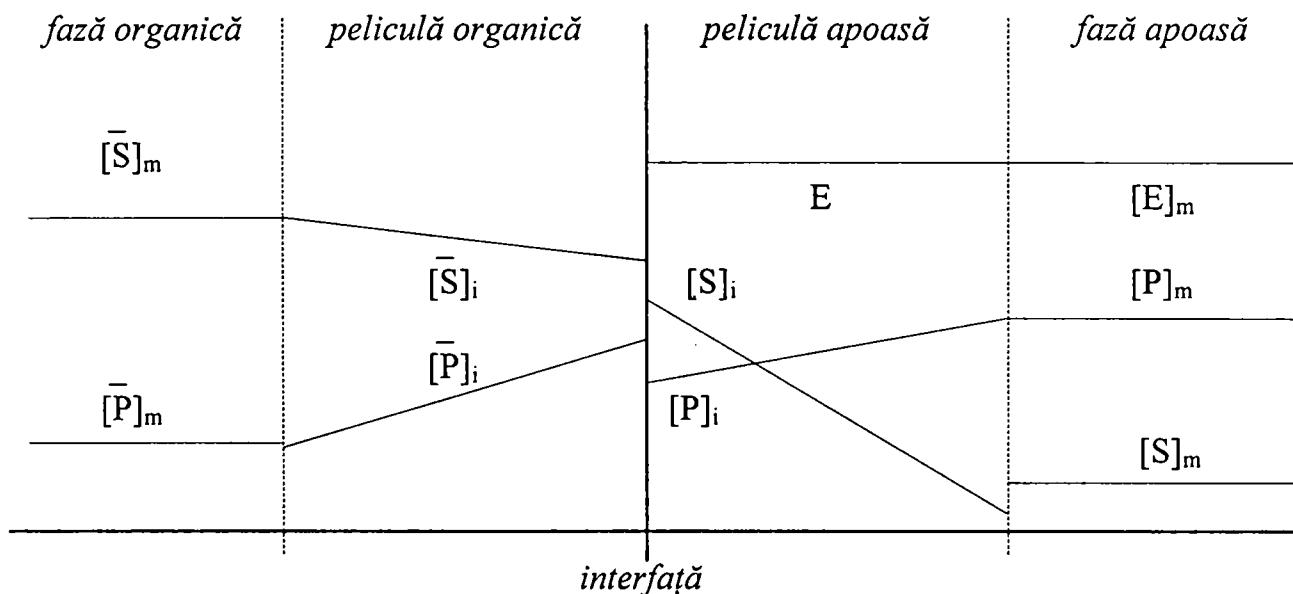


Figura 2.3. Schema profilelor de concentrații pentru reacțiile catalizate de enzime în sisteme bifazice

Concentrațiile în cele două faze sunt constante, ele se schimbă doar în apropierea interfeței, unde există două pelicule stagnante a căror grosime depinde de agitare, fiind între 10-100 μm . Există trei locuri în care reacția are loc: la interfață, în interiorul peliculei apoase și în interiorul mediului apos. Analiza contribuției acestora la desfășurarea reacției globale s-a făcut pe baza teoriei celor două pelicule [98].

Evoluția în timp a concentrației produsului în mediul organic $[P]_m$ poate fi modelată cu ajutorul ecuației:

$$[P]_m = I_1(t) + B_1(t) \quad (2.21)$$

în care termenii $I_1(t)$ și $B_1(t)$, funcții de timp, exprimă contribuția reacției la interfață, respectiv a reacțiilor în fazele peliculară apoasă stagnantă și apoasă, având următoarele expresii:

$$I_1(t) = P_p (1+P_p)^{-1} k_w^{-1} [(a \cdot k_w t + (1-a_w k_w \tau_2) \cdot \{1 - \exp(-t/\tau_2)\})] \delta r_s \quad (2.22)$$

$$B_1(t) = P_p (1+P_p)^{-1} [S]_i [A_2 t + (A_1 + A_3 - A_2 \tau_2) \cdot \{\exp(-t/\tau_1) - \exp(-t/\tau_2)\}] \quad (2.23)$$

Parametrii A_1 , A_2 și A_3 au următoarele expresii:

$$A_1 = \beta - 1$$

$$A_2 = a k_w \beta \{1 - a k_w \beta \tau_1 / \cosh^2(\alpha x_L)\}$$

$$A_3 = \beta^2 (a k_w \tau_1 - 1) (a k_w \beta \tau_1) / \cosh^2(\alpha x_L)$$

unde:

$$\alpha_1 = (k_b + a k_w \beta)^{-1}$$

$$\alpha_2 = (k_w + k_0 P_p) \{a k_0 k_w (1+P_p)\}^{-1}$$

$$\beta = \alpha x_L / \tanh(\alpha x_L)$$

$$\alpha = (k_b / D)^{0,5}$$

Parametrii care intervin în aceste expresii au următoarele semnificații:

a - aria interfacială specifică (cm^{-1})

D - difuzivitatea ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$)

k_b - constanta globală de viteză (s^{-1})

k_w - coeficientul de transfer de masă în pelicula stagnantă apoasă ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)

k_0 - coeficientul de transfer de masă în pelicula stagnantă organică ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)

x_L - grosimea peliculei stagnante (cm)

t - timpul (s)

P_p - constantă de repartiție

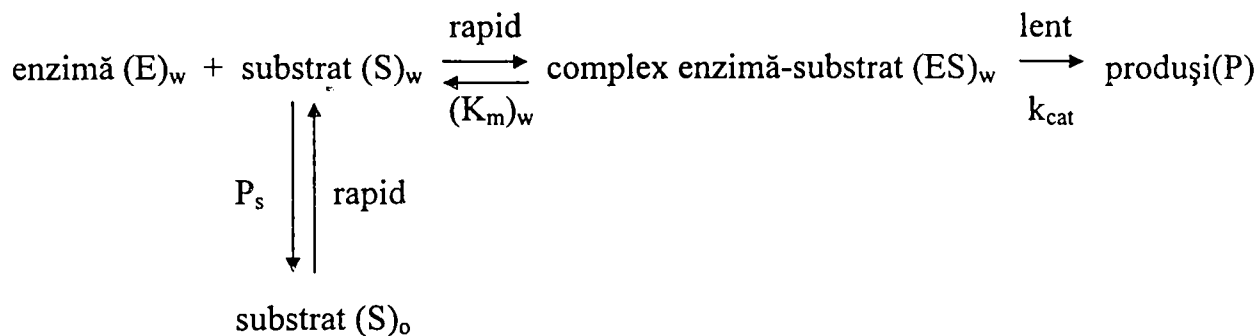
$[S]_i$ - concentrația substratului în faza peliculară apoasă (mol / cm^3)

a_w - aria interfacială specifică pe unitatea de volum fază apoasă (cm^{-1}).

Acest model a fost testat pe reacția de hidroliză a esterilor 2-naftolului cu lipază din *Rhizopus delemar*, utilizând ca fază organică n-heptanul, iar ca fază apoasă soluție tampon fosfat de pH 7,0, 1/30 M. S-au determinat parametrii cinetici ai reacției la interfață, care sunt mult mai mari decât în cazul aceleiași reacții în fază apoasă, dovedind activarea importantă a enzimei la interfață.

Așa cum s-a mai arătat, lipaza își menține activitatea catalitică și în microemulsii de tip apă în ulei (W/O) (așa-numitele micelii inverse), în prezența unui agent tensioactiv, bis(2-etil-hexil)-sulfosuccinatul de sodiu, notat AOT. Fletcher și Robinson au studiat cinetica hidrolizei într-un astfel de tip de microemulsie, conținând apă, n-heptan și AOT [99].

Întrucât lipaza nu este solubilă în heptan, se va găsi exclusiv în interiorul picăturilor de microemulsie apoasă, în timp ce substratul esteric se va găsi de preferință în interiorul fazei organice. Schema de reacție poate fi redată într-o primă aproximație astfel:



Indicii w și o înseamnă localizarea speciei respective în interiorul picăturii de apă sau în faza organică. $(K_m)_w$ este constanta Michaelis a formării complexului enzimă-substrat, iar k_{cat} este constanta de viteză pentru reacția de descompunere a complexului Michaelis.

P_s este coeficientul de repartiție al substratului, egal cu raportul concentrațiilor în cele două faze:

$$P_s = \frac{[S]_w}{[S]_o} \quad (2.24)$$

Pentru viteza inițială a reacției se poate scrie expresia:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k_{\text{cat}} \cdot [E]_T \cdot [S]_T}{(K_m)_{\text{ap}} + [S]_T} \quad (2.25)$$

unde indicele T indică faptul că concentrația este exprimată ca număr de moli pe unitate de volum total a mediului microemulsionat (și nu a unuia din cele două pseudofaze).

Constanta Michaelis aparentă $(K_m)_{\text{ap}}$ este dependentă de constanta reală $(K_m)_w$ în pseudofaza apoasă (în care are loc reacția) prin intermediul relației:

$$(K_m)_{\text{ap}} = \frac{(K_m)_w \cdot [1 + \theta(P_s - 1)]}{P_s} \quad (2.26)$$

unde θ este fracția volumetrică a pseudofazei apoase.

În cazul unei substrat solubil în apă ($P_s \gg 1$) avem

$$(K_m)_{\text{ap}} = (K_m)_w - \theta \quad (2.27)$$

iar pentru un substrat solubil în faza organică ($P_s \ll 1$) obținem:

$$(K_m)_{\text{ap}} = \frac{(K_m)_w(1 - \theta)}{P_s} = \frac{(K_m)_w}{P_s} \quad \text{dacă } \theta \ll 1 \quad (2.28)$$

Acest model cinetic a fost aplicat la hidroliza p-nitrofenil-octanoatului cu lipază din *Chromobacterium viscosum*. Reprezentarea Lineweaver-Burk a avut forma unei drepte, ceea ce arată că poate fi considerată o cinetică de tip Michaelis-Menten.

Întrucât $(K_m)_{\text{ap}}$, care este o constantă de disociere, este mult mai mare decât $[S]_T$, ecuația (2.25) poate fi scrisă sub forma:

$$v = \frac{k_{cat} \cdot [E]_T \cdot [S]_T}{(K_m)_{ap}} \quad (2.29)$$

În practică este mai simplu să se definească o constantă de ordinul 2, k_2 :

$$v = k_2 [E] [S]_T \quad (2.30)$$

unde:

$$k_2 = C \frac{k_{cat}}{(K_m)_{ap}} = C \frac{k_{cat} \cdot P_s}{(K_m)_w} \quad (2.31)$$

în care C este o constantă și este necesară deoarece concentrația enzimei este aici exprimată în g/cm^3 de soluție totală, masa moleculară a enzimei fiind necunoscută. Așadar k_2 se exprimă în unități de $cm^3 \cdot g^{-1} \cdot s^{-1}$. Experimental s-au determinat influențele diferiților parametri asupra constantei k_2 . S-a constatat însă că microemulsiile reprezintă un sistem mult mai complex, față de care modelul cinetic adoptat s-a dovedit a fi prea simplificat.

Modelul cinetic cu un singur substrat elaborat de Kosugi și Suzuki [97], care a fost prezentat în capitolul anterior, are dezavantajul că nu ține cont de influența apei asupra echilibrului hidrolitic al reacției, considerându-se că concentrația acestuia rămâne constantă. Acest lucru este valabil în cazul reacțiilor de hidroliză în emulsii apoase, unde excesul de apă este foarte mare, dar nu și în cazul când reacția are loc în sistem bifazic, în micelii inverse AOT-solvent organic. Han și Rhee [100] au îmbunătățit modelul precedent adoptându-l pentru aceste sisteme. Relația obținută modelează valoarea conversiei parțiale (X) în funcție de timp (t):

$$X = \frac{(1 - \alpha) \cdot X_e}{1 + \left[1 - \left(1 + \frac{A_0}{W_0} \right) X_e \right] \cdot \alpha} \quad (2.32)$$

$$\text{unde } \alpha = \left[3 - \left(1 + \frac{A_0}{W_0} \right) X_e \right]^{-\frac{t}{t_m}} \quad (2.33)$$

iar t_m este timpul de reacție după care se ajunge la

$$X = X_e / 2.$$

A_0 reprezintă concentrația inițială a substratului hidrolizat, W_0 concentrația inițială a apei, iar X_e conversia la echilibru.

În condițiile în care excesul de apă este mare, raportul $A_0 \cdot X_e / W_0$ din ecuația (2.32) tinde spre zero și ecuația (2.32) devine identică cu relația găsită de Kosugi și Suzuki. Acest model a fost experimentat în reacția de hidroliză a uleiului de măsline cu lipază din *Candida cylindracea* într-un sistem de micelii inverse AOT-izooctan. S-a constatat că conversia maximă a esterului a crescut în general cu creșterea concentrației inițiale de apă, ceea ce confirmă faptul că acest sistem poate fi considerat ca o reacție cu două substraturi. Ecuația (2.32) permite anticiparea conversiei de echilibru, dacă se cunosc concentrațiile inițiale și constanta de echilibru a reacției (calculată dintr-o determinare anterioară).

2.3. Cinetica reacțiilor de esterificare și transesterificare în solvenți organici, catalizate de lipaze

Realizarea reacțiilor de esterificare și transesterificare catalizate de lipaze se poate face în sisteme bifazice, în care concentrația apei trebuie redusă cât mai mult pentru a evita reacția de hidroliză. Așa cum s-a observat de mai mulți cercetători, viteza acestor reacții în solvenți organici v_A crește cu concentrația substratului (A), în conformitate cu ecuația Michaelis-Menten:

$$v_A = \frac{V_A \cdot [A]}{K_A + [A]} \quad (2.34)$$

Mai târziu s-a propus un mecanism de tip ping-pong, incluzând formarea unui intermediar de tip acil-enzimă [90].

Când în amestecul de reacție sunt prezente în același timp două substraturi (A și B), se poate defini un factor competitiv α , drept raportul capacităților catalitice ale lipazei în cele două reacții [101]:

$$\alpha = \frac{\frac{V_A}{K_A}}{\frac{V_B}{K_B}} \quad (2.35)$$

Acest lucru este valabil și pentru doi enantiomeri ai aceluiași substrat. Factorul competitiv poate fi calculat cu una din relațiile următoare:

$$\frac{V_A}{V_B} = \alpha \cdot \frac{[A]}{[B]} \quad (2.36)$$

$$\log\left(\frac{[A]}{[A]_0}\right) = \alpha \cdot \log\left(\frac{[B]}{[B]_0}\right) \quad (2.37)$$

Dacă de exemplu se utilizează doi esteri ai aceluiași acid (AcX și AcY) drept donori de acil, se poate calcula un **factor competitiv donor** α_D (fig. 2.4, săgețile pline). Dacă se utilizează 2 acceptori (X și Y), se poate calcula un **factor competitiv acceptor** α_A (fig. 2.4, săgețile întrerupte):

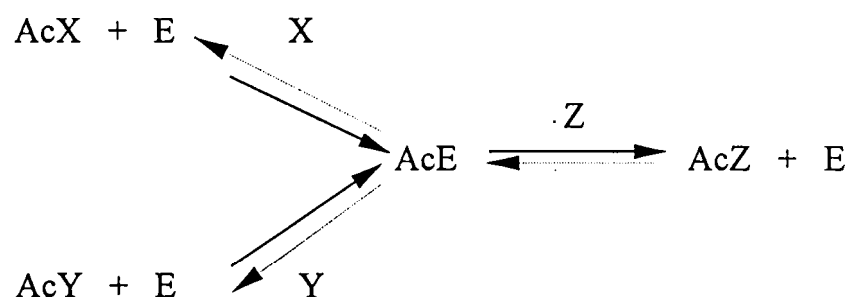


Figura 2.4. Modelul cinetic al reacțiilor cu două substraturi competitive [101]

Factorii competitivi se calculează din reprezentarea variației concentrațiilor de substrat (A și B) în funcție de timp, în conformitate cu ecuația (2.37).

Din valorile determinate experimental ale unor factori competitivi donori α_D pentru diferite cupluri de donori de acil AcX și AcY, în reacții de transesterificare, s-a constatat că ele sunt independente de natura alcoolului utilizat ca acceptor de acil. De asemenea, valorile α_D au fost identice și în cazul utilizării de lipaze microbiene de diferite proveniențe, cât și la utilizarea a diferite concentrații de substrat. Se poate deci trage concluzia că avem de-a face cu o proprietate generală a reacțiilor în solvenți organici catalizate de lipaze.

În același context, s-a constatat că factorii competitivi acceptori α_A au aceleași valori indiferent de natura esterului (AcZ) utilizat ca donori de acil și de natura lipazei folosite.

Utilizarea factorilor competitivi reprezintă o cale simplă de a descrie cinetica reacțiilor cu două substraturi, catalizate de lipaze. Trebuie însă menționat că acest lucru nu este valabil și în cazul sistemelor bifazice unde, așa cum s-a văzut, cinetica este mult mai complicată.

Domeniul de aplicare al modelului a fost extins în continuare pentru calculul constantelor de echilibru. Aplicând ecuația lui Haldane următorului echilibru:



se poate corela constanta de echilibru cu factorii competitivi:

$$K_{eq} = \frac{\alpha_D}{\alpha_A} = \frac{\frac{V_{AcX}}{K_{AcX}} \cdot \frac{V_Y}{K_Y}}{\frac{V_{AcY}}{K_{AcY}} \cdot \frac{V_X}{K_X}} \quad (2.39)$$

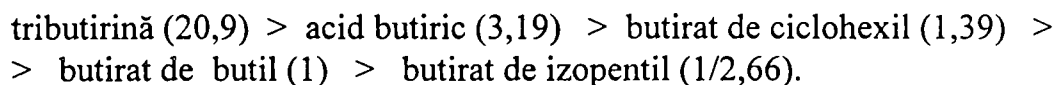
Factorii competitivi determinați pentru diferiți donori (AcX și AcY) și alcool lauric ca acceptor (Z), respectiv pentru diferiți alcooli (X,Y) ca acceptori și tributirină (AcZ) ca donori, conform schemei din figura 2.4, sunt redate în tabelul 2.2.

Tabelul 2.2. Valori calculate pentru factorii competitivi donori și acceptori [101]

(X, Y):	Factor competitiv donori	Factor competitiv acceptor	α_D/α_A	K_{eq}
	AcX, AcY = butiril ester Z = alcool lauric α_D	AcZ = tributirină X, Y = alcooli α_A		
butil/ izopentil	$2,58 \pm 0,10$	$3,91 \pm 0,07$	0,66	0,56
ciclohexil/ izopentil	$3,66 \pm 0,11$	$1,13 \pm 0,07$	3,2	3,1
ciclohexil/ butil	$1,39 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,29$	4,6	4,9

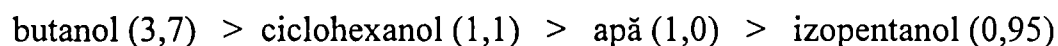
Constantele de echilibru s-au calculat prin măsurarea concentrațiilor de substrat și produs la echilibru, comparându-se cu valorile calculate din rapoartele α_D/α_A . Se poate observa că valorile sunt identice, în limita erorilor experimentale.

O aplicație importantă a acestui model este clasificarea donozilor, respectiv a acceptozilor de acil, în funcție de factorii lor competitiv. Din rezultatele obținute, luând drept referință butiratul de butil, se poate deduce următoarea scară a donozilor de acil (pentru lipaza din *Candida cylindracea*):

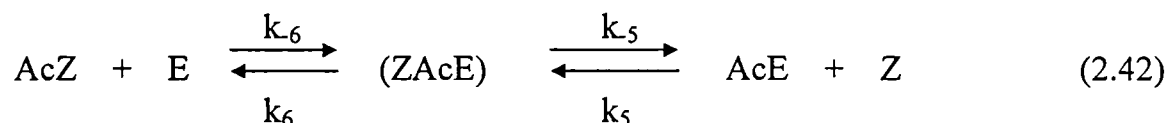
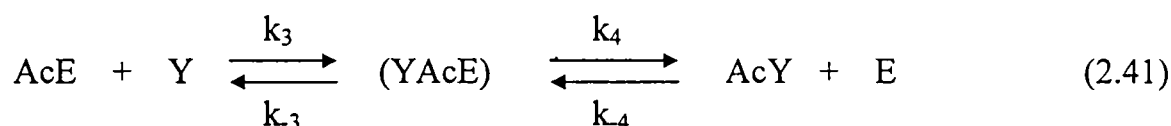
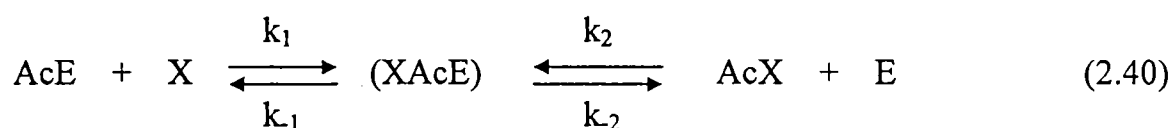


Așadar se poate compara ușor reactivitatea unor donozori de acil în reacții de transesterificare în mediu organic.

Pentru acceptozii de acil, se poate stabili următoarea ordine în cazul transferului grupei butiril cu lipază din *Candida cylindracea*:



Acest model cinetic competitiv a fost extins de aceiași autori pentru a se putea simula evoluția reacției de transesterificare [102]. Plecându-se de la schema de reacție care a fost prezentată în figura 2.4, se pot scrie următoarele echilibre parțiale:



unde E și AcE reprezintă enzima liberă, respectiv acilată, Ac este gruparea acil care se transferă, iar (XAcE), (YAcE) și (ZAcE) sunt complecșii enzimă-substrat corespunzător.

Dacă se cunosc concentrațiile la echilibru ale nucleofililor (X,Y), sistemul poate fi modelat prin analiza cinetică a ecuațiilor (2.40) și (2.41), conform modelului competitiv.

Viteza acilării lui X, pe care-l considerăm compusul care reacționează mai repede, poate fi scrisă:

$$\frac{d\text{AcX}}{dt} = -\frac{d\text{X}}{dt} = k_2(\text{XAcE}) - k_{-2} \cdot \text{AcX} \cdot \text{E} \quad (2.43)$$

În condițiile stării staționare, când $d(\text{XAcE})/dt = 0$, avem:

$$(\text{XAcE}) = \frac{k_1}{k_2 + k_{-1}} \text{AcE} \cdot \text{X} + \frac{k_{-2}}{k_2 + k_{-1}} \text{AcX} \cdot \text{E} \quad (2.44)$$

Combinarea ecuațiilor (2.43) și (2.44) duce la:

$$\frac{dAcX}{dt} = \frac{k_1 \cdot k_2}{k_{-1} + k_2} AcE \left[X - \frac{k_{-1} \cdot k_{-2}}{k_1 \cdot k_2} \cdot \frac{E}{AcE} \cdot AcX \right] \quad (2.45)$$

Se introduc parametrii Michaelis (V_x, K_x) și constanta de echilibru a ecuației (2.40) (Ke_x):

$$\begin{aligned} V_x &= k_2 \cdot E \cdot t \\ K_x &= \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \\ Ke_x &= \frac{k_1 \cdot k_2}{k_{-1} \cdot k_{-2}} \end{aligned} \quad (2.46)$$

Relația (2.45) devine :

$$\frac{dAcX}{dt} = \frac{V_x}{K_x} \cdot \frac{AcE}{E_t} \cdot \left[X - \frac{E}{AcE - Ke_x} (X_0 - X) \right] \quad (2.47)$$

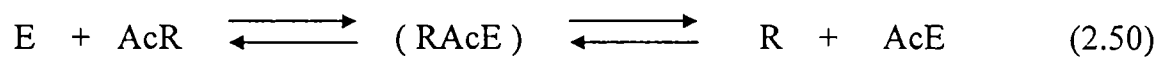
unde E_t este concentrația totală a enzimei, iar X_0 concentrația molară inițială a compusului X. Similar, pentru compusul Y se ajunge la relația :

$$\frac{dAcY}{dt} = \frac{V_y}{K_y} \cdot \frac{AcE}{E_t} \cdot \left[Y - \frac{E}{AcE \cdot Ke_y} (Y_0 - Y) \right] \quad (2.48)$$

Combinarea ecuațiilor (2.47) și (2.48) duce la relația independentă de timp:

$$\frac{dAcX}{dAcY} = \frac{\frac{V_x}{K_x} \cdot \left[X - \frac{E}{AcE \cdot Ke_x} (X_0 - X) \right]}{\frac{V_y}{K_y} \cdot \left[Y - \frac{E}{AcE \cdot Ke_y} (Y_0 - Y) \right]} \quad (49)$$

Această expresie poate fi simplificată dacă se admite că raportul E/AcE este constant, ceea ce înseamnă că există condiția stării staționare pentru echilibrul redat de ecuația (50), independent de natura grupării acceptoare R (X,Y,Z):



Aceste condiții ne dau :

$$\frac{E}{AcE} = Ke_x \cdot \frac{X_e}{X_0 - X_e} = Ke_y \cdot \frac{Y_e}{Y_0 - Y_e} \quad (2.51)$$

unde X_e și Y_e sunt concentrațiile molare respective la echilibru. Introducându-se în ecuația (2.49) factorul competitiv acceptor:

$$\alpha_A = \frac{\frac{V_X}{K_X}}{\frac{V_Y}{K_Y}} \quad \text{avem:}$$

$$\frac{dAcX}{dAcY} = \alpha_A \cdot \frac{1 - \frac{Y_e}{Y_0}}{1 - \frac{X_e}{X_0}} \cdot \frac{X - X_e}{Y - Y_e} \quad (2.52)$$

sau:

$$\frac{dAcX}{dAcY} = A \cdot \frac{X - X_e}{Y - Y_e} \quad (2.53)$$

dacă se definește un factor de separare acceptor A:

$$A = \alpha_A \frac{1 - \frac{Y_e}{Y_0}}{1 - \frac{X_e}{X_0}} \quad (2.54)$$

Această constantă se poate calcula ușor cunoscând factorul competitiv α_A și concentrațiile molare inițiale, respectiv la echilibru ale componentelor X și Y.

Forma integrală a relației (2.53) este:

$$\text{Log} \frac{X - X_e}{X_0 - X_e} = A \cdot \text{Log} \frac{Y - Y_e}{Y_0 - Y_e} \quad (2.55)$$

Introducând rapoartele molare ale produșilor în această relație obținem:

$$\text{Log} \left(1 - \frac{AcX}{AcX_e} \right) = A \cdot \text{Log} \left(1 - \frac{AcY}{AcY_e} \right) \quad (2.56)$$

Expresii similare se obțin utilizând același raționament pentru reacția dintre doi compuși donori de acil (AcX și AcY) și un acceptor (Z). În acest caz se definește o constantă numită factor de separare donori D:

$$D = \alpha_D \cdot \frac{1 - \frac{AcY_e}{AcY_0}}{1 - \frac{AcX_e}{AcX_0}} \quad (2.57)$$

cea ce duce la următoarea relație între concentrațiile substraturilor:

$$\text{Log} \frac{AcX - AcX_e}{AcX_0 - AcX_e} = D \cdot \text{Log} \frac{AcY - AcY_e}{AcY_0 - AcY_e} \quad (2.58)$$

sau între concentrațiile produșilor:

$$\text{Log} \left[1 - \frac{X}{X_e} \right] = D \cdot \text{Log} \left[1 - \frac{Y}{Y_e} \right] \quad (2.59)$$

Se observă că selectivitatea reacției este determinată de valoarea factorului de separare (A sau D).

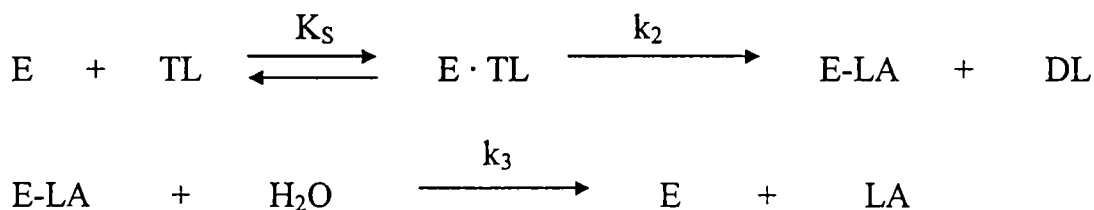
Acest model cinetic a fost utilizat cu succes în cazul unor reacții de esterificare și de transesterificare în solvenți organici. De asemenea s-a putut aplica la obținerea enantioselectivă a unor alcooli cum ar fi D(-)-mentolul.

Utilizând factorii competitivi determinați pe baza rezultatelor cinetice ale reacțiilor de transesterificare dintre esterii etilici ai unor acizi grași C₂-C₁₈ și n-propanol în solvenți organici, s-a stabilit o scală a reactivității diferiților donori de acil, ceea ce corespunde cu specificitatea lipazei față de acizii grași respectivi. Au fost testate mai multe lipaze comerciale. Se consideră că acest test simplu va fi foarte util pentru alegerea tipului de lipază care să fie utilizat la scară industrială pentru realizarea unei anumite reacții [103, 104].

De asemenea, pe baza factorilor competitivi determinați din rezultatele cinetice ale reacțiilor de transesterificare dintre caprilatul de izoamil și seria omoloagă de alcooli primari de la metanol la dodecanol, respectiv o serie de alcooli cu grad diferit de substituție, s-a determinat specificitatea față de alcooli a 17 lipaze comerciale. S-a constatat că, în funcție de această specificitate, ele pot fi grupate în 5 categorii [109].

Miller ș.a. au studiat cinetica reacțiilor de transesterificare, considerând că acestea au loc în două etape: o hidroliză inițială, urmată de reesterificare. S-au măsurat și comparat vitezele celor două reacții pentru reacția de hidroliză a trilaurinei, urmată de esterificarea dilaurinei cu acid lauric în ciclohexan, catalizată de lipaza din *Candida cylindracea* [105]. Etapa inițială de hidroliză a trilaurinei s-a considerat că respectă un mecanism de tip acil-enzimă, așa cum a fost demonstrat de alți cercetători.

Schema de reacție este:



unde E este lipaza, TL-trilaurina, DL-dilaurina, LA-acidul lauric, E-LA-acil enzima, K_S-constanta de echilibru, iar k₂ și k₃ constante de viteză.

Toate etapele reacției sunt reversibile, dar în faza inițială ea are loc numai de la stânga spre dreapta, așa cum se arată în schemă. Întrucât concentrația apei este mult mai mare decât cea a trilaurinei iar k₃ este în general mai mare decât k₂, expresia vitezei de reacție pentru acest mecanism poate fi scrisă:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [TL]}{K_m + [TL]} \quad (2.60)$$

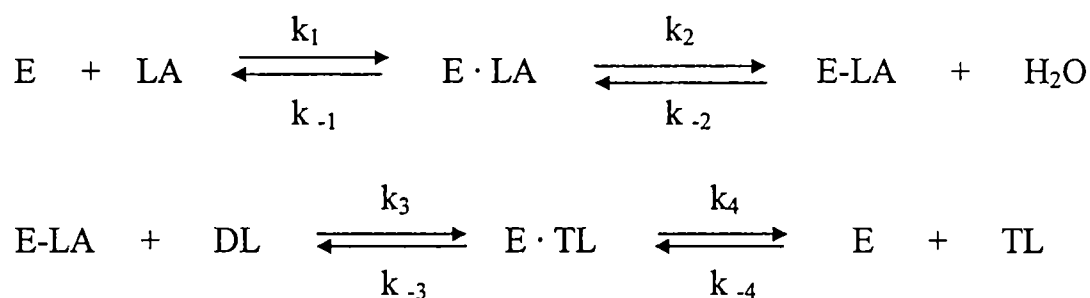
iar V_{max} și K_m pot fi exprimate în funcție de k₂, k₃ și K_S:

$$V_{\max} = \frac{[E]_0 \cdot k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3} \quad (2.61)$$

$$K_m = \frac{K_s \cdot k_3}{k_2 + k_3} \quad (2.62)$$

V_{\max} și K_m pot fi determinați experimental modificând concentrația trilaurinei și măsurând vitezele inițiale corespunzătoare.

Reacția de esterificare dintre dilaurină și acid lauric este inversa reacției de hidroliză. Acceptând ipoteza că mecanismul de tip acil-enzimă se aplică și în acest caz, se poate scrie următoarea schemă de reacție:



Acesta poate fi considerat un mecanism de tip ping - pong bi-bi bazat pe ordinea adăugării și eliberării substraturilor și produșilor. Dacă măsurăm vitezele inițiale și dacă dilaurina și acidul lauric sunt singurele specii prezente în proporții semnificative, putem presupune că reacția are loc numai spre dreapta. În aceste condiții expresia vitezei de reacție devine:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [LA] \cdot [DL]}{K_{mDL} [LA] + K_{mLA} [DL] + [LA][DL]} \quad (2.63)$$

Expresiile termenilor K_m și V_{\max} sunt:

$$K_{mLA} = \frac{k_4(k_2 + k_{-1})}{k_1(k_2 + k_4)} \quad (2.64)$$

$$K_{mDL} = \frac{k_2(k_{-3} + k_4)}{k_3(k_2 + k_4)} \quad (2.65)$$

$$V_{\max} = \frac{[E]_0 \cdot k_1 \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot k_4}{k_1 k_3 (k_2 + k_4)} \quad (2.66)$$

Valorile pentru K_m și V_{\max} se determină astfel: se măsoară viteza inițială de esterificare în funcție de concentrația dilaurinei la diverse concentrații de acid lauric. Se calculează o valoare aparentă V_{\max} pentru fiecare concentrație de acid lauric. Reprezentând grafic $1/V_{\max_{ap}}$ în funcție de $1/[LA]$ ordonata la origine a dreptei ne dă valoarea $1/V_{\max}$, iar panta acesteia este egală cu K_{mLA}/V_{\max} . K_{mDL} se calculează similar din reprezentarea Lineweaver-Burk a cărei pantă este egală cu K_{mDL}/V_{\max} .

S-a studiat și efectul transferului de masă, determinându-se că acesta nu influențează viteza de reacție. Așadar reacția este controlată cinetic. De asemenea, s-a stabilit că, în condițiile date, lipaza catalizează esterificarea de aproximativ trei ori mai rapid decât hidroliza.

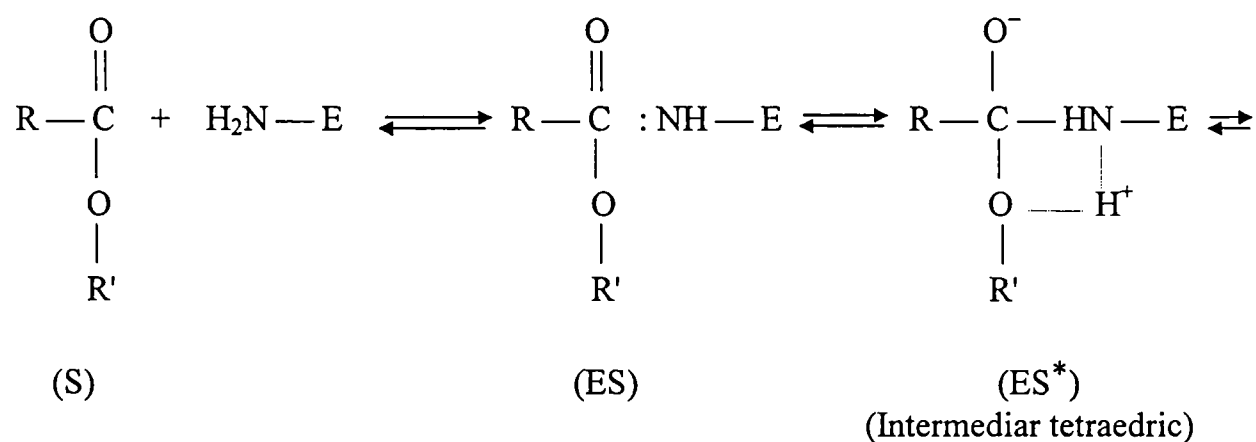
Din datele prezentate se poate trage concluzia că cinetica reacțiilor catalizate de lipaze este deosebit de complexă, necesitând o abordare diferită în funcție de condițiile în care se desfășoară: în emulsie apoasă, în sistem bifazic sau în mediu organic aparent lipsit de apă. Fiind vorba de reacții care au loc în medii eterogene, determinarea constantelor cinetice fundamentale este dificilă, ea făcându-se în condițiile unor aproximații care permit obținerea de date cât mai apropiate de cele experimentale. Alte probleme apar datorită influenței transferului de masă și a proprietăților fizice ale interfeței asupra cineticii reacțiilor catalizate de lipaze. Pentru simplificare este indicat să se lucreze în condiții în care efectul transferului de masă să nu fie limitativ. Analiza cinetică a sistemelor de reacție menționate se face în cele mai multe cazuri pe baza determinării vitezelor inițiale de reacție.

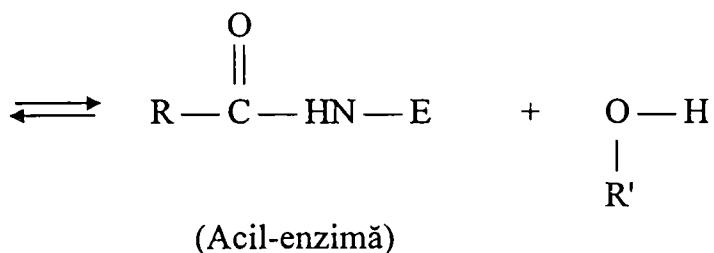
2.4. Mecanismul catalitic al reacțiilor catalizate de lipaze

Așa cum s-a arătat, compoziția centrului activ al lipazei din pancreas de porc a constituit tema multor cercetări. Brockerhoff și Jensen au susținut că lipaza este o serin-enzimă iar Semeriva și Desnuelle au afirmat că histidina se găsește în centrul activ propriu-zis [107]. După părerea lor, mecanismul catalitic al lipazei cuprinde trei etape: adsorbția la interfață, activarea la interfață și cataliza propriu-zisă. Serina și un rest de aminoacid cu grupă carboxil s-a considerat că sunt implicate în primele două etape, iar histidina în ce-a de-a treia. Acest rol al histidinei este însă discutabil, întrucât o serie de date experimentale demonstrează că lipaza acționează printr-un intermediar acil-enzimă. Gruparea imidazol a histidinei acționează însă în procesele enzimatice în general ca un catalizator acid-bază, măbind nucleofilicitatea grupelor hidroxil și tiol și, cu o excepție (grupele fosforil), nu are rol de catalizator nucleofil.

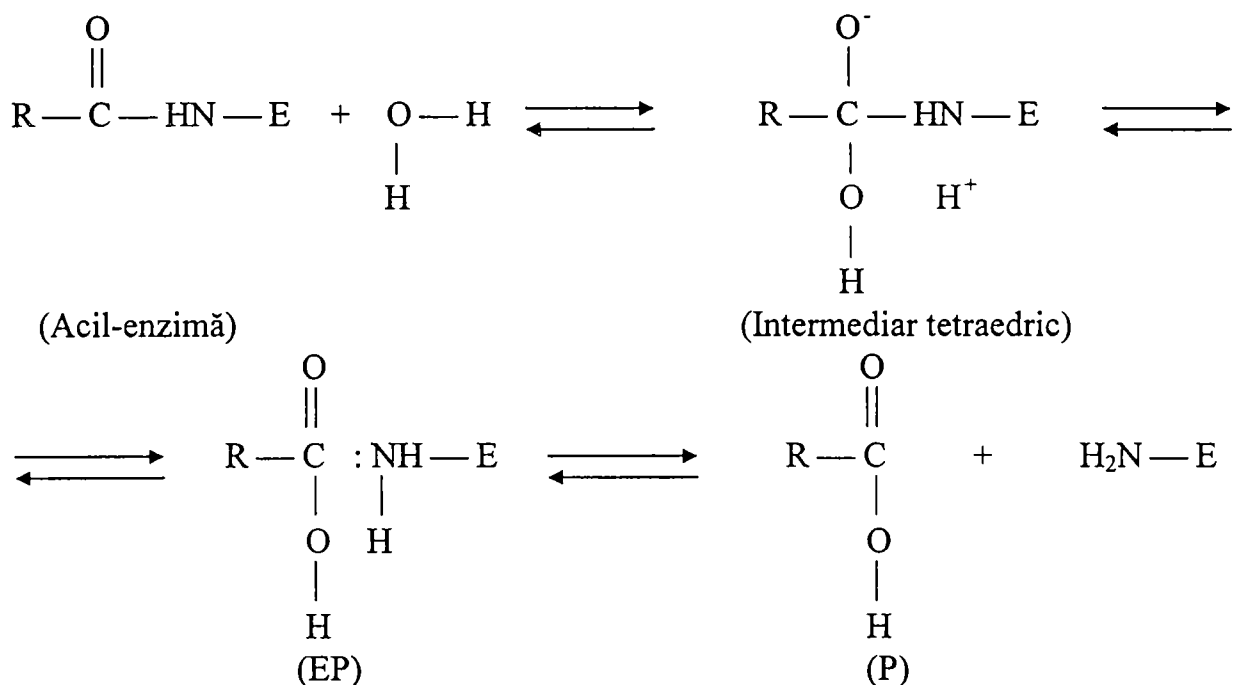
Mai recent s-a propus de către cercetători indieni [106] implicarea lizinei ca rest acilabil în mecanismul catalitic al lipazei pancreatice. În principiu există trei aminoacizi care ar putea funcționa în acest sens : tirozina, serina și lizina. Dintre acestea tirozina nu joacă nici un rol în activitatea enzimei, iar serina o consideră a fi implicată mai mult în activarea interfacială decât în cataliza propriu-zisă. Lizina poate face foarte bine acestor cerințe, așa cum se arată în schemele de reacție următoare:

I. Etapa de acilare





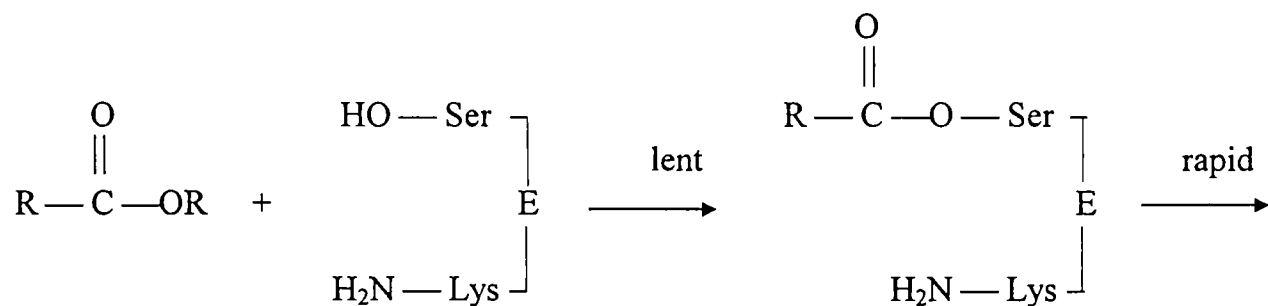
II. Etapa de dezacilare

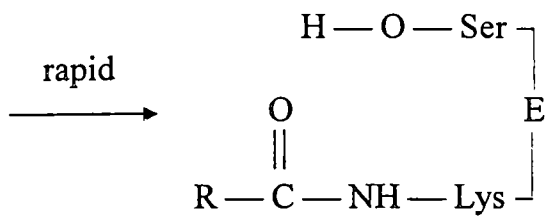


E - enzimă; S - substrat; ES - complex enzimă-substrat; ES* - complexul stării de tranziție; EP - complex enzimă-produs; P - produs.

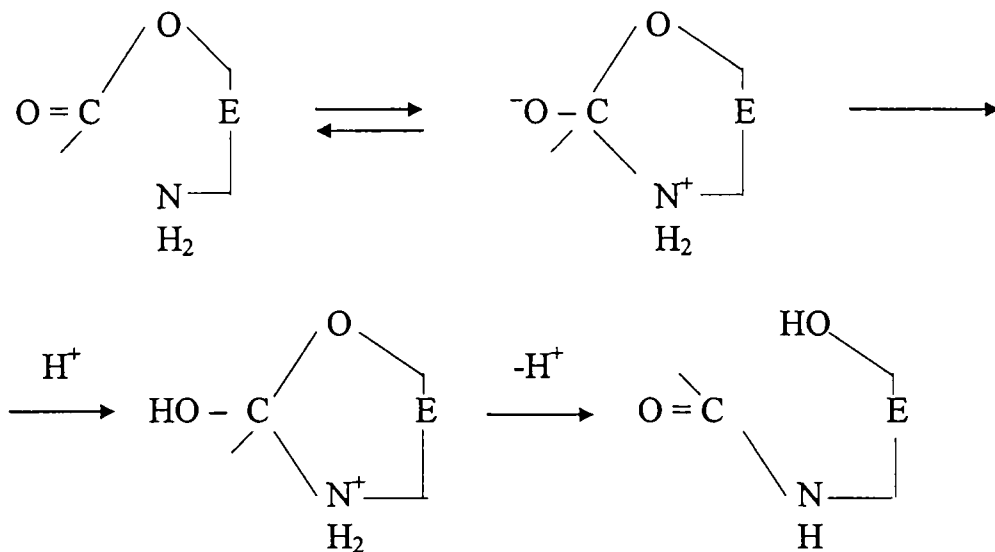
Intermediarul stării de tranziție se formează în urma unui atac nucleofil al grupei α-aminice a lizinei asupra substratului și este stabilizat datorită unor legături de hidrogen între enzimă și un atom de oxigen al substratului. Apoi prin ruperea legăturii C-O se formează intermediarul acil-enzimă. În etapa II aceeași secvență în ordine inversă determină formarea produsului și regenerarea enzimei libere.

Așa cum se știe, secvența serină-histidină-acid aspartic reprezintă o componentă esențială în mecanismul serin-proteinazelor. O serie de cercetări au arătat că ele sunt implicate în mod asemănător în mecanismul catalitic al lipazelor, însă acțiunea lor este independentă și nu conjugată [107]. Dacă se presupune că etapa de activare interfacială este atribuită acestor trei resturi de aminoacizi, ipoteza privind rolul lizinei în mecanismul catalitic poate fi completată conform schemei de mai jos:





În timpul activării interfaciale are loc acilarea la restul de serină, cu asistența resturilor de histidină și acid aspartic. Aceasta este etapa determinantă de viteză. În continuare, într-o etapă rapidă are loc transferul restului acil la lizina din centrul catalitic activ al enzimei [106].



Acest mecanism s-a putut susține cu argumente experimentale, întrucât s-a demonstrat că lipaza la care acest transfer este blocat prin inactivarea lizinei va funcționa ca o proteinază, după un mecanism similar cu cel al serin-proteinazelor.

3. Utilizarea lipazelor drept biocatalizatori în sinteze organice [311]

În majoritatea cărților și manualelor se afirmă că enzimele acționează în soluții apoase diluate. Cu toate acestea s-a demonstrat în prezent că o serie de enzime, printre care și lipazele, își păstrează activitatea catalitică și în amestecuri de reacție predominant organice [90]. Datorită solubilității crescute a reactanților, aceste sisteme oferă avantajul că lipazele devin catalizatori eficienți pentru reacții de sinteză [91]. Un aspect important legat de utilizarea lipazelor îl constituie specificitatea lor de poziție, referitoare la poziția grupei esterice din trigliceride pe care o atacă în mod preferențial și care a fost discutată anterior.

Mecanismul reacțiilor catalizate de enzimele hidrolitice implică formarea unor intermediari de tip acil-enzimă, care pot fi dezacilați sub acțiunea unor nucleofili: apă (hidroliză), alcooli (alcooliză) sau compuși aminici (aminoliză). Aceste reacții sunt reversibile, fiind posibile și transformările inverse, de exemplu formarea esterului dintr-un acid și un alcool [121] (figura 3.1):

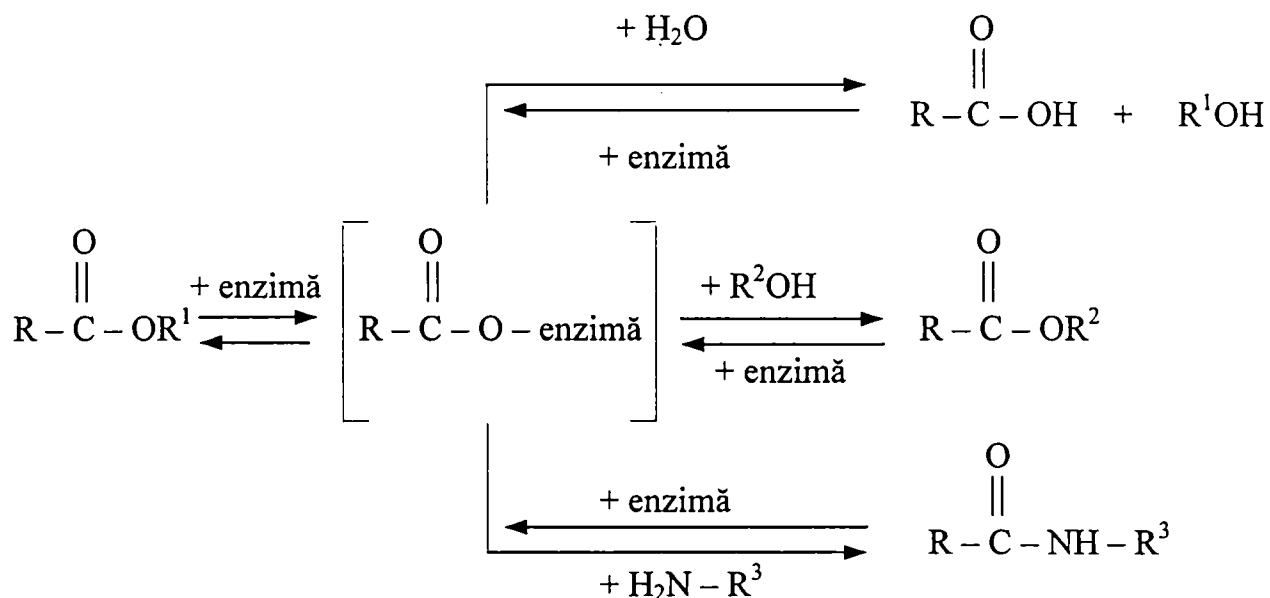


Figura 3.1. Transformări posibile catalizate de hidrolaze

Drept urmare, utilizarea lipazelor ca biocatalizatori pentru sinteze organice fine a fost orientată pe două direcții principale: reacții de hidroliză și reacții de sinteză [122]. Se poate afirma că la ora actuală există un număr foarte mare de potențiale utilizări ale acestor procese, mai ales pentru obținerea de diverși compuși utilizați în medicină și farmacie [123-126], în industria alimentară [127-134], în sinteza unor hormoni ai insectelor [135, 136] și chiar a unor polimeri [137-142] sau peptide [143, 144]. În continuare vor fi prezentate mai detaliat aplicațiile considerate semnificative în acest domeniu de mare viitor.

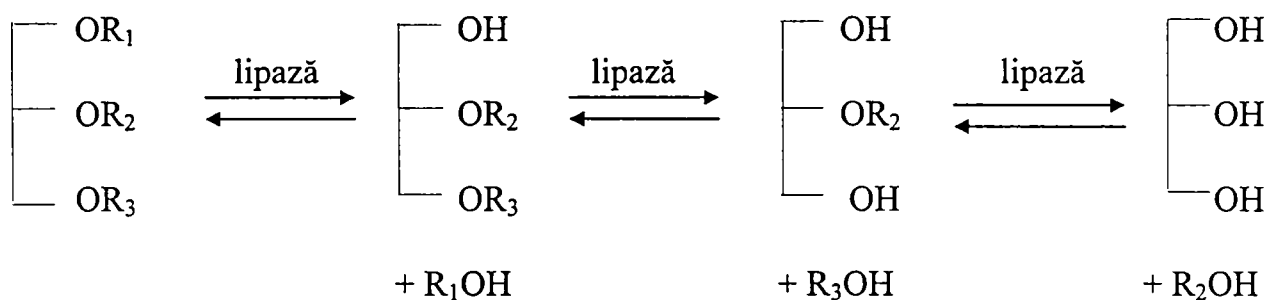
3.1. Reacții de hidroliză catalizate de lipaze

Așa cum s-a arătat, lipazele fiind enzime puțin specifice, ele catalizează alături de hidroliza trigliceridelor și reacția de hidroliză a unei foarte diverse categorii de alți esteri primari și secundari, alifatici și aromatici. Din punct de vedere practic de o deosebită

importanță este faptul că această hidroliză este adeseori enantioselectivă, permițând obținerea unor acizi și alcooli optic activi, compuși care pe căi clasice se sintetizează foarte greu.

3.1.1. Hidroliza trigliceridelor în cataliză enzimatică

Procesul industrial utilizat pe scară largă pentru obținerea acizilor grași cu catenă lungă din uleiuri și grăsimi naturale este procedeul Colgate-Emery. Acest procedeu are două dezavantaje principale: consumul energetic ridicat și pierderile datorită trigliceridelor reziduale. Din acest motiv apare tentanță posibilitatea înlocuirii procedeuului clasic cu un proces enzimatic ce se desfășoară la temperatură și presiune ambiantă [145].



$\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$ - resturi de acizi grași

Se știe că lipazele acționează în sisteme eterogene, de tip emulsii ulei-apă, reacția fiind precedată de adsorbția enzimei, dizolvată inițial în faza apoasă, la interfață. Folosirea unui asemenea sistem în scopuri industriale are însă o serie de dezavantaje:

- realizarea unei suspensii fine necesită turații mari ale agitatorului, deci consum energetic ridicat;
- separarea produsului din sistem este dificilă (necesită fie o centrifugare la turații mari, fie extracție cu un solvent organic);
- reutilizarea enzimei nu este posibilă decât în măsură mică datorită dificultăților de separare a enzimei adsorbite;
- sistemul nu se poate exploata decât discontinuu.

Trebuie remarcat că folosirea de solvenți organici drept medii de reacție nu rezolvă toate problemele menționate, întrucât și în acest caz reacțiile trebuie să se desfășoare în sisteme bifazice emulsionate. În aceste condiții, o serie de cercetări pentru elaborarea unor tehnologii de hidroliză a uleiurilor și grăsimilor catalizate de lipaze au fost orientate spre utilizarea enzimelor imobilizate, chiar dacă ele presupun utilizarea unor sisteme trifazice.

Studiile privind utilizarea lipazelor imobilizate pentru hidroliza trigliceridelor au fost axate următoarele direcții:

- creșterea randamentului în acizi grași prin hidroliza enzimatică a trigliceridelor reziduale rămase nehidrolizate în procedeul clasic.
- găsirea unor suporturi pentru imobilizarea lipazelor care să permită efectuarea reacției de hidroliză a trigliceridelor în reactoare enzimatică cu operare semicontinuuă sau continuă.
- hidroliza parțială a trigliceridelor cu lipaze 1,3-specifice, pentru a obține mono- și digliceride.

A fost studiată posibilitatea hidrolizării gliceridelor reziduale din fracțiunea brută de acizi nesaturați (71,1 % acid oleic, 7,1 % acid palmitoleic, 6,7 % acid linolenic, 8 %

gliceride reziduale) provenită de la hidroliza efectuată după procedeul Colgate-Emery. Pentru aceasta s-a folosit lipază din *Candida cylindracea* imobilizată prin adsorbție pe geluri pe bază de agaroză (Octyl și Phenil-Sepharose CL-4B) [146]. S-a determinat că aceste geluri se dispersează foarte bine în acizii grași, ceea ce se datorește probabil atât hidrofobicității gelului cât și polarității slabe a acizilor. Regenerarea gelului s-a făcut după separarea acestuia prin centrifugare prin introducerea gelului într-o coloană de sticlă și eluare cu etanol, urmată de spălare cu apă. Apoi gelul s-a tamponat cu soluție tampon fosfat 0,1 M de pH 7,0 și s-a reutilizat după adsorbția unei cantități identice de enzimă proaspătă. Activitatea gelului astfel regenerat s-a dovedit a fi identică cu cea inițială. Autorii estimează că utilizarea lipazei imobilizate pe acest tip de gel ar fi economică pentru mărirea randamentului în acizi grași obținuți din grăsimi naturale.

Pentru a elimina inconvenientele tehnologice legate de utilizarea unui sistem trifazic substrat/apă/enzimă imobilizată, s-a studiat posibilitatea realizării hidrolizei trigliceridelor într-un sistem continuu, în solvenți organici [146]. Drept catalizator s-au folosit miceli de *Rhizopus arrhizus*, iar ca solvent s-a utilizat diizopropileter. Încercările s-au făcut pe două tipuri de reactoare continue: cu pat fix și cu amestecare perfectă. S-a constatat că un reactor cu pat fix conținând un gram miceliu, la trecerea unei soluții de 2,5 % (greutate /volum) ulei de măsline în diizopropileter cu o viteză volumetrică de 1 ml/min, la 30°C, duce la obținerea unui randament de 45 % în acizi grași. Conținutul optim în apă al sistemului s-a determinat a fi 0,17 % (greutate/volum). În intervalul 20-50°C nu s-a observat un optim de temperatură. S-a ales temperatura de 30°C pentru a preîntâmpina dezactivarea prea rapidă a enzimei. Valorile calculate ale energiei de activare au fost între 13-20 kJ/mol, în funcție de temperatură, fiind mai mici decât cele raportate pentru lipază în emulsii apoase (21,9-100,4 kJ/mol în același domeniu de temperatură). Determinările experimentale efectuate nu au furnizat vreo dovadă în sensul că cinetica procesului ar fi limitată de difuziune. Scăderea activității catalizatorului a fost de 0,6-1% pe oră, la 30°C. Reactorul cu pat fix s-a dovedit mai bun decât cel cu amestecare perfectă.

Un studiu întreprins de Kimura ș.a. [147] are ca temă hidroliza trigliceridelor cu lipaze imobilizate prin adsorbție pe Duolite sau Celite, prin legare covalentă pe derivați alchilaminici ai unui suport anorganic (sticlă poroasă sau Spherosil) prin intermediul glutaralhidei sau carbodiimidei și prin incluziune în geluri fotoreticulabile de tip ENT și ENTP (tabelul 3.1). Activitatea rezultată după imobilizare este dată în procente față de cea a enzimei libere. Gradul de hidroliză s-a determinat pentru trei utilizări succesive (1, 2 și 3) a fiecărui tip de catalizator, la 30°C, timpul de reacție fiind 23 ore. Lipaza adsorbită pe Duolite sau Celite a manifestat o activitate inițială mare, dar care a scăzut mult la reutilizările succesive. În cazul legării covalente s-au obținut activități mari și o stabilitate bună. De asemenea, o activitate mare și stabilitate destul de bună s-au obținut la imobilizarea prin incluziune într-un gel cu schelet de polipropilenglicol numit ENTP-4000.

Viteza inițială de hidroliză este mai mică decât la lipaza liberă (factorul limitativ fiind probabil difuziunea acidului oleic în gel) dar după 23 de ore s-a ajuns la același grad de hidroliză. Temperatura optimă a enzimei imobilizate a fost 40°C, față de 30°C la cea liberă.

Tabelul 3.1. Hidroliza uleiului de măsline cu lipază immobilizată din *Candida cylindracea* [147]

Metoda de immobilizare (suport)	Activitate relativă (%)	Grad de hidroliză (%)		
		Ciclul 1	Ciclul 2	Ciclul 3
Enzimă liberă	100,0	100,0	-	-
Adsorbție				
Duolite C-3	1,0	18,8	4,7	1,6
Duolite S-761	1,0	92,5	67,1	41,9
Celite	21,7	96,9	76,9	38,3
Legare covalentă				
glutaraldehydă (alchilamină-sticlă poroasă)	3,7	92,9	97,4	93,0
carbodiimidă (alchilamină-sticlă poroasă)	5,6	96,1	96,1	93,7
glutaraldehydă (alchilamină-Spherosil)	1,1	59,9	71,7	70,0
carbodiimidă (alchilamină-Spherosil)	12,5	96,9	86,5	86,5
Incluziune în gel				
ENT-4000	2,0	36,9	16,7	6,8
ENT-4000/ENTP-4000 (7:3)	10,0	83,7	57,8	35,0
ENTP-4000	11,1	88,1	78,3	77,3

Kosugi și Suzuki au constatat că immobilizarea lipazei din *Pseudomonas fluorescens* prin adsorbție pe o rășină schimbătoare de ioni macroporoasă hidrofobă cum ar fi Dowex MWA-1 a dus la dispariția inhibiției datorate produsului de reacție în reacția de hidroliză a seului de vită și la creșterea stabilității împotriva denaturării chimice a enzimei [148].

Bailie ș.a. au utilizat de asemenea lipază immobilizată prin adsorbție pe suporturi hidrofobe, însă pe bază de polietilenă [149]. Lipaza din *Candida cylindracea* immobilizată pe un astfel de suport s-a utilizat pentru hidroliza seului de vită și a uleiului de floarea-soarelui. La hidroliza uleiului de floarea-soarelui, folosind un reactor cu strat fix prevăzut cu o buclă de recirculare s-a atins un grad de hidroliză de 100 % după 40 de ore la 30°C.

O altă variantă, ce utilizează însă un mediu de reacție conținând solvenți organici pentru hidroliza uleiului de măsline a fost elaborată de Yang și Rhee [150]. Lipaza din *Candida rugosa* a fost immobilizată prin legare ionică sau adsorbție fizică pe următoarele suporturi: DEAE Sephadex A-50, Sephadex G-50, Sephadex LH-20, Amberlite IRA-94 și Amberlite XAD-7. Cele mai bune rezultate au fost obținute prin legare ionică pe DEAE Sephadex A-50. Enzima immobilizată a fost împachetată într-o coloană de sticlă care s-a operat continuu, uleiul de măsline dizolvat în solventul organic fiind introdus în echicurent cu soluția apoasă a enzimei, fără a se utiliza emulgator. Dacă s-a utilizat o soluție 20 % de ulei de măsline în izooctan ca fază organică și soluție tampon 25 mM de trietanolamină de pH 7,0 ca fază apoasă ce conținea enzima, timpul de înjumătățire a activității enzimei a fost de 220 h. Produsele reacției au fost acidul oleic și glicerina.

O altă variantă tehnologică propusă este utilizarea unui reactor tip membrană care conține lipaza immobilizată, cu faza uleioasă pe o parte a membranei și faza apoasă pe cealaltă parte. Reactanții intră astfel în reactor pe fluxuri diferite, nefiind necesară emulsionarea lor. S-a utilizat lipază termostabilă din *Thermomyces lanuginosus* pentru

hidroliza seului de vită, care reprezintă principala materie primă pentru hidroliza industrială a grăsimilor [151]. Membrana microporoasă a fost de natură acrilică, cu pori de 0,2 μm și grosime în jur de 0,1 mm. După imobilizarea enzimei prin trecerea filtratului rezultat din cultură, seul topit (la 40-50°C) s-a pompat prin partea inferioară a reactorului, a trecut prin membrană având loc hidroliza, a urcat spre partea superioară și a ieșit din reactor împreună cu faza apoasă, formând un amestec care s-a separat ușor într-o pâlnie de separare. Conversia a variat de la câteva procente la 35 %, depinzând de activitatea enzimei și debitul grăsimii. Trebuie menționat că activitatea enzimei imobilizate a fost de doar 0,4-0,9 % din cea a enzimei libere, iar timpul de înjumătățire a activității a fost de 1-2 luni la 50°C. Membrana poate fi spălată și reactivată cu o nouă cantitate de enzimă. Se pare că reacția este controlată de difuzie, ceea ce explică randamentele destul de scăzute. Ulterior, conversia a fost mărită până la 83 %, prin așezarea de trei reactoare în serie și mărirea numărului de straturi de membrană din fiecare reactor până la 30 [152].

Hidroliza unturii de porc și a seului de vită a fost studiată într-un sistem de emulsie solidă, obținută prin amestecarea grăsimii cu soluția apoasă de lipază din *Candida rugosa* (numită anterior *Candida cylindracea*), fără a se folosi emulgator sau solvent organic [153]. S-au obținut rezultate bune mai ales la hidroliza unturii de porc comestibile, unde după 24 h de reacție la 30°C și fără agitare continuă s-a atins un grad de hidroliză de până la 98 %, utilizând 0,5 g lipază la 1 kg de grăsime.

O posibilitate interesantă este hidroliza parțială a trigliceridelor pentru obținerea de mono- și digliceride [154, 155]. Această reacție a fost investigată pentru hidroliza trioleinei, găsindu-se că lipaza din pancreas de porc imobilizată pe Celite este cel mai eficient biocatalizator. După 5 ore de reacție s-a obținut o conversie în mono- și dioleină de 79 % [156]. Există câteva încercări de aplicare tehnologică a acestui procedeu, prezentate în brevete japoneze. Astfel, s-au obținut 2-monogliceride din trigliceride sub acțiunea lipazei pancreatice, respectiv 1,2-digliceride utilizând lipază din *Rhizopus delemar* [200].

Pe baza datelor de literatură existente, se poate trage concluzia că hidroliza trigliceridelor catalizată de lipaze, deși are loc în mod obișnuit cu randamente apropiate de 100 %, nu s-a putut transpune până în prezent în condiții exploatabile industrial, folosind enzimă imobilizată și un sistem continuu de operare. Un alt obstacol este faptul că materia primă principală, seul de vită, se topește la o temperatură în jur de 45°C la care o serie de lipaze au stabilitate termică redusă.

Cu toate acestea, se poate presupune că în viitorul apropiat hidroliza clasică a grăsimilor și uleiurilor va fi înlocuită cu un procedeu enzimatic. După unele date, se pare că deja există instalații în Japonia care utilizează o lipază din *Candida cylindracea* pentru hidroliza uleiului de in și obținerea unei pulberi de săpun [157].

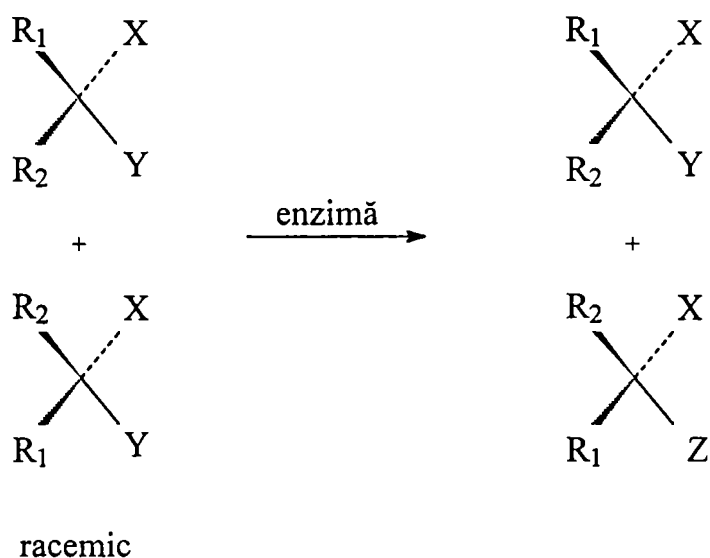
3.1.2. Reacții de hidroliză enantioselectivă catalizate de lipaze

Una din problemele cele mai dificile în domeniul compușilor organici de sinteză fină este obținerea compușilor optic activi. Importanța acestui domeniu va crește pe măsură ce tot mai mulți compuși chirali vor deveni produse comerciale. Asemenea compuși, la care doar unul din enantiomeri este activ din punct de vedere biologic, sunt aminoacizii, β -blocanții, piretroidele sintetice, feromonii, prostaglandinele, mentolul, etc. Enzimele sunt foarte potrivite pentru obținerea de compuși optic activi, fiind constituite doar din L-aminoacizi și, drept consecință, centrii lor activi constituie un mediu asimetric care poate face ușor deosebire între enantiomeri. Din păcate, sinteza unor compuși mai complicați pe cale enzimatică este adeseori dificilă, necesitând mai multe enzime și cofactori, ceea ce duce la o serie de probleme legate de accesibilitatea acestora, coimobilizări, instabilitate,

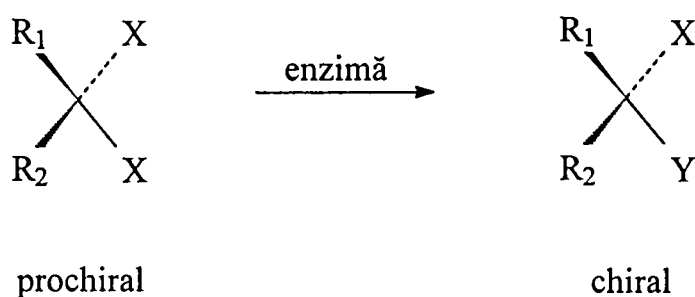
etc. Pe de altă parte, variantele de sinteză chimice nu sunt în general stereospecifice (cu excepția unor cazuri spectaculoase). Se pare că cea mai avantajoasă metodă este utilizarea unor metode chimico-enzimatice combinate în care enzimele să fie folosite pentru obținerea unor molecule mici, optic active, așa numiții "sintoni". Lipazele sunt potrivite pentru elaborarea unor asemenea procedee la scară industrială, fiind stabile, ușor de obținut și independente de cofactori. Cu ajutorul lor se pot obține alcooli și acizi optic activi, care sunt sintoni excelenți, putând fi transformați ușor în alte clase de compuși. Enantioselectivitatea reacțiilor catalizate de lipaze a fost remarcată destul de târziu, datorită dificultăților analitice de punere în evidență a obținerii de 1,2- respectiv 2,3-digliceride optic active în cursul reacției tradiționale catalizate de aceste enzime, hidroliza trigliceridelor. Acest lucru s-a realizat abia în ultimii ani, demonstrându-se că mai ales lipaza din *Pseudomonas species* manifestă și o asemenea selectivitate [158, 159].

Obținerea unor compuși optic activi utilizând enantioselectivitatea reacțiilor catalizate de hidrolaze se poate realiza prin următoarele trei modalități [121]:

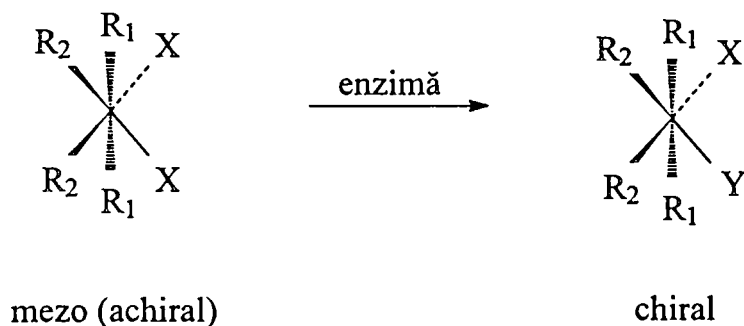
- rezoluția unor compuși racemici ce conțin una sau mai multe centre chirale



- formarea unor compuși optic activi din substraturi prochirale



- formarea unor compuși optic activi din compuși de tip "mezo"



Stereochimia reacțiilor de hidroliză ale esterilor și de esterificare catalizate de hidrolaze relevă faptul că majoritatea enzimelor sunt (R)-specifice, așa cum se arată în figura 1.3.2, exemplificat pentru acetatul de α -metil-benzil. În acest caz, mecanismul de acilare este ireversibil, deoarece ca agent de acilare se folosește un ester enolic. Trebuie însă menționat că o serie de enzime sunt (S)-specifice, așa cum rezultă și din datele tabelului 3.2 [160]. Așadar, alegerea enzimei va trebui făcută în funcție de produsul a cărei obținere este dorită. De exemplu, pentru a obține izomerul (R) al alcoolului, se va face hidroliza unui ester racemic cu o enzimă (R)-specifică, sau acilarea alcoolului racemic cu o enzimă (S)-specifică.

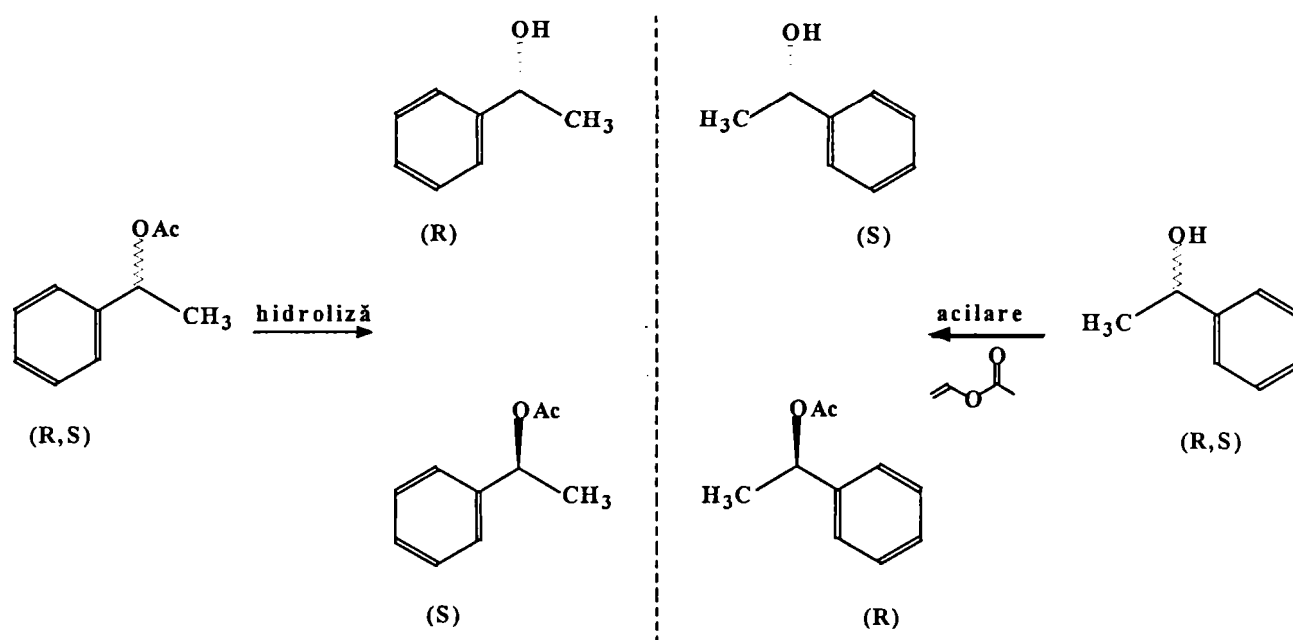
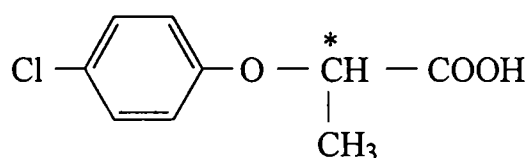


Figura 3.2. Stereochimia reacțiilor de hidroliză și esterificare catalizate de hidrolaze

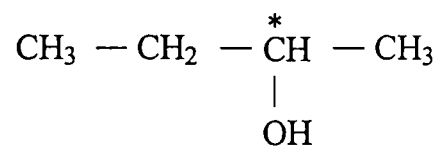
Tabelul 3.2. Evaluarea biocatalizatorilor pentru obținere de compuși optic activi prin reacția de hidroliză asimetrică a butiratului de 1-clor-3-fenoxi-2-propanol, la pH 7,0 [160].

Tipul enzimei	Conversia	Alcool		Ester	
		Izomer	% e.e.	Izomer	% e.e.
lipază din <i>Aspergillus oryzae</i>	-	-	-	(±)	-
lipază din <i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	(±)	-
lipază din <i>Aspergillus sojæe</i>	0,44	(R)	9,6	(S)	24,7
lipază din <i>Candida lipolytica</i>	0,44	(R)	70,7	(S)	90,5
lipază din <i>Candida sp.</i>	0,62	(S)	20,7	(R)	12,7
lipază din <i>Chromobacterium viscosum</i>	0,47	(R)	66,9	(S)	75,6
lipază din <i>Humicola lanuginosa</i>	0,39	(R)	61,0	(S)	94,0
lipază din <i>Geothricum candidum</i>	0,44	(R)	48,2	(S)	60,2
lipază din <i>Mucor miehei</i>	0,31	(R)	44,4	(S)	98,0
lipază din <i>Penicillium roqueforti</i>	-	-	-	(±)	-
lipază din <i>Rhizopus delemar</i>	0,62	(S)	20,9	(R)	12,7
lipază din pancreas de porc	0,35	(R)	43,4	(S)	82,0
colinesterază din <i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,47	(R)	24,6	(S)	27,6
lipază din <i>Pseudomonas sp.</i>	0,47	(R)	86,2	(S)	96,3
esterază din ficat de porc	0,90	(S)	14,0	(R)	1,5

Un studiu efectuat de Cambou și Klibanov a arătat că din punct de vedere al productivității, ușurinței de separare a produșilor și numărului de etape necesare, hidroliza asimetrică este cea mai bună pentru obținerea acizilor optic activi, în timp ce transesterificarea reprezintă varianta optimă de separare enantioselectivă a alcoolilor [161]. Pentru obținerea unui acid optic activ prin hidroliză asimetrică în prezența lipazei, atomul de carbon chiral trebuie să se găsească în restul acil al esterului, în timp ce pentru obținerea alcoolilor optic activi acesta se va găsi în restul alchil. S-a utilizat lipaza din *Candida cylindracea* pentru obținerea următorilor compuși optic activi: acid (R)-2-(p-clorfenoxi) propionic (I), ai cărui derivați se utilizează pe scară largă drept ierbicide și (R)-2-butanol (II), care este un sinton important pentru compuși chirali.



I



II

Drept substrat s-au folosit soluții de ester racemic cu concentrația 2 M (esterul metilic al acidului 2-(p-clorfenoxi)-propionic, respectiv butiratul de sec-butil) în soluție tampon borat 0,5 mM de pH 8,0 conținând 3 mM CaCl₂ și 0,2 M NaCl. Reacția avut loc la 25°C, cu menținerea pH-ului la 8. Reacția de hidroliză a 2-(p-clorfenoxi)-propionatului de propil s-a oprit după 12 ore, când conversia a atins 50% fără a mai crește în continuare, chiar la adăugarea unei noi cantități de enzimă, ceea ce arată o enantiospecificitate absolută

a reacției. Esterul nereacționat s-a extras cu eter. Acidul obținut s-a separat din faza apoasă prin acidulare la pH 1,0, extracție cu eter și evaporarea solventului.

La hidroliza butiratului de sec-butil reacția a atins conversia finală de 50 % după 14 ore. Esterul nereacționat și alcoolul rezultat s-au extras cu eter și s-au separat prin distilare în vid. Se poate observa (tabelul 3.3) că s-au obținut randamente ridicate și purități optice avansate ale compușilor sintetizați. Aceste reacții pot fi aplicate chiar la scară preparativă.

Tabelul 3.3. Hidroliza asimetrică a 2-(p-clorfenoxi)propionatului de metil și a butiratului de sec-butil, catalizată de lipaza din *Candida cylindracea* [161].

Produsul obținut	Randament (%)	Puritate ^a	Exces enantiomeric (%)	Productivitate (g/l·h·g enzimă)
acid (R)-2-(p-clorfenoxi)-propionic	85	97	96 ^b	1,30
(S)-2-(p-clorfenoxi)-propionat de metil	93	98	95 ^c	1,30
(R)-sec-butanol	78	94	90 ^b	0,21
(S)-butirat de sec-butil	79	95	88 ^c	0,41

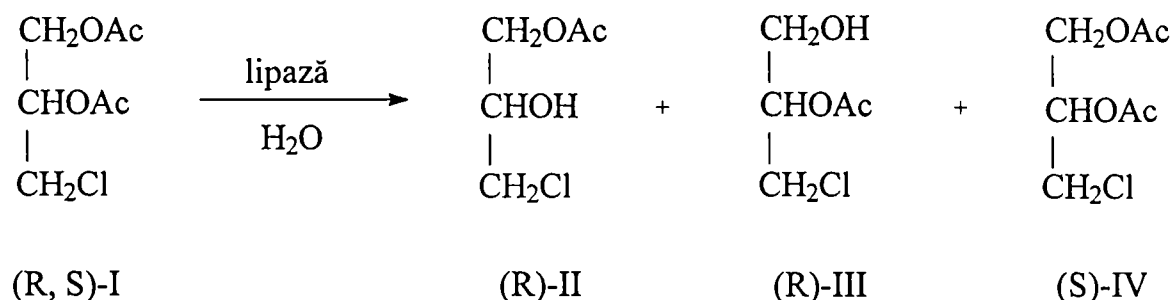
^aDeterminată prin cromatografie de gaz.

^bCalculate prin compararea valorilor rotațiilor optice determinate experimental cu cele din literatură.

^cDeterminate pe baza purității optice a acidului rezultat prin hidroliza alcalină a esterului.

Un brevet francez [162] prevede obținerea izomerului levogir al 3-clor-2-metil-1-propanolului prin hidroliza asimetrică a esterilor propionici sau butirici corespunzători. Reacția s-a efectuat la pH 8,5 menținut prin adăugare de soluție NaOH 1 N din timp în timp. După 16 ore la 20°C s-a obținut o conversie de aproximativ 25 %. Faza organică s-a separat de cea apoasă prin centrifugare. Alcoolul optic activ s-a extras din faza apoasă alcalinizată cu cloroform și s-a distilat, obținând un produs al cărui conținut în izomer levogir a fost de 78 %. 3-clor-2-metil-1-propanolul optic activ este un intermediar important în sinteza unor analgezice.

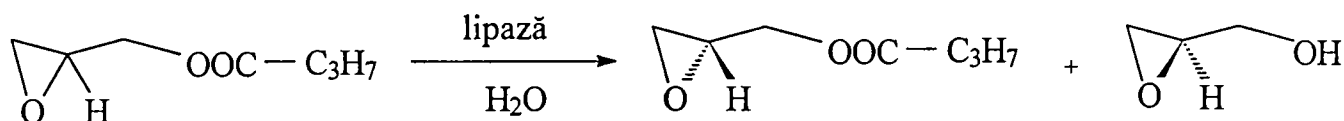
Hidroliza asimetrică a 1,2-diacetoxi-3-clorpropanului (I) cu lipaze duce la obținerea unui amestec de (R)-1-acetoxi-3-clor-2-propanol (II) și (R)-2-acetoxi-3-clor-1-propanol (III) alături de (S)-1,2-diacetoxi-3-clorpropan (IV) [163]:



Reacția se face la 25°C timp de 17 ore, obținându-se o conversie de aproximativ 75 %. După extracție cu hexan și spălare pentru eliminarea alcoolilor formați, se obține esterul optic activ (S)-IV cu un randament de 20 % și puritate optică de 90 %. Acesta este

un sinton important, fiind folosit mai departe pentru obținerea (S)-propranololului, unul din cei mai importanți β -blocați folosiți în tratamentul hipertensiunii.

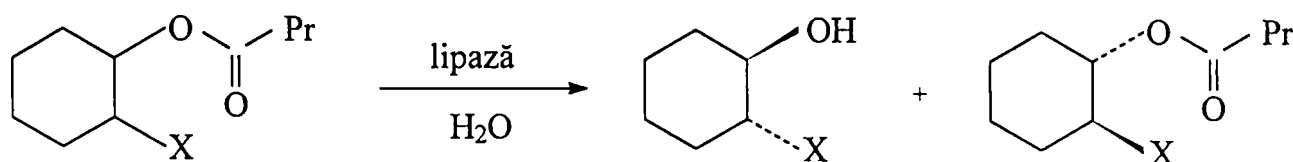
O altă categorie de compuși chirali care se pot obține prin hidroliză asimetrică sunt esterii epoxi-alcoolilor, de exemplu esterii glicidolului [164]. Aceștia sunt de asemenea sintoni chirali importanți pentru obținerea unor β -blocați. De exemplu, prin hidroliza a 300 g butirat de glicidil racemic în 300 ml apă în prezența a 7,5 g lipază brută din pancreas de porc la pH 7,8 (menținut prin adăugare de NaOH), după 6 ore de reacție s-a atins o conversie de aproximativ 60 %. După extracție cu clorură de metilen și distilare s-a obținut esterul optic activ, (R)-butiratul de glicidil, cu un randament de 98 % și puritate optică de peste 92 %.



La hidroliza esterilor butirici ai 3-metoxi-1-(fenilmetoxi)-2-propanolului și 3-clor-1-(fenilmetoxi)-2-propanolului cu lipază din *Candida antarctica* s-a obținut enantioselectivitate ridicată doar în cazul în care mediul de reacție a conținut și un cosolvent organic, acetonă sau terț-butanol. Compușii optic activi obținuți astfel se pot utiliza la sinteza fenilmetil-glicidil-eterilor optic activi, care sunt sintoni C_3 homochirali importanți [165].

Foelsche ș.a. au studiat obținerea prin hidroliză asimetrică a unor 2-azido-alcooli aciclici utilizând enzime comerciale din *Candida cylindracea* și *Pseudomonas fluorescens*. Acești alcooli sunt precursori ai amino-alcoolilor optic activi, de mare importanță ca și sintoni chirali și produși de interes farmaceutic [166]. S-au utilizat esterii butirici ai azido-alcoolilor. La soluția de lipază în soluție tampon fosfat 0,1 N, pH 6,5 s-a adăugat esterul azido-alcoolului. pH-ul s-a menținut tot timpul la 6,5 prin adăugare de NaOH 1 N. După un timp care s-a situat între 7-55 ore în funcție de natura substratului, când conversia a ajuns în jur de 30-40 %, alcoolul optic activ și esterul nereacționat s-au separat prin cromatografie pe coloană, iar esterul s-a hidrolizat în continuare cu lipază, până la o conversie de aproximativ 30 % (deci în total 60-70 %). După separare în același mod, s-au obținut esterii azido-alcoolilor, optic activi, cu randamente de separare între 22-46 % și exces enantiomeric de la 22 până peste 98 % în mai multe cazuri.

În cursul experimentelor de obținere a amino-alcoolilor optic activi grupul menționat a reușit și separarea de enantiomeri ai unor ciclohexanoli 2-substituiți (cu grupe azido-, nitro- sau ciano-) prin hidroliza esterilor butirici corespunzători. Plecând de la aceste rezultate s-a reușit extinderea metodei de hidroliză asimetrică cu lipaze pentru obținerea de ciclohexanoli substituiți optic activi și de a obține pe această cale noi sintoni chirali pentru compuși biologic activi. Are loc următoarea reacție [167]:



O serie din compușii menționați s-au obținut cu randamente bune și purități optice ridicate (tabelul 3.4).

Tabelul 3.4. Obținerea enantioselectivă a esterilor 2-ciclohexanolilor substituiți prin hidroliză asimetrică cu lipaze [167]

Substituent X	Enzimă	Timp (h)	Conversie (%)	Randament ^c (%)	Izomer	Exces enantiomeric (%)
OME	^a CC	5	60	32	S,S	93
OMe	^b P	28	53	44	S,S	>98
OEt	CC	5	61	32	S,S	40
OEt	P	28	52	46	S,S	>98
Cl	CC	4,5	60	32	S,S	90
Cl	P	16	50	46	S,S	>98
Et	CC	35	57	38	S,S	96
Et	P	100	52	42	S,S	94
C≡CH	CC	7	63	32	S,R	94
C≡CH	P	96	50	42	S,R	>98
N≡C	CC	4	66	28	S,S	>98
N≡C	P	6	58	37	S,S	95
NMe ₂	CC	48	42	52	n.d.	<2
NMe ₂	P	30	40	55	n.d.	<2

^a*Candida cylindracea*

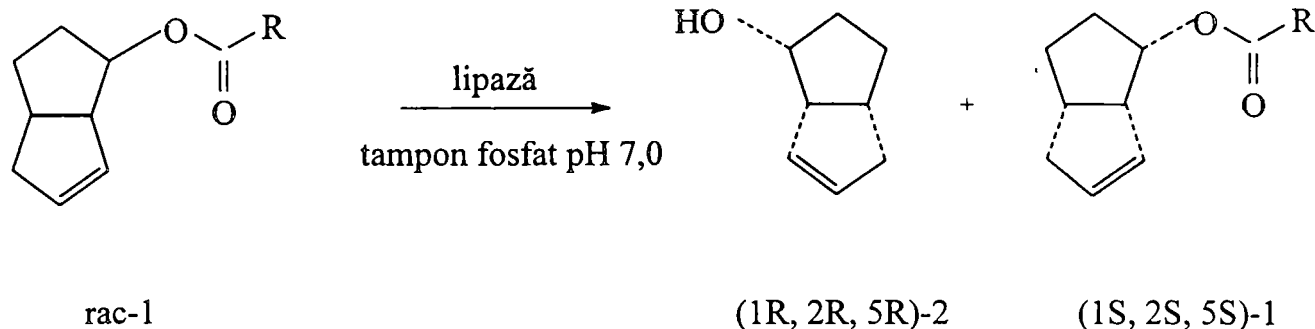
^b*Pseudomonas species*

^cRandamentul de izolare al produsului

Kalaritis ș.a. au constatat că lipaza din *Pseudomonas fluorescens* manifestă specificitate pentru enantiomerii S ai mai multor esteri ai acidului hexanoic 2-substituiți [168]. Reacția s-a făcut în mediu de soluție tampon la pH 7-8. Când conversia a atins 50 % (după aproximativ 4 ore), esterii nereacționați s-au separat printr-o simplă extracție, cu un exces enantiomeric cuprins între 72-91 %. Enantiomerii nedorți s-au racemizat foarte simplu prin agitarea soluțiilor esterice ale acestora cu hidrură de sodiu în cantități catalitice, peste noapte, la temperatura ambiantă. Viteza de hidroliză în cazul acestor reacții a fost mare, cea mai rapidă fiind hidroliza 2-fluoro-hexanoatului de etil. Procesul permite utilizarea unor concentrații mari de substrat și a unui raport substrat/enzimă ridicat (500 g/l și respectiv 4000 g/g în cazul hidrolizei 2-fluoro-hexanoatului de etil), ceea ce alături de costul redus al enzimei, recomandă acest proces pentru aplicare industrială. (R)- și (S)-2-fluorohexanoații de etil sunt intermediari importanți în sinteza 16-fluoroprostaglandinelor (antihipertensive) și 16-fluoroprostaciclinelor (vasodilatatoare).

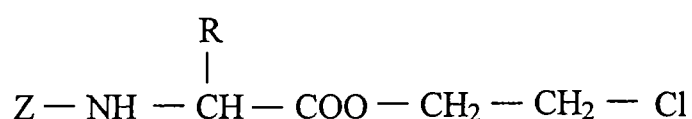
Pentru obținerea unor sintoni optic activi funcționalizați cu sulf, derivați ai 3-hidroxi-esterilor, care sunt importanți pentru sinteza multor compuși optic activi naturali și sintetici, s-a studiat hidroliza enantioselectivă a 2-(metiltio)-3-acetoxi-esterilor cu lipază din *Aspergillus species* [169]. Reacția s-a făcut în tampon fosfat 0,1 M de pH 7,2 la temperatura camerei. S-a constatat că este hidrolizat doar diastereomerul anti, acesta obținându-se după 12 ore de reacție cu un exces enantiomeric de 88 %.

O altă utilizare a hidrolizei enantioselective cu ajutorul lipazelor o constituie obținerea de (+)-endo-(1R,2R,5R)-biciclo-[3,3,0]oct-7-en-2-ol, [170]:



Reacția s-a făcut în soluție tampon fosfat 0,1 N de pH 7,0, cu adăugare de NaOH pentru menținerea pH-ului. Timpul de reacție a fost între 1-8 ore. S-au folosit mai multe feluri de lipaze: din *Candida cylindracea*, pancreas de porc, *Pseudomonas fluorescens* și *Mucor miehei*. Reacția a decurs cel mai rapid, cu enantioselectivitate și conversie practic totale cu lipaza din *Pseudomonas*. Acești compuși servesc ca materie primă pentru sinteza unor sesquiterpene ciclopentanoidice.

Lipazele hidrolizează enantioselectiv și unii esteri ai derivaților N-benziloxi-carbonilici ai aminoacizilor, având formula generală [171]:



Z = benziloxycarbonil

Condițiile de reacție au fost, pentru lipaza din *Aspergillus niger*: temperatură 25°C, pH 7,0 (tampon fosfat 0,2 M) menținut în timpul hidrolizei prin adăugare de NaOH 0,5 M. Timpul de reacție a diferit mult în funcție de natura enzimei utilizate și a substituentului R. S-au testat trei tipuri de lipaze (tabelul 3.5). Enantioselectivitatea cea mai pronunțată s-a înregistrat în cazul lipazei din *Aspergillus niger*. Trebuie remarcat că în toate cazurile enantiomerul L fost hidrolizat preferențial. Aminoacizii optic activi obținuți se pot folosi drept sintoni pentru sinteza unor peptide analoage cu cele biologic active.

Tabelul 3.5. Hidroliza asimetrică a derivaților N-benziloxycarbonilici ai aminoacizilor cu lipaze [171].

Substituent	Tipul lipazei					
	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Candida cylindracea</i>	
	conversie	e.e.	conversie	e.e.	conversie	e.e.
metil	36	89	46	16	38	7
etil	40	96	49	52	36	7
n-propil	27	86	43	58		
n-butil	32	85	52	60	42	30
n-pentil	44	95	25	80	27	60
n-hexil	31	94	47	87		
i-propil	14	92	8	53		
2-propenil	34	86	40	52	31	27
benzil	32	84	12	57	35	63

Alte cercetări au stabilit că lipaza din pancreas de porc hidrolizează enantioselectiv esterii metilici ai acizilor aspartic și glutamic N-acetilați [172]. Se hidrolizează doar gruparea esterică aflată în vecinătatea grupei N-acetil, obținându-se enantiomerul L. Reacția se face la pH 7,2.

Holmberg ș.a. au stabilit că utilizarea unui ester bichiral determină o amplificare a enantioselectivității hidrolizei enzimatică, prin combinarea diastereoselectivității chimice cu enantio- și diastereoselectivitatea enzimatică. Acest lucru s-a demonstrat la obținerea unui alcool secundar optic activ, prin hidroliza 2-clorpropionatului de 1-feniletil [173].

În majoritatea cazurilor studiate în literatură, compușii supuși acțiunii enzimatică au centrul chiral sau prochiral situat la una sau cel mult două legături de gruparea carbonil reactivă. S-a demonstrat însă, pe exemplul unor ditioacetal-esteri racemici, că enantioselectivitatea se manifestă până la o distanță de cinci legături între centrul chiral sau prochiral și gruparea carbonil esterică. Această selectivitate nu scade obligatoriu cu creșterea distanței, fiind mai bună în cazul existenței unei distanțe de 4 legături, decât la 3 și 5 legături [174].

S-a stabilit că enantioselectivitatea lipazei din *Candida cylindracea* se mărește dacă enzima este purificată prin tratare cu deoxicolat și solvent organic (eter-etanol 1:1). Se consideră că aceasta este rezultatul modificării necovalente a proteinei enzimatică [175].

Reacțiile de hidroliză enantioselectivă catalizate de lipaze vor dobândi o importanță practică deosebită în viitorul apropiat. Interesul deosebit al cercetătorilor din majoritatea țărilor avansate pentru a obține pe această cale sintoni pentru fabricarea unor compuși optic activi cu utilizări farmaceutice și biomedicale reprezintă o garanție a acestei presupunerii. Simplitatea procedurii, costul redus, puritatea optică avansată a produșilor sunt principalele avantaje care vor impune utilizarea pe scară largă a reacțiilor de hidroliză asimetrică enzimatică.

3.2. Reacții de esterificare și transesterificare catalizate de lipaze

3.2.1. Sinteze de esteri prin reacții de esterificare directă catalizate de lipaze

Posibilitatea utilizării lipazelor drept catalizatori în reacții de esterificare a fost adusă în actualitate în 1977 de Tsujisaka ș.a. care au arătat că în funcție de specificitatea enzimei folosite, în reacția dintre glicerină și acizi grași se obțin produse diferite [176].

Prin reacții de esterificare dintre acizii grași și diverși alcooli, catalizate de lipaze, se pot obține o serie de produse utilizate mai ales în industria alimentară:

- mono- și diesteri ai glicerinei cu lipaze 1,3-specifice (emulgatori)
- esteri ai alcoolilor primari și secundari (plastifianți, aromatizanți)
- poliesteri pe bază de compuși polihidroxilici ca glucoză, fructoză, etc. (biosurfactanți).

Lipazele utilizate trebuie să aibă în primul rând o specificitate corespunzătoare, pentru a produce produsul dorit la un cost rezonabil. Această specificitate de substrat se poate manifesta atât în raport cu acidul cât și cu alcoolul utilizat. De asemenea, lipazele trebuie să fie active și stabile în condițiile de reacție utilizate.

Reacțiile de esterificare enzimatică au loc în general la temperaturi de până la 70°C în prezența unei cantități reduse de apă. S-a demonstrat că lipaza pancreatică își menține activitatea chiar la o concentrație de apă de numai 0,015 % și temperatură de aproape 100°C [280]. O serie de alte lipaze, mai ales în stare imobilizată, sunt active și rezistente la inactivare termică în condițiile unui conținut redus de apă, dar ele sunt susceptibile la

otrăvire din cauza unor impurități prezente în cantități mici în materiile prime. Dacă este posibil, pentru utilizări comerciale trebuie selecționate lipaze rezistente la acest tip de otrăvire. Sistemele de reacție pentru esterificare (ca și pentru transesterificare, de altfel) constau din lipază și o cantitate mică de apă dispersate într-o fază organică ce este alcătuită din reactanți și, dacă este cazul, dintr-un solvent organic nemiscibil cu apa. Cantitatea mică de apă din sistem se repartizează între catalizator și faza organică. Lipazele catalizează reacțiile la interfețe și pentru a obține viteze mari de reacție, este necesar ca suprafața acestei interfețe între faza de reactanți nemiscibilă cu apa și faza hidrofilă ce conține lipaza să fie cât mai mare. Acest lucru se poate realiza prin legarea lipazei de suprafața unui suport cu particule macroporoase. Catalizatorii cei mai activi s-au obținut prin adsorbția lipazei pe particule de polimeri macroporoși organici sau anorganici. Pentru prepararea catalizatorilor se poate utiliza adsorbția prin interacțiune ionică sau hidrofobă. O altă metodă, des utilizată, constă în legarea pe suprafața unor particule anorganice poroase (cum ar fi pământurile de diatomee calcinate) a unui strat de lipază brută. Legarea se poate realiza prin precipitarea cu un solvent a proteinei în prezența particulei respective, sau printr-o uscare înceată, controlată, a unui amestec de particule în exces cu o soluție concentrată de lipază. Activitatea nu este singurul factor de care trebuie să se țină cont la alegerea unui suport pentru imobilizarea lipazei. Acesta trebuie, dacă este posibil, să contribuie la stabilizarea enzimei în reactorul de sinteză și să aibă caracteristici mecanice potrivite pentru a putea fi folosită [177]. În ultima perioadă au fost propuse o serie de variante de imobilizare a lipazelor prin entrapare în silicageluri hidrofobe. Asemenea biocatalizatori au fost testați cu succes în reacții de esterificare [178-182].

În general vitezele de reacție în cazul esterificărilor catalizate de lipaze sunt suficient de mari pentru a permite utilizarea lor la obținerea la scară industrială a esterilor acizilor grași.

Așa cum s-a arătat, adeseori reactanții lichizi îndeplinesc și rolul de mediu de reacție. Însă, în mod frecvent, reactanții sunt fie solizi la temperatura de reacție, fie nemiscibili unul cu altul. În aceste cazuri este necesară utilizarea unui solvent pentru a obține un mediu de reacție omogen. Se pot utiliza solvenți nepolari, nemiscibili cu apa, cum ar fi hexan, eter de petrol, toluen, triclorețan. Utilizarea unor solvenți miscibili cu apa ca acetona, tetrahidrofuran sau dimetilformamidă în general duce la viteze de reacție foarte mici. Se crede că acești solvenți inactivează catalizatorul prin dehidratarea excesivă a enzimei [177]. În situațiile când reactanții sunt lichide miscibile sau se utilizează un solvent organic pentru a omogeniza mediul de reacție, esterificarea poate fi realizată cu ajutorul lipazelor imobilizate într-un reactor cu pat fix de catalizator. Dacă reactanții sunt nemiscibili sau se utilizează soluții apoase de lipază, deci apar sisteme de reacție bifazice, reacțiile se pot face în reactoare cu membrană [183].

O posibilitate investigată intens în ultima vreme este utilizarea de CO₂ supercritic drept mediu de reacție pentru reacțiile de esterificare și transesterificare catalizate de lipaze. S-a constatat că enzima își păstrează activitatea în mediul de fluid supercritic și acest mediu prezintă o serie de avantaje față de solvenții organici obișnuiți: este ieftin, netoxic, neinflamabil și recuperarea produșilor se poate realiza ușor la terminarea reacției [184-190]. Este posibilă chiar fracționarea acestor produși prin extracție cu fluide supercritice [191], iar în unele cazuri enantioselectivitatea enzimei s-a dovedit a fi mai mare decât în solvenți organici [192]. Lipaza din pancreas de porc, care în mod obișnuit nu este enantioselectivă în reacția de hidroliză a trigliceridelor [159], în condiții supercritice dobândește această specificitate [193]. Principalele probleme legate de utilizarea fluidelor supercritice sunt de ordin tehnologic și prețul ridicat al instalațiilor respective.

În prezent se recunoaște faptul că prezența apei, în mod uzual în cantități foarte mici, este necesară în sistemele de reacție de esterificare și transesterificare. Foarte mare importanță are conținutul de apă din sistemul de reacție, respectiv activitatea termodinamică a apei, care trebuie menținută la un nivel controlat stabilit pentru fiecare asemenea sistem [91, 194 -197].

Acestă apă poate avea două roluri. În primul rând este necesară enzimei pentru menținerea stării active hidratate, iar în al doilea rând este un reactant pentru reacția inversă, de hidroliză, jucând un rol important în stabilirea echilibrului reacției. În această ordine de idei, trebuie luată în considerare și apa rezultată în reacție, care determină scăderea randamentului în ester. Pentru a obține randamente mari este necesar ca reacția să fie dusă până la capăt, fie prin utilizarea unui exces însemnat al unuia din reactanți, fie prin îndepărtarea unuia din produșii formați. Cea din urmă soluție este preferată pentru sintezele la scară industrială. Îndepărtarea apei se poate face prin distilare în vid, distilare heteroazeotropă, absorbție pe medii care leagă apa, prin trecerea unui curent de gaz uscat în partea superioară a reactorului sau prin utilizarea unei suprafețe reci în partea superioară pentru a elimina apa sub formă de gheață. O posibilitate interesantă este introducerea în sistemul de reacție a unei perechi de hidrați de săruri solide, de exemplu Na_2SO_4 anhidru și decahidrat, pentru a tampona activitatea apei la o anumită valoare [198, 199].

3.2.1.1. Sinteza esterilor glicerinei cu lipaze

Sinteza esterilor glicerinei prin reacția dintre glicerină și acizi grași catalizată de lipază prezintă un interes comercial considerabil, datorită utilizării acestor compuși pe scară largă ca emulgatori în industria alimentară.

Așa cum se cunoaște, sinteza chimică a emulgatorilor are anumite inconveniente legate de închiderea la culoare a produșilor datorită condițiilor de temperatură, ceea ce necesită purificarea lor ulterioară.

Obținerea mono- și digliceridelor se poate face în principiu pe trei căi:

a. esterificarea directă a glicerinei cu acizii grași în prezență de catalizatori, la temperaturi înalte. Acest procedeu este industrializat într-o serie de țări. Procedeu enzimatic reprezintă o alternativă la cel clasic, ținând cont de avantajele cunoscute pe care le prezintă.

b. reacția dintre trigliceride și glicerină (gliceroliză), în prezența unor catalizatori alcalini, care duce la un amestec de mono-, di- și trigliceride. Concentrația monogliceridelor poate fi mărită prin distilare [201].

c. hidroliza parțială a trigliceridelor. Procedeu clasic de hidroliză a trigliceridelor în mediu alcalin la temperatură și presiune înaltă duce la obținere de glicerină și acizi grași (săpunuri). În cazul utilizării lipazelor drept catalizatori, acest proces poate fi oprit la stadiul de mono- sau digliceridă, datorită selectivității lipazei, așa cum s-a arătat anterior.

Obținerea de esteri ai glicerinei cu acizii grași s-a efectuat prin esterificare directă, în sisteme bifazice [176]. Reactanții lichizi s-au amestecat direct cu o soluție apoasă de lipază. Acizii grași fiind nemiscibili cu apa, pentru a obține o viteză de reacție corespunzătoare a fost esențială realizarea unei interfețe cât mai mari între cele două faze printr-o agitare intensă. Reacția fiind reversibilă, randamentul în ester depinde de conținutul în apă al sistemului. Amestecul de reacție a constat din 4 ml glicerină, 1 ml apă, 0,1 ml soluție de lipază (conținând 30 unități enzimatică) și 0,1 ml acid gras. S-a agitat acest amestec timp de 16 ore la temperatura de 30°C cu o viteză de 200 rotații/minut. S-au obținut randamente de esterificare destul de bune, mai ales cu lipaza din *Aspergillus niger* (tabelul 3.6).

Tabelul 3.6. Sinteze de esteri ai glicerinei cu acizi monocarboxilici catalizate de lipaze microbiene [176]

Denumirea acidului	Tipul lipazei			
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Rhizopus delemar</i>	<i>Geothricum candidum</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>
	Grad de esterificare (%)			
acid acetic	24,9	0	0	0
acid butiric	73,5	4,1	0	0
acid caprilic	75,4	67,7	0	32,0
acid lauric	71,9	31,8	13,9	87,1
acid palmitic	13,8	38,0	4,6	9,0
acid stearic	10,5	2,0	5,3	5,9
acid oleic	75,3	70,4	66,4	69,0
acid ricinoleic	60,0	57,0	24,3	68,4

Randamentele scăzute în cazul acizilor palmitic și stearic se datorau faptului că aceștia sunt solizi la temperatura de reacție. Analiza produșilor de reacție prin cromatografie în strat subțire a arătat prezența atât a mono-, di-, cât și a trigliceridelor corespunzătoare.

S-au realizat și sisteme bifazice în care substratul insolubil în apă era dizolvat într-un solvent nemiscibil cu apa. Uneori însă la asemenea sisteme a apărut problema denaturării enzimei din cauza solventului [202].

Un asemenea sistem de reacție a fost constituit din 10 g acizi grași (fie amestec de acizi C₁₂-C₁₈, fie amestec de acid palmitic și stearic în proporții egale) dizolvați în 500 ml solvent organic (ciclohexan sau heptan), 250 g glicerină conținând 5% apă și 1 g lipază din *Rhizopus delemar* [203]. Reacția s-a făcut prin amestecare energetică într-un reactor de 2 l la 37°C timp de 4 ore. Randamentele obținute au fost scăzute, între 17 și 21 %. Produsele de reacție au fost constituite în majoritate din 1,3-digliceride, alături de 1,2-digliceride, monogliceride și cantități foarte mici de trigliceride.

Așa cum se observă, realizarea reacțiilor de esterificare în sisteme bifazice este legată de o serie de inconveniente care fac dificilă aplicarea unor asemenea procese la scară industrială. Pentru depășirea lor au fost concepute bioreactoare cu membrană.

Un asemenea bioreactor cu flux orizontal ce operează în regim continuu constă din trei compartimente distincte, separate între ele de câte o membrană microporoasă hidrofobă din polipropilenă [204]. Prin compartimentul central este pompată o soluție de lipază (de ex. din *Chromobacterium viscosum*) în glicerină, în timp ce prin cele două compartimente exterioare se pompează acidul gras. Lipaza este solubilizată într-o cantitate mică de apă, concentrația inițială a apei în sistemul glicerină-lipază fiind de 3%. Datorită naturii hidrofobe a membranei, acidul gras poate difuza rapid prin micropori spre faza hidrofilă ce conține lipaza și glicerina, reacția de esterificare având loc la interfața membranei. Gliceridele formate difuzează înapoi în faza lipofilă de acid gras, în timp ce celălalt produs format, apa, rămâne în faza hidrofilă. Îndepărtarea apei formate în reacție din sistem s-a realizat prin intercalarea pe traseul de recirculare a unei coloane cu site moleculare. Temperatura s-a menținut la 40°C. Activitatea inițială a enzimelor a fost de 6.000 unități/ml soluție de glicerină. În aceste condiții au fost încercate mai multe lipaze microbiene pentru esterificarea acidului oleic cu glicerină (tabelul 3.7)

Tabelul 3.7. Sinteze de esteri ai glicerinei cu acid oleic catalizate de lipaze microbiene în reactorul cu membrană [204]

Proveniența lipazei	Activitatea (unități/mg)	Conversia (%)
<i>Candida cylindracea</i>	290	3,8
<i>Chromobacterium viscosum</i>	56	78
<i>Mucor miehei</i>	35	74
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	200	55
<i>Rhizopus delemar</i>	350	32

Analiza produșilor de reacție a arătat că esterii formați sunt constituiți din cantități aproximativ egale de mono- și digliceride, în timp ce cantitățile de trigliceride formate sunt mici sau neglijabile.

În ultimii ani au fost făcute o serie de încercări de sinteză a unor gliceride utilizând lipaze immobilizate accesibile comercial, cum ar fi Lipase G (de la firma Amano) provenită din *Pseudomonas species* și având specificitate pentru monogliceride, sau Lipozyme (de la firma Novo) din *Mucor miehei*, care este 1,3-specifică [183]. Astfel reacția dintre acid oleic și glicerină, catalizată de Lipase G, duce aproape exclusiv la formare numai de monogliceride, însă nu s-au obținut decât conversii mici.

Lipozyme catalizează reacția dintre acid oleic și glicerină, deși cu viteze mai mici decât Lipase G, obținându-se gliceride în ordinea: digliceride > monogliceride > trigliceride. Randamente mai ridicate în gliceride s-au obținut utilizând site moleculare pentru îndepărtarea apei formate [183]. Recent s-a demonstrat că formarea trioleinei în această reacție este datorată izomerizării 1,3-dioleinei și esterificării grupei hidroxil primare devenite libere [284].

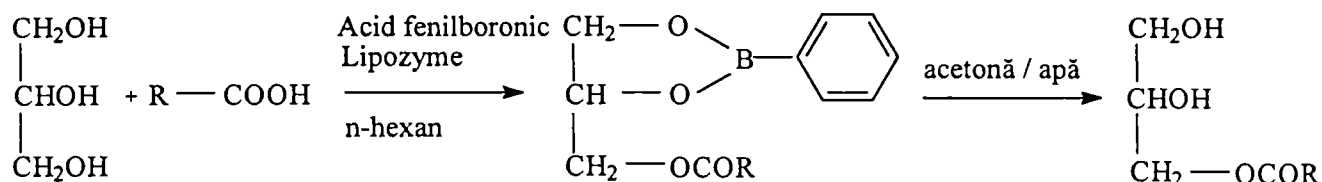
O altă variantă de sinteză cercetată foarte mult în ultima perioadă pentru reacțiile de esterificare catalizate de lipaze este cea care utilizează miceliile inverse ca medii de reacție [202, 205]. Acestea sunt stabile din punct de vedere termodinamic, omogene și au mari suprafețe ale interfeței accesibile pentru reacțiile enzimatică. Aceste sisteme nu necesită agitare mecanică sau emulsifiere. Echilibrul chimic poate fi deplasat în direcția formării esterului prin controlul asupra conținutului de apă al sistemului. Enzima este protejată față de denaturarea produsă de solvent datorită stratului de surfactant.

Pentru obținerea miceliilor inverse se utilizează surfactanți sintetici ca sulfosuccinatul de bis(2-etilhexil) sodiu (AOT) sau fosfolipide obținute din surse naturale, cum ar fi fosfatidilcolina și fosfatidiletanolamina. Într-un astfel de sistem ce utilizează fosfatidilcolină s-a observat formarea 1-monogliceridelor și 1,3-digliceridelor din glicerină și acizi grași, în timp ce 1,2-digliceride și trigliceride nu au fost sintetizate. Acest lucru este datorat lipazei din *Rhizopus delemar* utilizate, care este 1,3-specifică, așa cum s-a mai arătat. Se consideră că prin utilizarea unei lipaze nespecifice s-ar putea sintetiza în acest mod și o serie de trigliceride [206].

Sinteza 1-monogliceridelor a fost realizată în micelii inverse de tip apă/AOT/izooctan cu lipază din *Rhizopus delemar*. S-a demonstrat că reacțiile s-au oprit la atingerea echilibrului cinetic, cu excepția unor rare cazuri când se produce dezactivarea enzimei. Conversiile maxime în monogliceride care s-au obținut au fost de 50-60 %, în timp ce cantitatea de digliceride sintetizată în condițiile respective a fost scăzută. Specificitatea față de acizii grași, exprimată prin viteza inițială a reacției, a fost: acid oleic > acid caprilic > acid miristic > acid lauric > acid palmitic = acid stearic [207].

Pentru sinteza monogliceridelor de puritate înaltă a fost propusă și o metodă combinată, chimică și enzimatică. Acetalul corespunzător, sintetizat pe cale chimică din glicerină și acetonă, s-a esterificat cu un acid gras în prezența lipazei rezultând acetal-esterul acidului gras respectiv, care prin hidroliză a dus la obținerea monogliceridei în stare pură [202].

O altă posibilitate de a obține monogliceride este utilizarea acidului fenilboronic drept agent de protecție și solubilizare a glicerinei [208]. S-a utilizat Lipozyme, iar ca solvent n-hexanul. Reacția a avut loc în două etape:



S-a lucrat la 60°C, timp de 3 ore, iar hidroliza esterului fenilboronic s-a făcut prin fierbere timp de 30 de minute în amestec acetonă/apă în raport 2/3. S-au obținut esteri ai unor hidroxiacizi grași cu randamente de până la 80 %, cele mai bune rezultate fiind înregistrate în cazul acidului 12-hidroxi-octadecanoic.

3.2.1.2. Sinteze de esteri ai alcoolilor monohidroxilici primari și secundari

Reacțiile de esterificare catalizate de lipaze pot fi utilizate și pentru a obține o serie de alți esteri decât gliceridele. Problemele generale ale acestor sinteze sunt aceleași ca în cazul sintezei esterilor glicerinei cu acizii grași, deci și variantele de sinteză utilizate sunt asemănătoare.

Esterii acizilor carboxilici sunt componente importante ale aromelor naturale utilizate în industria alimentară. De exemplu, butiratul de etil și acetatul de izoamil au fost găsiți în aromele de căpșuni și respectiv de banane. Acești compuși sunt sintetizați în mod uzual prin metode chimice, însă procedeele enzimatiche devin din ce în ce mai atrăgătoare [209].

O serie de esteri ai alcoolilor primari și secundari cu catenă scurtă, medie sau lungă au fost obținuți cu ajutorul lipazelor.

Primele experimente menționate în literatura de specialitate au fost efectuate în sisteme bifazice, conținând 0,2 ml alcool, 0,1 ml acid oleic, 0,5 ml soluție de cazeină 1% și 0,5 ml soluție de lipază microbiană (conținând 30 unități enzimatiche). Reacțiile s-au efectuat la 30°C timp de 16 ore, prin agitare energetică la 200 rotații/minut. S-au obținut esteri ai alcoolilor primari cu randamente în general ridicate, indiferent de proveniența enzimei folosite. Excepție a făcut doar lipaza din *Aspergillus niger*, în cazul alcoolilor cu catene mai lungi decât C₄. Esterii alcoolilor secundari au fost sintetizați însă numai de lipaza din *Geothricum candidum* (tabelul 3.8) [210].

Tabelul 3.8. Sinteze de esteri ai acidului oleic cu alcoolii primari și secundari [210]

Denumirea alcoolului	Tipul lipazei			
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Rhizopus delemar</i>	<i>Geothricum candidum</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>
	Grad de esterificare (%)			
metanol	17	55	62	40
etanol	19	65	56	18
1-propanol	42	81	62	39
1-butanol	56	85	31	40
<i>i</i> -butanol	37	85	20	64
1-hexanol	7	56	29	61
1-octanol	10	86	59	57
1-decanol	9	68	72	76
alcool benzilic	9	14	3	32
2-propanol	0	0	32	1
2-butanol	0	0	38	1
2-pentanol	0	0	35	1

Alte cercetări pentru obținerea de esteri în sisteme bifazice conținând apă au avut drept scop sintetizarea de esteri ai acidului 2-metilpentanoic. Aceștia se disting prin mirosuri vegetale (coacăze negre, flori de soc) și au o serie de alte proprietăți care îi fac utilizabili ca odorizanți. Cele mai bune rezultate s-au obținut la esterificarea cu alcool prenilic ($\text{HO-CH}_2\text{-CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-CH}_3$), în prezența lipazei din *Candida cylindracea*. După 40 de ore la temperatura de 30°C s-a obținut un randament de 98 % în ester [211].

O serie de esteri ai acizilor și alcoolilor cu catenă lungă s-au sintetizat cu randamente în jur de 80 % tot în sisteme bifazice, dar conținând un solvent organic (tabelul 3.9). Amestecul de reacție a fost constituit din câte 200 mg alcool și acid, 5 mg lipază în 0,5 ml soluție tampon acetat 0,05M de pH 5,6 și 4 ml n-hexan. Esterificarea s-a făcut la 30°C, timp de 16 ore, sub agitare [211].

Tabelul 3.9. Sinteze de esteri cu lipaze în sisteme bifazice apă-solvenți organici [211]

Denumirea alcoolului	Denumirea acidului	Proveniența lipazei	Grad de esterificare (%)
alcool palmitic	acid palmitic	<i>Pseudomonas species</i>	87
alcool oleic	acid stearic	<i>Mucor miehei</i>	80
alcool oleic	acid oleic	<i>Geothricum candidum</i>	80

Un progres important în direcția aplicării industriale a reacțiilor de esterificare catalizate de lipaze a înregistrat firma Novo prin utilizarea unei enzime imobilizate. Catalizatorul folosit a fost Lipozyme Novo care este lipază din *Mucor miehei* imobilizată pe Duolite ES 568. S-a observat că în prezența acesteia esterificarea acidului oleic cu octanolul este destul de rapidă, viteza de reacție în cazul unui amestec echimolar la temperatura de 60°C fiind de 1,27 $\mu\text{moli/min/g}$ catalizator, ceea ce reprezintă 5-10 % din viteza de hidroliză a trioleinei cu aceeași cantitate de enzimă liberă la 40°C. La sinteza miristatului de miristol, utilizând amestecuri echimolare de alcool miristic și acid miristic,

la 70°C și presiune atmosferică reacția s-a oprit la un randament în ester de 85 % din cauza acumulării apei în sistemul de reacție. Dacă însă s-a îndepărtat apa prin distilare în vid, randamentul a crescut la 99 %. Catalizatorul s-a dovedit a fi stabil în condițiile existente în reactoarele cu amestecare și s-a reutilizat succesiv pentru reacțiile de esterificare, productivitatea sa fiind de cel puțin 1,2 tone de ester la 1 kg catalizator.

Oleatul de n-butil a fost de asemenea sintetizat prin simpla amestecare a materiilor prime cu enzima și menținere sub agitare la 37°C. Cu lipază din *Chromobacterium viscosum* (conținând 5,9 % apă), fără adăugare de apă sau solvent organic, s-a obținut după 12 ore un randament de 98 % față de acidul oleic [286].

Această tehnologie este considerată corespunzătoare pentru a obține o largă varietate de esteri pornind de la acizi grași și alcoolii primari și secundari, cu condiția ca materiile prime să fie miscibile între ele. S-au obținut randamente ridicate și produși de o excelentă calitate. Totuși, din cauza prețului ridicat al enzimei imobilizate, se consideră că aplicarea industrială a acestei tehnologii se va face numai pentru esterii cu valoare comercială ridicată [177].

O altă variantă de sinteză este utilizarea de solvenți organici în condiții aproape anhidre, care are o serie de avantaje ce au fost prezentate anterior. Printr-o alegere potrivită a solventului se poate realiza în unele cazuri omogenitatea sistemului de reacție, chiar dacă reactanții ca atare sunt nemiscibili, eliminând problemele datorate transferului de masă defectuos în sistemele multifazice. Alegerea solventului este însă de multe ori dificilă, întrucât natura lui influențează foarte mult reacția. Astfel, la esterificarea acidului butiric cu heptanolul în diverși solvenți organici cu lipază din pancreas de porc la 20°C doar hexanul și toluenul s-au dovedit a fi corespunzători. În hexan, după două ore de reacție, s-a obținut o conversie de peste 90 % [90].

În cazul sintezei esterului acidului lauric cu n-hexanolul, utilizând lipază din *Candida cylindracea* imobilizată prin legare cu glutaraldehydă pe un copolimer alcool polivinilic-polietilenimină după 22 de ore de reacție la 25°C în prezența unei cantități reduse de apă, solventul organic cel mai eficient s-a dovedit a fi izooctanul (randament cantitativ), urmat de n-heptan (randament 63,9 %), toluen și benzen (randament 42,7 %) [212].

Trei esteri aromatizanți au fost preparați prin esterificare directă din alcoolii și acizii corespunzători, în mediu de n-heptan și în prezența unei cantități reduse de apă (0,1%). În condițiile de reacție optimizate s-au sintetizat acetatul de izoamil (24 h, 30°C, randament 82 %) cu lipază din *Mucor miehei*, 2-metilbutanoatul de etil (24 h, 55°C, randament 82 %) cu lipază din *Candida antarctica* și acetatul de citronelil (24 h, 45°C, randament 98 %) cu lipază din *Candida antarctica* [213].

După o rețetă asemănătoare, un alt colectiv a sintetizat o serie de esteri aromatizanți: acetat de izoamil, butirat de etil, butirat de izopropil, propionat de izoamil, butirat de izoamil cu randamente cuprinse între 92-97 %, lucrând la 40°C, sub agitare, în mediu de n-hexan și la un conținut inițial de apă al sistemului de 0,4 %. Enzima folosită a fost Lipozyme [214].

Bloomer ș.a. au obținut o serie de esteri etilici ai acizilor grași cu lipază din *Rhizomucor miehei* (Lipozyme), utilizând drept mediu de reacție n-pentan sau n-hexan, la reflux și cu îndepărtarea apei formate în reacție. S-au obținut cu randamente de peste 99 % esteri ai acizilor oleic, linoleic, α -linolenic și arahichidonic, fără a avea loc peroxidarea legăturilor duble. S-a sintetizat de asemenea și oleatul de oleil pe această cale, doar cu un grad scăzut de peroxidare [215]. Stearatul de etil a fost obținut și la scară preparativă (2 kg). La un raport molar etanol/acid stearic de 1,25 și o concentrație de enzimă de 5 % în

masa de reacție, s-a ajuns la conversie de peste 99 % după 90 de minute de refluxare în n-hexan [216].

O serie de esteri au fost sintetizați prin esterificare directă din acizii carboxilici și alcoolii corespunzători, cu lipază din *Candida cylindracea* imobilizată pe un suport de tip nylon, prin legare covalentă prin intermediul glutaraldehidei. Activitatea enzimei imobilizate a fost maximă în intervalul de temperatură cuprins între 25-37°C. Mediul de reacție utilizat a fost hexanul, în condiții aproape anhidre. Viteza inițială de formare a propionatului de etil din etanol și acid propionic a fost de 0,017 moli/h.g enzimă imobilizată. S-au sintetizat și alți esteri: butirat de etil, propionat de izoamil și butirat de izoamil, cu viteze inițiale comparabile, echilibrul de reacție atingându-se în mai puțin de 10 ore. Lipaza imobilizată s-a dovedit a fi stabilă, păstrând o treime din activitatea inițială după 72 ore de reutilizări repetate [217]. Sinteza esterilor menționați s-a realizat și în regim continuu, utilizând un reactor cu strat fix de catalizator [218].

Se poate deci constata că în ce privește tehnica realizării reacțiilor de esterificare în solvenți organici, sunt posibile trei variante:

- **sisteme bifazice** constând dintr-un solvent organic nemiscibil cu apa și o fază apoasă ce conține enzima;

- **sisteme microapoase** (numite și neapoase) în care enzima solidă (sub formă de pulbere sau fixată pe un suport insolubil) se găsește în suspensie într-un solvent nepolar;

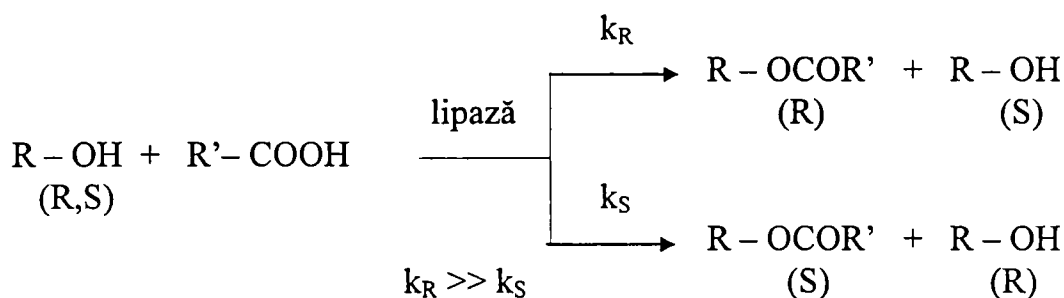
- **sisteme de micelii inverse sau microemulsii**, care sunt sisteme omogene ce pot fi considerate monofazice, deși de fapt sunt constituite din două faze lichide.

Monot ș.a. au studiat comparativ cele trei posibilități, utilizând ca model sinteza butiratului de butiril, care este posibilă în toate aceste cazuri. S-a constatat că din punct de vedere aplicativ sistemele microapoase și cele bifazice lichide determină obținerea unor rezultate la fel de bune, în timp ce sistemele micelare se recomandă doar în cazuri particulare compatibile cu constrângerile specifice pe care le implică, de exemplu la concentrații scăzute de enzimă [219]. Aceste concluzii sunt contrazise de alți autori care consideră sistemele de microemulsii apă-în-ulei mai avantajoase comparativ cu sistemele eterogene, datorită vitezelor mari de reacție și conversiilor ridicate obținute [220-222], sau chiar a unei enantioselectivități mărite [223].

O posibilitate interesantă este utilizarea lipsei de activitate a unor lipaze față de anumiți acizi grași nesaturați. O serie de lipaze, cum ar fi cele microbiene provenite din *Penicillium cyclopium*, *Candida cylindracea*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus delemar*, *Geothricum candidum*, dar și lipaza din semințe de rapiță manifestă o specificitate de substrat negativă față de acizii nesaturați ce au prima dublă legătură de la capătul carboxilic la un atom de carbon cu număr par. Acest tip de specificitate se bazează pe discriminare cinetică și poate fi utilizată pentru îmbogățirea în acizii respectivi a unor amestecuri de acizi grași ce rezultă prin hidroliza anumitor uleiuri naturale [224]. Un astfel de acid este acidul γ -linolenic (all-cis-6,9,12-octadeca-trienoic) care prezintă interes biomedical considerabil [225]. Lipaza provenită din semințe de rapiță a fost utilizată pentru îmbogățirea în acid γ -linolenic a amestecului de acizi grași ce rezultă prin hidroliza uleiului din semințe de luminița-noptii (*Oenothera biennis*). Acest lucru s-a făcut prin esterificare selectivă enzimatică a amestecului respectiv cu n-butanol în n-hexan. Majoritatea acizilor grași prezenți s-au esterificat, cu excepția acidului γ -linolenic [226-229]. Dacă s-a utilizat lipază din *Rhizomucor miehei*, concentrația de acid γ -linolenic din fracțiunea de acizi grași neesterificată a ajuns la 75 % [230]. Această metodă este mai bună decât hidroliza enzimatică selectivă a uleiului corespunzător, care determină îmbogățirea în acid γ -linolenic a fracțiunii de gliceride nehidrolizate [229, 231].

Un alt aspect important este că o serie de lipaze își mențin enantioselectivitatea demonstrată în reacțiile de hidroliză și în solvenți organici, atât în reacțiile de esterificare cât și în cele de transesterificare [173]. În ultima perioadă au fost identificați factorii structurali implicați în enantioselectivitatea lipazelor față de alcoolii secundari [232]. Tot recent s-a semnalat și faptul că enantioselectivitatea lipazelor în solvenții organici depinde și de modul în care a fost preparată enzima [233] și de natura solventului organic [285].

A fost studiată reacția unor alcoolii secundari alifatici C₅-C₁₀ și a unor alcoolii secundari aromatici cu acid dodecanoic, catalizată de lipaza din pancreas de porc, liberă sau imobilizată [234]. Diferențierea între cei 2 enantiomeri se produce prin rezoluție optică cinetică:

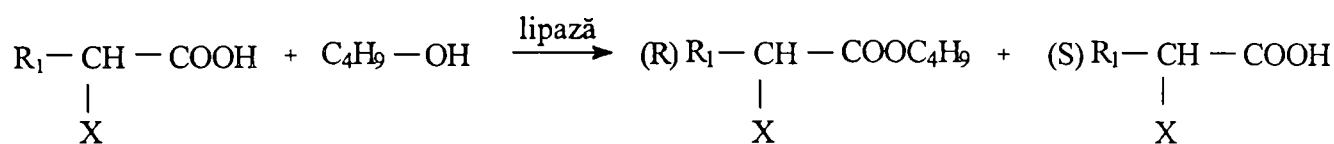


Datorită vitezelor de esterificare diferite ale celor doi enantiomeri, se obține o îmbogățire în enantiomerul (R) al esterului obținut și în enantiomerul (S) al alcoolului rămas nereacționat. În cazul utilizării enzimei libere, conversiile au fost cuprinse între 8-39 %, iar excesul de enantiomer (R) între 78-95 %. În cazul folosirii enzimei imobilizate, conversiile au fost asemănătoare, dar enantioselectivitatea a fost de cel puțin 94-95 %. Pentru alcoolii aromatici, conversiile se situează între 14-35 % (tabelul 3.10).

Tabelul 3.10. Esterificări enantioselective ale alcoolilor secundari optic activi cu acid dodecanoic, catalizate de lipaza pancreatică, liberă sau imobilizată [234]

Denumirea alcoolului	Temperatura (°C)	Timp (h)	Forma enzimei	Conversie (%)	e.e. (%)
2-pentanol	40	96	liberă	22	77,9
	70	48	liberă	21	87,4
2-hexanol	40	96	liberă	36	88,3
	70	48	liberă	30	95,8
	70	48	imobilizată	29	94,5
2-heptanol	40	96	liberă	31	91,4
	70	48	liberă	27	92,3
	70	48	imobilizată	32	94,4
2-octanol	40	96	liberă	39	88,0
	70	48	liberă	31	93,1
	70	48	imobilizată	36	94,9
1-fenil-etanol	40	96	liberă	35	95,4
	70	48	liberă	33	92,7
	40	96	imobilizată	36	99,1
1-fenil-1-propanol	40	96	liberă	19	90,8
	70	48	liberă	18	86,9
	40	96	imobilizată	16	99,6

Utilizând lipază din *Candida cylindracea*, Klibanov ș.a. au obținut o serie de esteri optic activi, pornindu-se de la acizi racemici și n-butanol, la 30°C (tabelul 3.11). Reacția a avut un grad ridicat de enantioselectivitate, obținându-se de fiecare dată izomerii (R) [235].



Tabelul 3.11. Condiții de reacție și rezultate obținute la esterificarea enantioselectivă a unor acizi carboxilici 2-substituiți racemici cu n-butanol [235]

R ₁	X	Solvent	Timp de reacție (h)	Randament în (R)-ester (%)	Exces enantiomeric (%)
CH ₃	Br	n-hexan	6	88	96
CH ₃	Cl	n-hexan	6	87	95
CH ₃ (CH ₂) ₃	Br	n-hexan	19	91	99
CH ₃ (CH ₂) ₁₃	Br	n-hexan + butil-eter (1:1)	22	76	a
C ₆ H ₅	Cl	n-hexan + butil-eter (1:1)	168	82	99
C ₆ H ₅	Br	n-hexan + butil-eter (1:1)	216	81	99

^a nu s-a reușit determinarea excesului enantiomeric

Esterificarea acidului octanoic cu 2-butanolul a fost realizată într-un reactor cu membrană poliamidică ce conținea enzima din *Candida rugosa* imobilizată. În regim de exploatare continuu și la un conținut inițial optim de apă de 0,5 % s-a obținut un exces enantiomeric de ester de cel puțin 85 % [236].

Enantiomerii (R) ai esterilor acidului 2-clorpropionic cu diferiți alcooli au fost obținuți de Gubicza ș.a. cu lipază din *Candida cylindracea* în solvenți nepolari la un conținut inițial de apă între 0,25-0,45 %, enantioselectivitatea reacției depinzând mult de natura solventului și de distribuția apei între enzima și solvent [237]. Această enantioselectivitate se poate corela liniar cu hidrofobicitatea solventului (exprimată prin log P), ea descrescând odată cu creșterea acesteia [238]. O constatare interesantă a fost că înlocuirea apei cu etilenglicol în sistemul de reacție a dus la creșterea atât a activității cât și a enantioselectivității enzimei [239, 240]. În cazul esterificării enantioselective a acidului 2-brompropionic cu n-butanol, pentru a elimina efectul nefavorabil al apei formate în reacție s-a lucrat în n-pentanol la reflux (35°C), apa fiind îndepărtată prin distilare heteroazeotropă [241].

Esterificarea enantioselectivă a D,L-mentolului, cu obținerea (-)-mentil-esterilor corespunzători, s-a realizat utilizând ca agenți de acilare anhidride de acizi (acetică, propionică și butirică). Cele mai bune rezultate s-au obținut cu lipază din *Candida cylindracea* și anhidridă butirică, în n-hexan, la 30°C și timp de reacție 48 h, când s-a atins un exces enantiomeric de 86 % [242].

3.2.2. Sinteze de esteri ai hidraților de carbon în prezență de lipaze

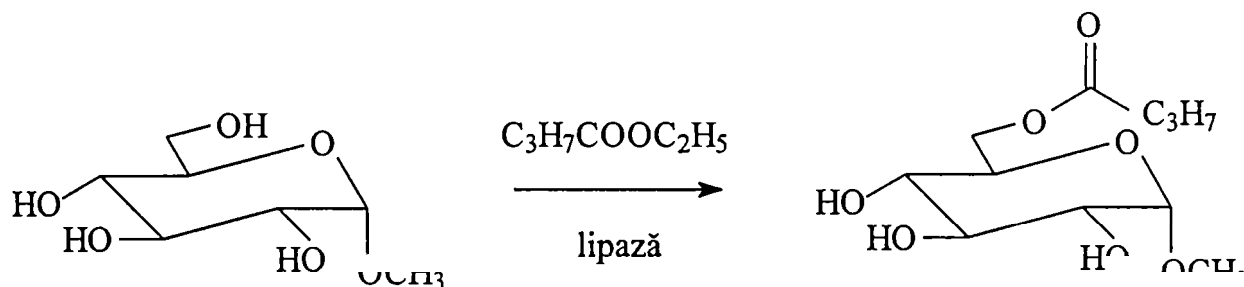
O altă utilizare posibilă a reacțiilor de esterificare catalizate de lipaze o reprezintă sinteza unor esteri ai hidraților de carbon cu acizii grași. Aceștia sunt utilizați drept emulgatori în industria alimentară, dar se pot folosi și ca detergenți sau la obținerea unor medicamente.

Primele semnalări referitoare la obținerea unor esteri ai zaharozei, glucozei, fructozei și sorbitolului în reacții catalizate de lipaze microbiene, cum ar fi *Candida cylindracea*, au indicat realizarea sintezei prin agitare timp de 72 ore în soluție tampon fosfat la 40°C, atingându-se grade de esterificare de până la 68 % în cazul esterilor cu acid oleic [211].

Cercetările ulterioare au mers pe două variante: fie utilizarea unor solvenți organici capabili să solubilizeze ambele substraturi, fie o "hidrofobizare" prealabilă a zaharurilor și realizarea reacției fără solvent. Deși prima variantă pare mai simplă, are dezavantajul că zaharurile nu sunt solubile decât într-un număr redus de solvenți organici hidrofilii, cum ar fi piridina sau dimetilformamida, care nu sunt potriviți pentru reacțiile enzimatice și determină obținerea unor conversii scăzute [243-245]. Utilizarea terț-butanolului ca solvent pentru sinteza esterilor glucozei și fructozei cu acid stearic a dus la randamente de asemenea scăzute, între 10 și 24 % [246]. Însă dacă acilarea unor dizaharide ca maltoza, zaharoza și lactoza a fost realizată prin transesterificare cu butanoat sau dodecanoat de etil, în terț-butanol, cu lipază immobilizată din *Candida antarctica*, pentru maltoză s-au semnalat chiar conversii ridicate [247]. Obținerea unor esteri ai hidraților de carbon cu aminoacizii prin transesterificare nu a fost posibilă în prezența lipazelor, dar s-a realizat cu proteaze [248].

O soluție propusă pentru eliminarea acestor probleme a fost complexarea mono- și dizaharidelor prin reacție cu acid fenilboronic, ele devenind astfel solubile într-o serie de solvenți organici anhidri. Astfel, s-a reușit acilarea α -D-glucozei cu o serie de esteri și acizi, în terț-butanol și în prezența lipoprotein-lipazei din *Pseudomonas species*, obținându-se după 24 de ore conversie de 100 % dacă agentul de acilare a fost butiratul de vinil și 97 % dacă s-a utilizat acid lauric [249].

O altă posibilitatea este transesterificarea 1-O-alchil-derivaților monozaharidelor cu diferiți esteri. Utilizând lipază din *Candida antarctica* immobilizată s-au obținut esteri ai glucozei, fructozei și galactozei. S-a constatat că se acilează mai întâi grupele hidroxil primare, apoi cele secundare, în funcție de structura compusului, o influență importantă asupra selectivității procesului având activitatea apei din sistem. Astfel, 1-O-metil- α -D-glucopiranoza s-a acilat cu butanoat de etil în exces (acesta îndeplinind și rolul de mediu de reacție, la alte sinteze s-a adăugat și terț-butanol), timp de 5 zile la 40°C, obținându-se numai monoesterul corespunzător cu o conversie de 98 % [250]:



Metoda a doua pare să fie mai atractivă din punct de vedere tehnologic [251, 252]. Ea se bazează pe utilizarea ca materii prime a unor acetali ai zaharidelor. Astfel, reacția de

transesterificare dintre acetalul corespunzător și esterul metilic al acidului gras are loc fără solvent organic, iar produsul de reacție, mono- respectiv diesterul zaharidei se obține după hidroliza în mediu slab acid a acetal-esterilor corespunzători. Astfel s-au obținut, cu randamente bune, esteri cu acizii grași ai unor monozaharide ca glucoză, galactoză, xiloză [253-256], sau dizaharide ca lactoză și maltoză [257].

6-O-monoesterii glucozei au fost obținuți la scară pilot (20 kg) din etil-D-glucopiranozidă (amestec de anomeri α și β) prin simplă încălzire cu o topitură de acizi grași la 70°C și presiune scăzută, timp de 28 de ore, în prezența lipazei imobilizate din *Candida antarctica*. S-au obținut conversii de peste 90 % [258].

O altă posibilitate de a obține esteri parțiali ai zaharurilor în cataliză enzimatică este cea care pornește de la esterii peracilați corespunzători obținuți pe cale chimică, de exemplu prin dezacilarea regioselectivă a octaacetil-zaharozei cu lipaze [259, 260]. Au fost obținute rezultate bune și la interesterificarea pentaacetil-glucozei cu uleiuri vegetale sau oleat de metil în solvenți organici în prezența lipazei imobilizate din *Candida antarctica* [261].

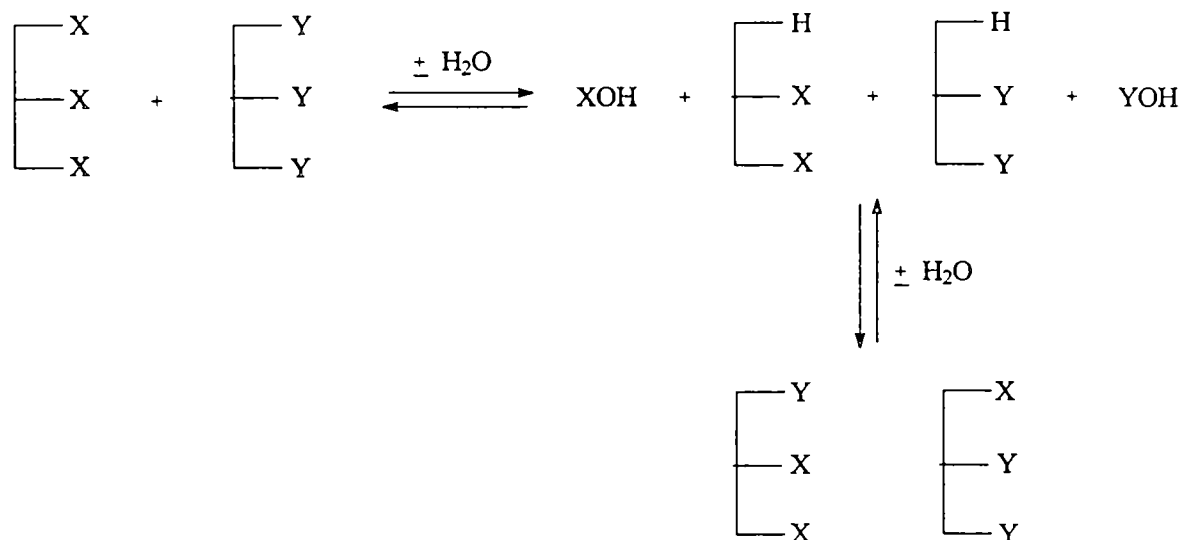
3.2.3. Reacții de modificare a trigliceridelor prin trans- și interesterificare

Trigliceridele sunt componentele majoritare ale grăsimilor și uleiurilor și proprietățile lor fizice depind de structura și distribuția resturilor de acizi grași din moleculele lor. Grăsimile și uleiurile naturale pot fi utilizate direct la obținerea de diferite produse alimentare, singure sau în amestec, însă uneori este necesară modificarea unora din proprietățile lor, în special a punctului de topire, pentru a le face corespunzătoare unor utilizări speciale. În industria grăsimilor și uleiurilor au fost dezvoltate procese de modificare a compoziției amestecurilor de trigliceride. Astfel, cristalizarea fracționată este utilizată pentru a separa grăsimile în fracțiuni solide și lichide, iar hidrogenarea reduce gradul de nesaturare a trigliceridelor, determinând creșterea punctului de topire.

Modificarea chimică sau enzimatică a trigliceridelor se poate realiza prin următoarele modalități [262, 263, 281]:

- hidroliză totală sau parțială, care a fost discutată anterior;
- transesterificare, prin reacția cu un alcool (alcooliză), de preferință glicerină, obținându-se mono- și digliceride, sau prin reacția cu un acid gras (acidoliză), obținându-se trigliceride cu o compoziție în acizi grași diferită de cea inițială;
- interesterificare, prin reacția cu un alt ester, care poate fi o trigliceridă sau un ester de acid gras, obținându-se trigliceride cu diferite distribuții de acizi grași. Utilizând specificitatea catalitică cunoscută a lipazelor pot fi obținute amestecuri de trigliceride care nu pot fi produse prin metodele clasice de trans- și interesterificare. Aceste reacții utilizează un sistem bifazic în care reactanții și produșii se găsesc într-o fază organică, în timp ce enzima este prezentă într-un mic volum de fază proteică hidratată.

Datorită reversibilității reacției catalizate de lipază, la amestecarea grăsimilor și uleiurilor cu lipaze au loc atât hidroliza cât și resinteza trigliceridelor. Aceasta determină un schimb între resturile de acizi grași din moleculele trigliceridelor, conform schemei următoare, în care X și Y reprezintă resturi acil [264]:



În condițiile în care conținutul de apă în sistem este redus, hidroliza grăsimilor și uleiurilor are loc în proporție mică și interesterificarea devine reacția principală.

Câteva exemple mai concludente de asemenea reacții de trans- și interesterificare vor fi prezentate în continuare.

Prin transesterificarea uleiului de ricin cu alcooli grași (de la decil la octadecil), în raport molar de 1/2,2 la temperatura de 60°C și presiune scăzută (2-5 mm Hg), după 4 ore de reacție s-au obținut randamente medii de 65 % în ester ricinoleic și 32 % în monogliceridă. S-a utilizat lipază 1,3-specifică din *Mucor miehei*, în concentrație de 10 % față de masa de reacție totală [265].

Prin gliceroliza seului de vită fără a se utiliza solvenți organici sau emulgatori, Yamane ș.a. au obținut monogliceride cu un randament care a depins mult de temperatura de reacție. Cel mai mare randament în monogliceridă, de aproximativ 70 %, s-a obținut la 42°C și un raport glicerină/seu între 1,5-2,5. Un conținut de apă de peste 8 % a fazei glicerinice determină scăderea randamentului în monogliceridă și creșterea conținutului în acizi grași liberi. Dintre lipazele microbiene testate, cele mai bune s-au dovedit a fi cele din *Pseudomonas fluorescens* și *Chromobacterium viscosum* [266].

O serie de alte grăsimi și uleiuri au fost transesterificate în mod asemănător cu 500 unități/g grăsime lipază din *Pseudomonas fluorescens* (tabelul 3.12) [267].

Randamentele de obținere a monogliceridelor pe bază de seu de vită și ulei de palmier au crescut la peste 90 % dacă s-a utilizat o temperatură de reacție programată în trepte: 42°C timp de 8-16 ore, urmată de menținere la 5°C timp de 4 zile [268]. Prin gliceroliza uleiului de măsline cu lipază din *Pseudomonas species* immobilizată prin adsorbție pe CaCO₃, s-au obținut randamente de 90 % după 72 de ore de reacție, iar catalizatorul enzimatic s-a recuperat și s-a reutilizat, menținându-și 60 % din activitatea inițială după zece reutilizări [269].

Tabelul 3.12. Gliceroliza unor grăsimi și uleiuri cu lipază din *Pseudomonas fluorescens*

Denumirea grăsimii sau uleiului	Temperatura optimă (°C)	Randament maxim în monogliceride (%)
seu de vită	42	76
untură de porc	30	69
grăsimi din lapte	32	80
ulei de palmier	40	67
ulei de cocos	30	77
ulei de rapiță	5	77
ulei de măsline	10	90
ulei din germeni de porumb	5	42
seu de vită hidrogenat	50	39
untură de porc hidrogenată	50	30

Spre deosebire de procesele chimice de modificare a trigliceridelor, la cele catalizate de enzime pot fi utilizați drept reactanți amestecuri de trigliceride și acizi grași. În aceste cazuri are loc un schimb între acidul gras și un rest acil al trigliceridei (acidoliză), obținându-se trigliceride cu un conținut mai ridicat în acidul gras adăugat. În același scop pot fi utilizați drept reactanți alchil-esterii acizilor grași și trigliceride, în reacții de interesterificare. Aceste procese de trans- și interesterificare enzimatică pot fi realizate fie discontinuu, în reactoare cu amestecare, fie continuu, în reactoare cu strat fix, fiind preferată cea de-a doua variantă. Pentru operare în reactoare cu strat fix, reactanții sunt tratați în prealabil pentru a îndepărta inhibitorii enzimei și dacă este cazul, dizolvați în hexan sau eter de petrol. În amestecul de reacție se adaugă o mică cantitate de apă, după care acesta se pompează continuu peste un strat de catalizator de lipază imobilizată. Prezența apei dizolvate în fluxul de materiale determină formarea unor cantități minore de produși secundari de hidroliză: digliceride și acizi grași [177].

Efectele diferiților parametri de reacție, cum ar fi conținutul de apă al amestecului de reacție și prezența solventului organic, asupra reacțiilor de transesterificare catalizate de lipaze au fost studiate detaliat.

Astfel în cazul reacției dintre ulei de măsline (1 parte) și palmitat de metil (0,96 părți), catalizată de Lipozyme Novo, utilizând ca solvent o fracțiune ușoară de petrol (100-120°C), într-un reactor continuu cu catalizator în strat fix și la temperatura de 40°C, s-a studiat efectul concentrației solventului și al apei în amestecul de alimentare al reactorului. S-a constatat că modificarea concentrației solventului are o influență mică atât asupra vitezei de reacție cât și asupra formării produșilor secundari. În același timp însă atât viteza de reacție cât și conținutul în produși secundari au scăzut cu scăderea concentrației apei în sistem. În absența apei, viteza de reacție a fost foarte scăzută și, așa cum era de așteptat, nu s-au format nici produși secundari. Aceasta înseamnă că pentru reactoarele industriale trebuie aleasă o concentrație optimă de apă care determină formarea unei anumite cantități de produși secundari, dar asigură o viteză de reacție minimă necesară [177].

Când s-au început cercetările în direcția unei posibile utilizări a lipazelor în domeniul trigliceridelor modificate, principalele preocupări au constat în obținerea unor produse a căror structură în trigliceride și proprietăți fizice să fie asemănătoare cu cele ale untului de cacao. Untul de cacao este probabil cel mai scump dintre grăsimile și uleiurile comercializate pe scară largă. Proprietățile sale sunt determinate de conținutul ridicat în

acid stearic ce trebuie să se găsească în pozițiile 1 sau 3 ale trigliceridelor. Principalii acizi grași din compoziția untului de cacao sunt acidul palmitic (25 %), acidul stearic (33,3 %) și acidul oleic (36,1 %) [270]. Produse ce pot înlocui untul de cacao au fost obținute pornindu-se de la ulei de palmier sau de măsline, în prezența unei lipaze specifice pentru pozițiile 1 și 3 ale trigliceridelor. Acidul oleic din pozițiile 1 și 3 ale trigliceridelor componente a fost înlocuit de acid palmitic, respectiv stearic. Tabelul 3.13. prezintă un rezumat al variantelor de sinteză care au fost brevetate de diferite firme, mai ales japoneze [211].

Tabelul 3.13. Obținerea de înlocuitori de unt de cacao prin procedee enzimactice [211]

Firma producătoare	Materii prime	Sursa enzimei	Condiții de reacție
Ajinomoto Japonia (1982)	ulei de măsline sau de palmier stearat de etil	<i>Rhizopus delemar</i>	discontinuu benzină, 40°C
Fuji Oil Japonia (1983)	fracțiune medie ulei de palmier stearat de metil palmitat de metil	<i>Rhizopus japonicus</i>	discontinuu 45°C
Asahi Denka Japonia (1983)	ulei de palmier acid stearic	<i>Rhizopus delemar</i>	discontinuu n-hexan, 40°C
Unilever Olanda (1983)	ulei de palmier acid miristic	<i>Aspergillus niger</i>	reactor continuu tip coloană, 40°C

Conform unor informații, se pare că din anul 1988 firma Fuji Oil a reușit industrializarea acestui procedeu utilizând o lipază imobilizată [282, 283].

Lipaza din pancreas de porc, care este de asemenea 1,3-specifică, poate fi utilizată și ea pentru obținerea de înlocuitori de unt de cacao prin transesterificare. Ca solvent pentru aceste reacții, cel mai adecvat s-a dovedit a fi n-hexanul. Astfel, la transesterificarea uleiului de măsline cu acid stearic în n-hexan, utilizând lipază din *Rhizopus delemar* dizolvată în glicerină, după trei zile de reacție la 40°C s-a obținut un conținut în acid stearic al trigliceridei de 40 % [211].

Experimentările făcute la firma Novo au utilizat lipază microbiană precipitată pe Celite drept catalizator și un reactor tip coloană. Amestecul de reacție a constat din ulei de măsline, acid palmitic și eter de petrol în raport 1:1:30. Conținutul inițial de apă al sistemului a fost de 10 % în greutate raportat la enzimă, iar temperatura a fost menținută la 40°C. Viteza de trecere prin coloană s-a calculat astfel încât să corespundă unei conversii de 65 % (considerând pozițiile 1 și 3 ale trigliceridei). După o funcționare de aproximativ 1000 ore s-a calculat productivitatea în kg grăsime/kg enzimă. S-a constatat o activitate inițială de 1,0-1,5 g grăsime/h/g enzimă și un timp de înjumătățire a activității de aproximativ 600 de ore, ceea ce conduce la o productivitate de 520-780 kg grăsime la 1 kg enzimă după 800 ore (33 de zile), activitatea reziduală fiind de 40 %. Această productivitate depinde de temperatură, raportul reactanților, concentrația substratului și valoarea conversiei necesare [271].

Un exemplu tipic de reacție de transesterificare în sistem discontinuu a utilizat drept materii prime o fracțiune medie de ulei de palmier (1 parte) și acid stearic (0,5 părți) dizolvate în eter de petrol. Catalizatorul folosit a fost obținut prin imobilizarea lipazei 1,3-specifice din *Aspergillus niger* pe kieselgur și hidratare. Amestecul de reacție s-a agitat timp de 16 ore la temperatura de 40°C. Reacția de transesterificare a fost însoțită de

formarea digliceridelor și acizilor grași ca produși secundari. Majoritatea acestora s-a format în prima oră de reacție. Analiza produșilor de reacție a arătat creșterea conținutului în acid stearic al produsului și încorporarea resturilor de acid stearic în pozițiile 1 și 3 ale trigliceridelor [272].

Transesterificarea fracțiunii medii de ulei de palmier (numită și palm-oleină) cu acid stearic se poate efectua și fără solvent organic. Astfel, un produs similar cu untul de cacao s-a obținut la 60°C după 20 de ore de reacție, utilizând agitare mecanică și un conținut de Lipozyme de 10 % raportat la cantitatea de ulei inițială. Raportul de greutate ulei/acid stearic a fost de 2/1 [273].

O variantă îmbunătățită a procesului de transesterificare, aflată în prag de industrializare, utilizează sistemul de reacție continuu cu catalizatorul în strat fix. În cazul reacției dintre fracțiunea medie de ulei de palmier și acid stearic în hexan, utilizând un catalizator obținut din lipază din *Mucor miehei* s-a obținut un amestec de gliceride ce a fost fracționat utilizând tehnicile cunoscute, rezultând cu randament bun un compus a cărei compoziție chimică este foarte apropiată de cea a untului de cacao. De asemenea, proprietățile fizice principale ale untului de cacao, în special intervalul de topire, se regăsesc la produsul sintetizat [177].

Un înlocuitor de unt de cacao având un conținut de acid stearic corespunzător celui din fracțiunea medie de ulei de palmier interesterificat s-a obținut și pe bază de ulei de floarea-soarelui. Acesta a fost interesterificat cu stearat de etil, în prezență de Lipozyme. Un produs cu conținutul de acid stearic încorporat dorit s-a obținut după 140 de minute la 50°C, la un conținut de 5 % enzimă față de masa de reacție și în același timp cantitățile de acizi grași liberi și trigliceride formate au fost scăzute (6-7 %), iar formarea tristearinei nu a fost observată [216].

Au fost studiate și o serie de alte variante ale reacțiilor de transesterificare ale trigliceridelor catalizate de lipaze, reactanții și condițiile de reacție diferind în funcție de scopul urmărit.

Astfel, transesterificarea uleiului de floarea-soarelui cu un acid gras cu lungime medie a catenei hidrocarbonate, duce la obținerea unor trigliceride ce conțin resturi acil cu catene de lungime medie în pozițiile 1 și 3 și cu catene lungi în poziția 2. Asemenea produse, care nu se întâlnesc în natură și sunt dificile de obținut prin sinteză chimică, pot avea aplicații interesante ca produse dietetice [183].

Interesterificarea uleiului de rapiță cu o fracțiune de grăsime din unt cu punct de topire ridicat, catalizată de lipaza nespecifică din *Candida cylindracea*, duce la o schimbare statistică a resturilor acil, similară cu cea de la interesterificarea chimică [183]. O altă variantă de interesterificare a uleiului de rapiță, cu seu de vită, duce la amestecuri de grăsimi cu puncte de topire mai scăzute, această scădere fiind de până la 12°C [274].

Acidul linolenic este un component nedorit al uleiului de soia, datorită rezistenței sale scăzute la oxidare. S-a reușit o reducere substanțială al acestui conținut prin transesterificarea uleiului de soia cu acid lauric, palmitic sau oleic, la temperaturi scăzute (10°C) utilizând drept catalizator Lipozyme și, într-o măsură mai mică, lipază pancreatică [183].

S-a realizat și interesterificarea trioleinei cu trigliceride conținând resturi acil cu catenă scurtă sau medie în așa-zise "microemulsii inverse" similare cu miceliile inverse. De asemenea, a fost semnalată utilizarea bioxidului de carbon supercritic drept mediu de reacție pentru transesterificarea trioleinei cu acid stearic, catalizată de lipaze din *Rhizopus delemar*, *Rhizopus japonicus*, *Alcaligenes species* și *Mucor miehei* [183]. În aceste direcții cercetările sunt abia la început, dar ele prezintă de pe acum perspective deosebite de aplicare în viitor.

Interesterificarea trioleinei cu caprilat de etil în prezența lipazei imobilizate din *Candida antarctica* a dus la un produs conținând 62 % dicapriloleină, 33,5 % monocapriloleină și 12,3 % trioleină nerecționată. Asemenea reacții se pot utiliza pentru obținerea unor trigliceride cu o anumită structură dorită, ce conțin resturi de acizi grași cu catenă medie și care se folosesc în medicină [275].

Reacțiile de transesterificare catalizate de lipază pot fi utilizate de asemenea pentru obținerea unor amestecuri de trigliceride având proprietăți funcționale prețioase pentru realizarea produse cu conținut caloric scăzut și grăsimi utilizate în panificație, cum ar fi margarinele. O serie de alte lipide pot fi modificate prin reacții de interesterificare catalizate de lipaze, de exemplu fosfolipidele [262, 276-279].

Se poate afirma că în prezent tehnologiile enzimatiche de esterificare și transesterificare sunt orientate în direcția obținerii unor produse cu valoare comercială ridicată. Principalul inconvenient al tehnologiilor enzimatiche este prețul ridicat al catalizatorului. Utilizarea industrială a enzimelor la obținerea produselor menționate este legată de necesitatea ca tehnologiile respective să devină mai ieftine, utilizând catalizatori mai productivi și/sau mai ieftini. Din fericire, există indicii conform cărora catalizatorii pe bază de lipaze imobilizate vor deveni mai eficienți și mai ieftini în viitorul apropiat. În trecut datorită unor randamente mai scăzute de obținere din culturi, lipazele au fost enzime scumpe în comparație cu alte enzime microbiene extracelulare, cum ar fi proteazele și amilazele. În ultima perioadă însă utilizând tehnici de inginerie genetică a fost posibilă obținerea unor lipaze fungice cu randamente mari și cost mai scăzut [177].

PARTEA II. Contribuții originale. Reacții de esterificare și transesterificare prin biocataliză cu lipaze

4. Obținerea și caracterizarea unor biocatalizatori enzimatici cu activitate lipazică

Așa cum a rezultat din studiul de literatură efectuat, lipazele se numără printre enzimele cu perspective deosebite de a fi utilizate în viitorul apropiat drept catalizatori în sinteze organice fine la scară industrială. Acest lucru este determinat de o serie de avantaje pe care ele le prezintă:

- posibilitatea obținerii lipazelor în cantități mari și prin procedee relativ simple, atât din culturi microbiene cât și prin izolare din țesuturi vegetale sau animale.

- specificitatea de substrat foarte extinsă a lipazelor, care face posibilă utilizarea lor drept catalizatori într-un mare număr de reacții de hidroliză, esterificare și transesterificare.

- menținerea activității catalitice a lipazelor în solvenți organici, foarte importantă pentru realizarea reacțiilor de esterificare și transesterificare cu randamente mari.

Scopul acestor cercetări a fost obținerea unor biocatalizatori enzimatici cu activitate lipazică pentru sinteze organice, care să poată înlocui preparatele comerciale accesibile doar la prețuri ridicate. Au fost încercate ambele variante de obținere a lipazelor: din culturi microbiene și prin izolare din țesuturi. Preparatele brute obținute s-au purificat, fără a urmări însă o purificare prea avansată, care ar fi necesitat aparatură complexă și ar fi implicat o serie de etape extrem de laborioase ce determină o creștere însemnată a prețului de cost al enzimei. De asemenea, au fost caracterizate preparatele enzimactice obținute, determinându-se activitatea, conținutul în proteine și activitatea specifică.

4.1. Determinarea activității lipazice

Activitatea lipazei se exprimă în **unități enzimactice** și se definește drept cantitatea de enzimă dintr-un ml de extract enzimatic, sau dintr-un mg de preparat enzimatic solid, care determină eliberarea unui μmol de acid gras într-un minut, în condiții date, utilizând drept substrat trigliceride emulsionate.

$$\text{Activitatea} = \frac{\mu\text{moli acid gras}}{\text{minute} \cdot \text{ml extract}} \quad (\text{U/ml}) \quad (4.1)$$

sau

$$\text{Activitatea} = \frac{\mu\text{moli acid gras}}{\text{minute} \cdot \text{mg preparat}} \quad (\text{U/mg}) \quad (4.2)$$

În cazul în care raportarea se face la cantitatea de proteină din extractul lichid sau preparatul solid, se definește drept **activitate specifică**, exprimată în unități/mg proteină. Principiul determinării constă în următoarele: unei cantități determinate de trigliceridă emulsionată, aflată în anumite condiții de temperatură și pH, i se adaugă o cantitate definită de extract sau preparat enzimatic conținând lipază. După o perioadă de timp stabilită (în general 30 de minute sau o oră), în care enzima a hidrolizat o parte din legăturile esterice ale substratului, reacția este stopată și se determină cantitativ, prin titrare, acizii grași eliberați.

Reactivii utilizați în determinări au fost:

- ulei de măsline de proveniență comercială, utilizat drept substrat;
- soluții tampon Tris/HCl, CH₃COOH/CH₃COONa și NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ cu concentrația de 0,05 M și valori diferite de pH, preparate în laborator din reactivi de puritate analitică (Chimopar, București);
- soluție de gumă arabică (Serva Chemie, Austria) 1% preparată în laborator, utilizată drept emulgator;
- alcool etilic absolut (Chimopar, București), utilizat pentru stoparea reacției.

Modul de lucru. Într-un reactor de sticlă cu capacitatea de 50 cm³, prevăzut cu manta termostatabilă și agitare magnetică se introduc 10 ml soluție tampon, 1 ml soluție gumă arabică 1% și 1 ml ulei de măsline. Amestecul se emulsionează prin agitare timp de 10 minute și se termostatează la 37°C. Se adaugă apoi 1 ml extract enzimatic lichid sau aprox. 20 mg preparat enzimatic solid, după caz, considerând adăugarea enzimei drept momentul zero al reacției. După 30 de minute reacția este stopată prin adăugare de 40 ml alcool etilic absolut, în două porțiuni. Cantitatea de acizi grași eliberată se determină prin titrare potențiomtrică cu o soluție de NaOH 0,1 M. S-a folosit o instalație compusă dintr-un pH-metru digital OP-208 (Radelkis, Ungaria), o biuretă automată OP-930 (Radelkis) și un înregistrator potențiomtric OH-8410 (Radelkis). Pentru fiecare probă s-a realizat în paralel și o probă martor în aceleași condiții, cu diferența că enzima s-a adăugat după ce substratul emulsionat a fost menținut la 37°C timp de 30 de minute și stoparea reacției s-a făcut imediat după adăugarea enzimei.

Activitatea s-a determinat cu una din relațiile:

$$A = \frac{(V_P - V_M) \cdot n \cdot f}{t \cdot V} \cdot 1000 \quad (\text{U/ml}) \quad (4.3)$$

sau

$$A = \frac{(V_P - V_M) \cdot n \cdot f}{t \cdot g} \cdot 1000 \quad (\text{U/mg}) \quad (4.4)$$

unde

- A - activitatea enzimatică
- V_P - volumul de echivalență al probei (ml)
- V_M - volumul de echivalență al martorului (ml)
- n - normalitatea soluției de hidroxid de sodiu
- f - factorul soluției de hidroxid de sodiu
- t - timpul de incubare (minute)
- V - volumul extractului enzimatic (ml)
- g - cantitatea de preparat enzimatic (mg)

Determinarea conținutului în proteine s-a făcut prin metoda Lowry, curba de etalonare fiind făcută cu soluție de albumină serică de bovină (Reanal, Ungaria).

4.2. Obținerea prin biosinteză și purificarea lipazei din *Aspergillus niger* IC [287, 288]

Obținerea lipazelor din culturi microbiene se poate face utilizând o serie de microorganisme producătoare de astfel de enzime. Cele mai eficiente s-au dovedit a fi drojdiile din genul *Candida*, fungiile din genurile *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geothricum*, cât și bacteriile din genurile *Pseudomonas*, *Acinetobacter* și *Mucor*. Am ales o tulpină de *Aspergillus niger*, provenită de la Institutul Cantacuzino (București), întrucât această ciupercă este accesibilă, nepatogenă, nu necesită condiții speciale de stocare și nici factori de creștere. Culturile au fost realizate în două variante: pe medii solide și pe medii lichide, având la bază procedura și modul de lucru care au fost anterior experimentate pentru obținerea altor două enzime hidrolitice din culturi de *Aspergillus*: aminoacilaza și proteaza [325, 326].

Soluțiile tampon care au fost utilizate s-au preparat în laborator. Reactivii folosiți la realizarea mediilor de cultură și pentru purificare: CaCO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CH_3COOH , CH_3COONa , KCl , CaCl_2 , NaOH , toate provenite de la Chimopar București au fost de puritate analitică. Peptona a provenit de la Merck, zaharoza de la Fluka, iar Sephadex G-75 de la Pharmacia Fine Chemicals.

Pentru determinările spectrofotometrice s-a utilizat un spectrofotometru UV-VIS tip M 40 (Carl Zeiss Jena).

4.2.1. Culturi pe medii solide

Mediul solid utilizat pentru cultivarea ciupercii a conținut tărâțe de grâu 42,4%, CaCO_3 1% și apă 56,6%. Acest mediu (notat cu ANS-1) s-a introdus într-un vas conic de 1 l și s-a sterilizat 30 minute la 120°C .

Inocularea s-a efectuat în condiții sterile cu o tulpină de *Aspergillus niger* dezvoltată pe mediu Sabouraud solid. Proba s-a menținut la 37°C timp de 4 zile, amestecându-se din timp în timp. În acest timp ciuperca s-a dezvoltat și a produs spori, mediul transformându-se într-o masă închisă la culoare.

Tinând seama de faptul că lipaza este o enzimă extracelulară solubilă în apă, prelucrarea mediului s-a făcut cu apă distilată, prin agitare timp de 2 ore. S-a obținut o suspensie de spori, tărâțe și micelii de culoare neagră care s-a filtrat, obținând o soluție turbidă de culoare neagră, care s-a centrifugat la 0°C timp de 30 minute la 2500 rot/min., reținându-se supernatantul. Extractul brut a avut pH 5,5. În acest extract au fost determinate activitatea și conținutul de proteine.

S-au mai făcut încă 4 culturi pe mediu solid, utilizând însă alte compoziții ale mediului de cultură. Inocularea, incubarea și prelucrarea mediului s-au făcut în condițiile indicate.

Rezultatele obținute în cazul culturilor pe medii solide sunt prezentate în tabelul 4.1. S-au calculat activitățile, activitățile specifice raportate la cantitățile de proteină și productivitățile, ca raportul dintre activitățile totale și masa sursei de carbon din mediu.

Dintre cele trei tipuri de medii solide utilizate, mediul recomandat pentru cultivarea microorganismului *Aspergillus niger* în scopul obținerii unei cantități cât mai mari de lipază este alcătuit din tărâțe de grâu, coji de orez și ulei de măsline, în acest caz obținându-se atât activitatea specifică cea mai mare cât și productivitatea maximă. În cadrul acestui tip de mediu, la cantități variabile de ulei de măsline se obțin cantități diferite de lipază, practic la aceeași cantitate de proteină eliberată. Se observă că lipaza cea

mai multă, cea mai pură și cu productivitatea cea mai mare se obține în prezență de 0,5% ulei de măsline în mediu (ANS-3).

Tabelul 4.1. Culturi pe medii solide

Cultura	Compoziția mediului %	Proteine mg/ml	Activitate		Productivitate U/ g C
			U/ml	U/mg prot.	
ANS-1	Tărâțe de grâu 42,4 CaCO ₃ 1,0 Apă 56,6	2,834	2,003	0,707	10,0
ANS-2	Tărâțe de grâu 65,4 Coji de orez 34,6	1,740	0,526	0,302	3,0
ANS-3	Tărâțe de grâu 65,0 Coji de orez 34,5 Ulei de măsline 0,5	1,631	2,088	1,280	15,0
ANS-4	Tărâțe de grâu 65,0 Coji de orez 34,0 Ulei de măsline 1,0	1,605	1,600	0,996	12,0
ANS-5	Tărâțe de grâu 64,5 Coji de orez 34,0 Ulei de măsline 1,5	1,581	1,400	0,884	10,0

4.2.2. Culturi pe medii lichide

Așa cum a rezultat din studiul documentar, există indicații de literatură pentru obținerea lipazei din culturi de *Aspergillus niger* pe medii lichide. Ținând cont de avantajele pe care această metodă le oferă (printre care evitarea împrăștierii sporilor în atmosferă, ceea ce ar putea cauza infecții și eliminarea unor operații de extracție) s-a încercat cultivarea ciupercii și pe un asemenea tip de mediu.

Mediul lichid folosit inițial (notat cu ANL-1) a conținut zahăr 1%, peptonă 2%, MgSO₄·7H₂O 0,05%, K₂HPO₄ 0,2% și apă 96,75%. Acest amestec s-a preparat într-un vas conic de 1 litru și s-a sterilizat timp de 30 de minute la 120°C. pH-ul inițial a avut valoarea 6,0. Inocularea s-a realizat în același mod ca la culturile pe medii solide. Perioada de incubație a fost de 4 zile la 37°C, sub agitare continuă pe o masă cu agitare. Prelucrarea mediului s-a efectuat prin filtrarea produsului lichid. A rezultat un extract proteic brut limpede, de culoare galben-pai și având pH 4,5.

S-au mai făcut alte 2 culturi, pe medii cu compoziții diferite, dar în aceleași condiții de inoculare, incubare și prelucrare a mediului.

Tabelul 4.2 conține rezultatele culturilor pe medii lichide.

Tabelul 4.2. Culturi pe medii lichide

Cultura	Compoziția mediului %		Proteine mg/ml	Activitate		Productivitate U/ g C
				U/ml	U/mg prot.	
ANL-1	Zahăr	1,0	5,820	0,150	0,025	22,0
	Peptonă	2,0				
	K ₂ HPO ₄	0,2				
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,05				
	Apă	96,75				
ANL-2	Extract fasole	9,5	0,156	0,183	1,170	11,5
	K ₂ HPO ₄	0,4				
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,4				
	CaCO ₃	1,0				
	Apă	88,6				
ANL-3	NH ₄ NO ₃	0,1	0,335	0,402	1,200	33,0
	KH ₂ PO ₄	0,2				
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,04				
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,1				
	Zaharoză	1,0				
	Ulei de măsline	1,0				
	Apă	97,56				

Analizând parametrii care caracterizează cele 3 culturi, se constată că cea mai mare cantitate de proteine se obține în condițiile culturii ANL-1, când însă activitatea lipazică este scăzută iar puritatea lipazei este redusă (activitatea specifică cea mai mică). Cele mai mari valori ale acesteia se întâlnesc în cazul culturii ANL-3, la care se constată și cea mai mare productivitate. Se poate afirma deci că în cazul culturilor de *Aspergillus niger* pe medii lichide, mediul optim de cultură și condițiile de prelucrare sunt cele descrise pentru cultura ANL-3.

4.2.3. Purificarea extractelor brute din mediile de cultură

În extractele proteice apoase coexistă împreună cu enzima dorită și alte enzime, proteine cu mase moleculare și încărcări electrice diferite, acizi nucleici și nucleotide, polizaharide etc. Aceste substanțe contaminante pot fi îndepărtate treptat din extractul proteic, realizându-se purificarea enzimei, pentru care se pot utiliza o serie de procedee ca: dializa, termoprecipitarea, precipitarea la pH izoelectric, fracționarea cu solvenți organici și săruri neutre, fracționarea prin gel-cromatografie sau cu ajutorul adsorbantilor, etc.

Dintre aceste metode, în cazul extractelor brute de lipază microbiană am utilizat precipitarea cu sulfat de amoniu și gel-filtrarea pe o coloană cu Sephadex G-75.

Principiul metodei și modul de lucru. Fiecare proteină precipită la o anumită concentrație de sare, teoretic fiind astfel posibilă o precipitare fracționată, treptată și deci o separare a acestora din amestec. După aceea este necesară eliminarea sulfatului de amoniu (desalefierea), ceea ce se poate realiza prin dializă față de apă distilată sau o soluție tampon, sau prin trecerea peste o coloană umplută cu gel de tip Sephadex. Sephadexul este un gel pe bază de dextran, care se obține din dextran nativ parțial hidrolizat și înrețelut cu o

anumită cantitate de epiclorigidrină. Trebuie remarcat că gel-filtrarea se poate utiliza și direct pentru purificarea extractelor de cultură filtrate, realizându-se trecerea lor pe coloană fără a fi fost supuse precipitării fracționate.

Precipitarea extractelor din medii solide cu sulfat de amoniu s-a efectuat la rece, în trepte, la 30 %, 50 % și respectiv la 70 % saturație. Extractul brut supus precipitării s-a adus la pH 7. După fiecare etapă de precipitare, suspensia rezultată a fost centrifugată la 7000-8000 rot./min, iar precipitatul separat în urma centrifugării a fost dizolvat într-o cantitate mică de apă distilată și a fost dializat față de apă distilată, pentru eliminarea sulfatului de amoniu. Frațiunile dializate au fost apoi centrifugate. Tuturor fracțiunilor lipsite de sulfat de amoniu li s-au determinat cantitatea de proteine și activitatea.

Pentru filtratele culturilor pe medii lichide s-a încercat precipitarea cu sulfat de amoniu la saturație de 50 % și 70 %. După centrifugare și separarea precipitatelor, acestea au fost reluate cu soluție tampon acid acetic/acetat 0,025 M de pH 5,6, conținând 0,05 M KCl și 0,05 M CaCl₂ și supuse dializei față de același tampon. După terminarea dializei (verificată prin dispariția ionilor de sulfat în tamponul de dializă), suspensia obținută s-a centrifugat, iar precipitatul s-a reluat cu aceeași soluție tampon.

Mecanismul de separare prin cromatografie pe gel (sau de excluziune sterică) se bazează pe coeficientul de repartiție al unui solut între faza gel și faza lichidă, care este guvernat exclusiv de efecte sterice. Moleculele mici pătrund în ochiurile rețelei tridimensionale ale gelului și sunt distribuite între lichidul liber și lichidul care îmbibă gelul, având viteză de eluție mică, în timp ce moleculele mai mari care au puțin acces în spațiul gelului prezintă viteză de eluție mare. Purificarea prin gel-filtrare s-a făcut prin trecerea pe o coloană cu gel Sephadex G-75, cu diametrul de 18 mm și înălțimea de 270 mm, tamponată soluție tampon acid acetic/acetat 0,025 M pH 5,6 cu un conținut de 0,05 M CaCl₂ și 0,05 M KCl, a unui volum de 11 ml extract brut de la cultura ANL-3, centrifugat în prealabil la 6500 rot/min timp de 15 minute. Eluarea coloanei s-a făcut cu același tampon. S-au cules probe din 5 în 5 ml, viteza de eluție fiind de 30 ml/h și s-a măsurat extincția la 280 nm. În fracțiunile cu absorbție la 280 nm s-au determinat activitatea și conținutul de proteine.

4.2.3.1. Purificarea extractului brut de la cultura pe mediu solid prin precipitare cu sulfat de amoniu

Rezultatele obținute la purificarea extractului brut de la cultura ANS-3 pe mediu solid sunt prezentate în tabelul 4.3. S-au calculat și valorile factorilor de purificare (ca raport între activitatea specifică a fracțiunii și a extractului brut) și randamentele de regăsire ale enzimei în diferitele fracțiuni (ca raport între activitatea totală dintr-o fracțiune și cea a extractului brut).

Tabelul 4.3. Purificarea extractului brut obținut pe medii solide prin precipitare cu sulfat de amoniu

Cultura	Fracțiunea	Proteine mg/ml	Activitate		Factor de purificare	Randament %
			U/ml	U/mg		
ANS-3	Extract brut	1.631	2.088	1.280	1.0	100.0
	Pp. cu 30% (NH ₄) ₂ SO ₄	1.450	0.208	0.143	0.11	0.001
	Pp. cu 50% (NH ₄) ₂ SO ₄	1.714	0.253	0.147	0.09	0.002
	Pp. cu 70% (NH ₄) ₂ SO ₄	1.005	4.186	4.166	3.25	14.3

Din analiza rezultatelor acestui tabel rezultă că activitatea lipazică nu se regăsește decât în fracțiunea rezultată după precipitarea cu sulfat de amoniu la saturație de 70%, reluată cu apă și supusă dializei și centrifugării, dar și aici factorul de purificare și randamentul de regăsire sunt mici.

4.2.3.2. Purificarea extractului brut de la cultura pe mediu lichid prin precipitare cu sulfat de amoniu

Rezultatele analizelor de determinare a conținutului de proteine și activităților după precipitarea cu sulfat de amoniu a extractului brut de la cultura pe mediu lichid ANL-3 sunt prezentate în tabelul 4.4, care conține și factorii de purificare și randamentele de regăsire ale enzimei.

Tabelul 4.4. Purificarea extractului brut obținut pe medii lichide prin precipitare cu sulfat de amoniu

Cultura	Fracțiunea	Proteine mg/ml	Activitate		Factor de purificare	Randament %
			U/ml	U/mg		
ANL-3	Extract brut	0.335	0.402	1.200	1.0	100.0
	Pp. cu 50% (NH ₄) ₂ SO ₄	0.537	0.785	1.465	1.22	24.4
	Pp. cu 70% (NH ₄) ₂ SO ₄	0.119	-	-	-	-

Se observă că în acest caz se reușește o purificare de numai 1,2 ori a lipazei prin precipitare cu sulfat de amoniu la 50% saturație, urmată de dializă. Randamentul de regăsire al enzimei este însă mai mare decât în cazul culturilor pe medii solide, fiind de aproape 25%.

4.2.3.3. Purificarea extractului brut de la cultura pe mediu lichid prin gel-filtrare

Rezultatele purificării extractului brut de la cultura ANL-3 prin gel-filtrare pe o coloană cu Sephadex G-75 sunt prezentate în tabelul 4.5. Volumul extractului brut supus purificării a fost de 11 ml și au fost culese 30 de probe a câte 5 ml.

Tabelul 4.5. Purificarea extractului brut obținut pe medii lichide prin gel-filtrare

Nr. probă	Volum ml	Proteine mg/ml	Activitate		Factor de purificare	Randament %
			U/ml	U/mg		
Extract brut	11	0.494	0.173	0.351	1.0	100.0
1-14	5	-	-	-	-	-
15	5	0.175	0.066	0.378	1.07	17.3
16	5	0.135	0.304	2.252	6.41	79.6
17	5	0.073	-	-	-	-
18	5	0.032	-	-	-	-
19-30	5	-	-	-	-	-

Valoarea mai mică a activității inițiale a extractului brut se datorește intervalului de timp (câteva zile) în care acesta a fost păstrat în soluție apoasă, ceea ce a dus la dezactivarea sa parțială. În urma analizei datelor din acest tabel se observă că prin trecerea pe coloană cu gel Sephadex G-75 se obține o purificare de 6,4 ori a enzimei și o concentrare a acesteia aproape numai într-o singură fracțiune de 5 ml. Randamentul de regăsire a activității lipazice este de 97%, în cele două fracțiuni care au avut activitate.

4.2.4. Concluzii

Comparând rezultatele cele mai bune ale culturilor de *Aspergillus niger* pe medii solide și respectiv lichide, se pot trage următoarele concluzii:

- la același volum de extract brut în cazul culturii pe mediu solid (ANS-3) se obține o cantitate de proteină de aproximativ 5 ori mai mare decât cea obținută pe mediu lichid (ANL-3).

- activitatea lipazică raportată la 1 ml extract brut precum și activitatea totală sunt de asemenea mai mari în cazul culturilor pe medii solide.

- valorile maxime ale activităților specifice sunt aproximativ aceleași (1,2 U/mg) în cazul ambelor tipuri de culturi.

- productivitatea, definită ca fiind raportul dintre activitatea totală și masa sursei de carbon din mediu, este de două ori mai mare în cazul culturii pe medii lichide.

În aceste condiții, deși cantitatea totală de lipază este mai mare la cultura pe mediu solid, ținând seama că productivitatea obținută pe mediul lichid este mai mare și deoarece cultivarea ciupercii este mai avantajoasă pe mediu lichid (acesta asigurând omogenitate, posibilității de aerare, prelucrare mai ușoară a mediului) se poate afirma că se recomandă pentru obținerea lipazei din *Aspergillus niger* cultivarea ciupercii pe mediu lichid conținând: fosfat monopotasnic, azotat de amoniu, sulfat de magneziu, sulfat feros, zaharoză și ulei de măsline, în proporția și după modul indicat la cultura ANL-3.

Prin analiza comparativă a rezultatelor obținute la purificarea extractelor brute de lipază se observă următoarele:

- precipitarea cu sulfat de amoniu are eficiență scăzută în cazul purificării extractelor provenite din culturile de pe medii solide, iar în cazul purificării extractelor de pe medii lichide este mai eficientă precipitarea la 50 % saturație, care deși duce la un randament de regăsire a activității enzimatică numai în jur de 25 %, permite eliminarea unor compuși contaminanți care se găsesc în extractele brute

- în cazul purificării prin trecerea pe coloană cu gel Sephadex G-75 s-a obținut rezultate doar în cazul trecerii directe a extractului brut fără nici o altă treaptă anterioară de purificare. În acest caz s-a obținut cel mai mare factor de purificare (6,41) și cel mai mare randament de regăsire a activității enzimei (97%).

În concluzie, varianta cea mai bună pentru obținerea unui preparat enzimatic din culturi de *Aspergillus niger* constă în realizarea culturii în condiții submerse, pe un mediu de compoziție stabilă, urmată de trecerea directă a filtratului culturii pe o coloană cu Sephadex G-75 și reunirea fracțiunilor cu activitate lipazică.

4.3. Obținerea și purificarea lipazei din pancreas de porc [290]

Lipazele pancreatice joacă un rol important în metabolismul grăsimilor la animale și la om. Ele au fost studiate cel mai mult, datorită concentrației mari (2,5 % din totalul proteinelor din sucul pancreatic) și a posibilităților de purificare cu randamente mari. Cele mai mari cantități de lipază sunt produse în pancreasul de porc, de aceea pentru a obține

preparate enzimatice cu activitate lipazică am ales varianta de deshidratare și delipidizare a glandelor pancreatice cu solvenți organici. Prin această metodă se obține un preparat brut, așa-numita pudră acetonică pancreatică, ce conține pe lângă lipază și alte proteine și enzime. S-a încercat apoi purificarea acestui preparat, prin extracție din soluție apoasă la diferite valori de pH, urmată de precipitare cu solvenți organici sau gel-filtrare. Pentru caracterizarea preparatelor purificate obținute s-a determinat activitatea acestora atât pentru reacția de hidroliză a trigliceridelor, cât și pentru reacții de esterificare și transesterificare ale 1-pentanolului.

Reactivii utilizați au fost de proveniență comercială și puritate analitică, fiind utilizați fără purificare suplimentară. Triooleina și tris-(hidroximetil)-aminoetanul au provenit de la Loba Feinchemie (Austria), tributirina de la Merck, triacetina de la Fluka, iar n-decanul de la Riedel de Haen (Germania). Restul reactivilor utilizați: acetonă, alcool etilic, eter etilic, NaCl, CH₃COOH, CH₃COONa, K₂HPO₄, KH₂PO₄, au fost de la Chimopar București. Soluțiile tampon au fost preparate în laborator, conform unor rețete cunoscute din literatură [289]. Preparatele lipazice utilizate drept etaloane au fost lipaza pancreatică de la Fluka și pancreatina Merck.

4.3.1. Obținerea preparatului brut

Preparatul enzimatic brut s-a obținut astfel: 1 kg pancreas proaspăt de porc s-a curățat de țesuturile grase și conjunctive (aproximativ 0,4 kg) și s-a răcit la o temperatură între 0-2°C. Glandele pancreatice s-au măcinat fin și s-au agitat cu un volum total de 3 l de acetonă răcită la 0°C, în 4 porțiuni, câte 15 minute. După fiecare etapă, solventul a fost îndepărtat de pe reziduu prin decantare. Operația a fost repetată apoi în mod identic, folosind ca solvent de extracție 2 l eter etilic, în 3 porțiuni. Reziduu final, care nu mai avea consistența lipicioasă a materiei prime, s-a filtrat la vid și s-a uscat în curent de aer. Produsul uscat a fost măcinat și sitat de resturile de țesut conjunctiv, obținând o pudră acetonică pancreatică de culoare alb-gălbuie. S-au determinat activitățile, conținuturile în proteine și activitățile specifice ale acestor preparate.

Au fost făcute trei experimente, pornindu-se de la câte 1 kg pancreas proaspăt de porc, la care gradul de măcinare al pancreasului a fost diferit. Cantitățile de preparate brute obținute și activitățile, conținuturile de proteine și activitățile specifice ale acestora sunt prezentate în tabelul 4.6, comparativ cu niște preparate asemănătoare comercializate de firme de renume.

Tabelul 4.6. Preparate brute cu activitate lipazică obținute din pancreas de porc

Denumirea preparatului	Cantitatea g	Activitate U/mg	Proteine mg/mg	Activitate specifică U/mg proteină
Preparat brut 1	98,5	0,466	0,404	1,153
Preparat brut 2	81,4	1,087	0,536	2,028
Preparat brut 3	66,3	0,822	0,556	1,478
Lipază Fluka	-	0,500	0,365	1,370
Pancreatină Merck	-	0,247	0,220	1,123

Se observă că s-au obținut între 66-98 g preparat brut dintr-un kg de pancreas proaspăt, diferențele datorându-se gradului diferit de eliminare a substanțelor grase și țesuturilor conjunctive. Activitățile specifice se situează între 1,1-2,0 unități/mg proteină,

depinzînd atît de materia primă cît și de perioada și condițiile de stocare ale acesteia pînă la prelucrare. Aceste activități sunt foarte bune, comparabile și chiar mai mari decît ale enzimelor comerciale corespunzătoare.

4.3.2. Extracția lipazei din preparatul brut de pancreas

După îndepărtarea grăsimilor impurificatoare prin metoda degresării cu solvenți organici, faza următoare a constituit-o extracția cu randament maxim a lipazei din preparatul brut solid. Extracția a fost efectuată prin introducerea a cîte 1 g pudră acetonică pancreatică în 10 ml soluție tampon cu diverse valori ale pH-ului, avînd concentrația 0,05 M și, dacã a fost cazul, conținând NaCl pentru creșterea tãriei ionice și activarea enzimei. Extracția a durat 30 de minute, dupã care masa de extracție a fost centrifugată la 8.000 rot/min timp de 15 minute.

Influența pH-ului soluției de extracție și a tãriei ionice asupra activității lipazei extrase din preparatul brut este prezentată în tabelul 4.7. Pentru comparație, s-a efectuat o extracție numai cu apã distilată, pH-ul inițial fiind în acest caz în domeniul 5-6.

Tabelul 4.7. Influența pH-ului de extracție și a tãriei ionice asupra activității lipazei Extrase

Extracția nr.	Soluție tampon (0,05 M)	pH	Tãria ionică NaCl (M)	Activitatea (U/ml)
1.	-	5÷6	-	5,06
2.	CH ₃ COOH/CH ₃ COONa	5,6	-	5,38
3.	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	6,0	-	9,70
4.	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	7,0	-	8,57
5.	Tris*/HCl	8,0	-	27,48
6.	Tris/HCl	9,0	-	20,35
7.	Tris/HCl	8,0	0,1	30,93
8.	Tris/HCl	8,0	0,2	16,30

*Tris-(hidroximetil)-aminoetan

Activitatea extractului enzimatic crește ușor pînă la pH 6, rămîne aproximativ constantă în domeniul 6-7, înregistrează un salt însemnat la pH 8, apoi scade ușor la pH 9. Tãria ionică a fost modificată prin adăugare de clorurã de sodiu, tãria ionică a soluției tampon rămânând neschimbată. Creșterea tãriei ionice a soluției de extracție determină creșterea activității extractului la o concentrație de NaCl de 0,1 M și scãderea activității la 0,2 M. Așadar, extracția optimă s-a realizat cu soluție tampon Tris/HCl de pH 8,0 conținând 0,1 M clorurã de sodiu. În consecință, pentru faza următoare de purificare a preparatelor brute s-au utilizat extracte obținute în aceste condiții.

4.3.3. Purificarea lipazei din extractele brute

Pentru purificarea preparatelor brute de lipază pancreatică s-au utilizat două metode: gel-filtrarea pe Sephadex G-100 și precipitarea cu solvenți organici. Schema de purificare utilizată este prezentată sintetic în figura 4.1.

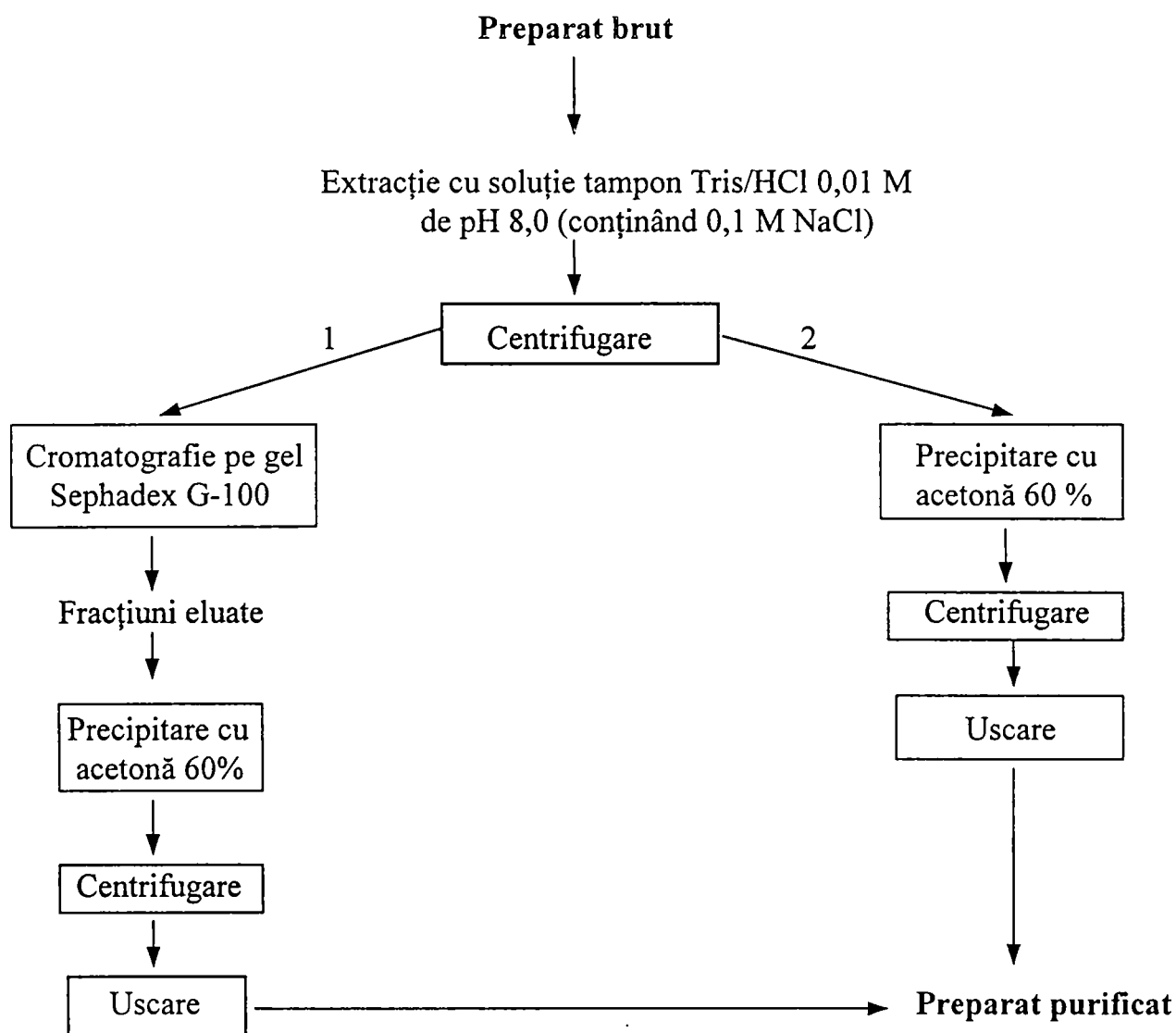


Figura 4.1. Schema de purificare a preparatelor brute de lipază din pancreas de porc

4.3.3.1. Purificarea prin gel-filtrare pe Sephadex G-100 urmată de precipitare cu acetonă

Pentru cromatografia pe gel s-a utilizat o coloană de sticlă cu lungimea de 300 mm și diametrul interior 18 mm.

5 g de preparat brut de pudră acetonică pancreatică s-au extras cu 50 ml soluție tampon Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 cu un conținut de 0,1 M NaCl, timp de 30 minute. Masa de extracție s-a centrifugat la 8000 rot/min timp de 15 minute, rezultând 35 ml supernatant care reprezintă extractul brut de lipază. Pe coloana tamponată în prealabil cu aceeași soluție

tampon cu care s-a efectuat extracția enzimei, s-au introdus 10 ml de extract brut de lipază. Colectarea fracțiilor a început după ce proba a intrat în întregime în gel, volumul fracțiilor de efluent colectate la partea inferioară a coloanei fiind de câte 5 ml.

Fracțiunile care au prezentat activitate lipazică au fost reunite, răcite la 0°C și precipitate fracționat cu acetonă răcită la -20°C, adăugată în picături, până la un conținut de 30 % și respectiv 60 % (vol.) acetonă. Suspensia s-a lăsat timp de 30 de minute la rece pentru perfectarea precipitării, apoi s-a centrifugat la 8.000 rot/min, timp de 10 minute. Precipitatul a fost uscat la aer.

Rezultatele obținute la purificarea prin cromatografie pe gel de Sephadex G-100 sunt trecute în tabelul 4.8 și figura 4.2.

Tabelul 4.8. Purificarea preparatului lipazic brut prin cromatografie pe gel

Probă	Volum ml	Proteine			Lipază				
		mg/ml	Totale mg	$\eta_{\text{regăsire}} \%$	U/ml	U/mg prot.	U totale	F.P*	$\eta_{\text{regăsire}} \%$
Extract brut	10	22,80	228,0	100,0	23,43	1,03	234,3	1,0	100,0
Fract. 2	5	0,252	1,26	0,56	0	0	0	0	0
Fract. 3	5	0,837	2,18	0,95	0	0	0	0	0
Fract. 4	5	2,857	14,28	6,26	11,06	3,88	55,3	3,8	23,6
Fract. 5	5	3,360	16,80	7,37	21,79	6,48	108,9	6,3	46,5
Fract. 6	5	2,310	11,55	5,07	8,62	3,73	43,1	3,6	18,4
Fract. 7	5	2,600	13,00	5,70	5,90	2,26	29,5	2,2	12,5
Fract. 8	5	3,460	17,30	7,59	0	0	0	0	0
Total**	20		55,63	24,40			236,8		101,0

*Factor de purificare (raportul dintre activitatea specifică a preparatului purificat și brut)

**S-au totalizat doar fracțiunile care au avut activitate lipazică

Din datele prezentate se observă că prin trecerea extractului brut pe coloana cu Sephadex G-100 se obține o purificare a enzimei obținute în fracțiunea 5 de peste 6 ori. Randamentul de regăsire al activității enzimatice în cele patru fracțiuni ce prezintă activitate lipazică este de aproximativ 100 %, în condițiile în care randamentul de regăsire a proteinelor este mai puțin de 25 %, confirmând faptul că a avut loc purificarea lipazei. Gradul de diluție al enzimei după trecerea pe coloană este de 2, considerând reunirea celor patru fracțiuni.

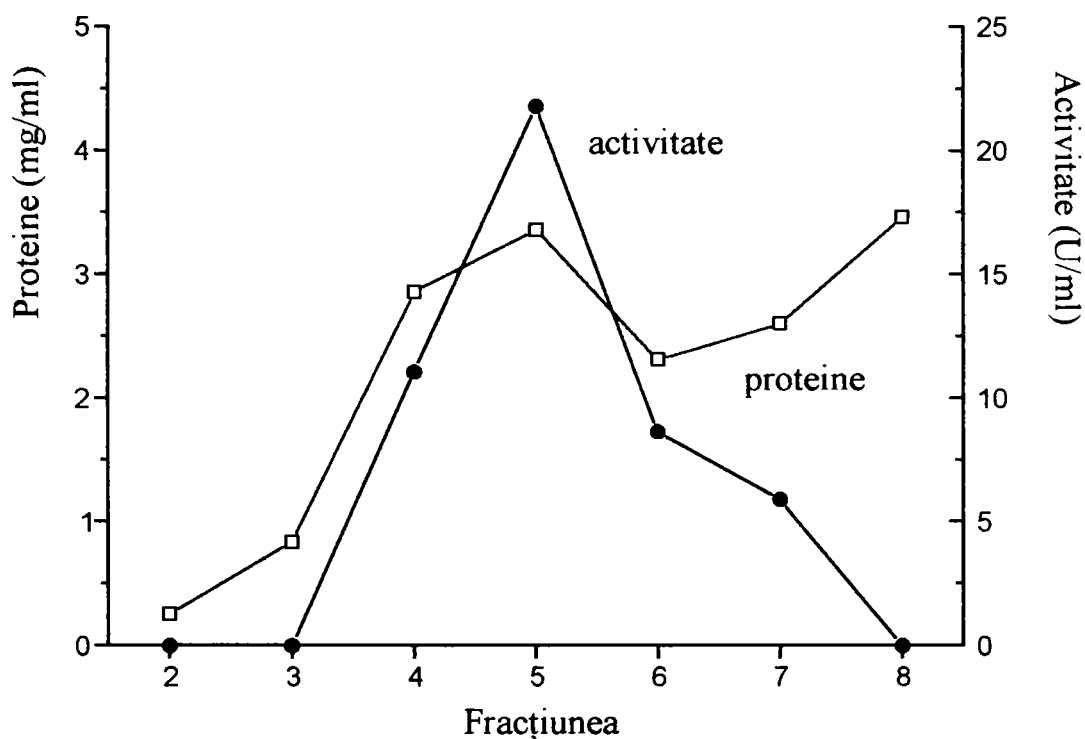


Figura 4.2. Activitatea și conținutul în proteine al fracțiunilor colectate

Fiind cunoscută instabilitatea enzimelor în soluții apoase diluate, faza următoare de purificare a fost precipitarea fracționată cu acetonă a fracțiunilor cu activitate lipazică, rezultate în urma cromatografiei pe gel (tabelul 4.9).

Tabelul 4.9. Purificarea prin precipitarea cu acetonă a fracțiunilor cu activitate lipazică rezultate după cromatografia pe gel

Probă	Cantit. ml* mg	Proteine			Lipază				
		mg/ml* mg/mg	Totale mg	$\eta_{\text{regăsire}}$ %	U/ml* U/mg	U/mg prot.	U totale	F.P.	$\eta_{\text{regăsire}}$ %
*Eluat coloană	70	2,815	197,0 5	100,0	10,2	3,62	714,0	1,00	100,0
*Fracț. 0-30%	5	4,034	20,17	10,23	19,6	4,85	98,0	1,34	13,7
*Fracț. 30-60%	5	7,689	38,45	19,51	23,4	3,04	117,0	0,84	16,4
Fracț. 0-60%	252	0,310	78,12	39,64	1,6	5,16	403,2	1,43	56,4

S-au trecut pe coloană mai multe porțiuni de extract din preparatul brut, reunind fracțiunile cu activitate lipazică. Jumătate (70 ml) din acest eluat s-a precipitat fracționat cu acetonă până la un conținut de 30 % și respectiv 60 %. Precipitatele obținute după centrifugare și îndepărtarea supernatantului au fost redizolvate în câte 5 ml soluție tampon, pentru determinarea activității și a conținutului în proteine.

Întrucât s-a constatat prezența activității lipazice în ambele fracțiuni precipitate, cealaltă porțiune de 70 ml eluat a fost precipitată direct până la un conținut de 60% acetonă, iar precipitatul obținut a fost uscat la aer (ultima poziție din tabelul 4.9).

Se poate remarca faptul că în urma cromatografiei pe gel urmată de precipitare s-au obținut randamente de regăsire a activității lipazice cuprinse între 30-60 %, într-o cantitate de proteină care reprezintă aproximativ 7-10 % din cea inițială. Activitățile mai mici la precipitarea în 2 fracțiuni se datoresc probabil dezactivării datorate menținerii o perioadă mai îndelungată a enzimei în soluție apoasă și în contact cu solventul organic. Factorul de purificare final al produsului solid purificat față de produsul solid brut de la care s-a plecat (preparatul brut 1 din tabelul 4.6) este de 4,5. În aceste condiții, pentru simplificarea procedurilor de purificare, s-a încercat precipitarea cu solvenți organici direct după extracția lipazei din preparatul brut, eliminând operația de cromatografie pe gel.

4.3.3.2. Purificarea prin precipitare cu acetonă

S-a făcut prin extracție cu soluție tampon Tris/HCl de pH 8,0 utilizând câte 8 g din preparatele brute 2 și 3 (tabelul 4.6). Precipitarea s-a făcut cu acetonă, la extractul din preparatul brut 2 în două fracțiuni, până la un conținut de 30 % și respectiv 60 %, iar la extractul din preparatul brut 3 direct până la 60 % (tabelul 4.10).

Tabelul 4.10. Purificarea lipazei prin precipitarea cu acetonă a extractelor brute

Probă	Cantit. g	Proteine			Lipază				
		mg/mg	Totale mg	$\eta_{reg\acute{a}sire}$ %	U/mg	U/mg prot.	U totale	F.P.	$\eta_{reg\acute{a}sire}$ %
Preparat brut 2	8,00	0,536	4.288	100,0	1,087	2,03	8.696	1,00	100,0
Preparat brut 3	8,00	0,556	4.448	100,0	0,822	1,48	6.576	1,00	100,0
Precip. 2 0-30%	1,15	0,348	400	9,3	2,03	5,83	2.334	2,87	26,8
Precip. 2 30-60%	1,05	0,698	733	17,1	0,80	1,15	840	0,57	9,7
Precip. 3 0-60%	2,55	0,611	1.558	35,0	2,02	3,31	5.151	2.24	78,3

După cum se observă, precipitarea în două etape a fost și în acest caz mai puțin avantajoasă, deoarece enzima s-a dezactivat parțial probabil datorită contactului mai îndelungat cu solventul organic, determinând scăderea activității în fracțiunea 30-60 %. Pentru celelalte fracțiuni s-a obținut o creștere a activităților specifice, iar factorul de purificare a fost cuprins între 2 și 3. Randamentul de regăsire a activității enzimice totale a fost destul de bun la fracțiunea precipitată direct cu 60 % acetonă, de aproape 80 %.

Se constată că randamentul de regăsire a activității este superior procedurii care include și cromatografia pe gel, însă factorul de purificare este de aproape 2 ori mai mic. Cu toate acestea, considerăm că metoda de purificare prin extracție la pH 8 urmată de precipitare cu acetonă până la un conținut de 60 % este cea mai avantajoasă, întrucât permite obținerea pe o cale simplă a unei enzime active, solubile în apă și purificate de resturile de țesut și alte produse contaminante prezente în preparatul brut. Trebuie precizat

că prin aceste operații nu se realizează o purificare avansată a lipazei, preparatele obținute menținându-și atât activitatea amilazică cât și pe cea proteazică, însă prezența acestor enzime nu este de natură să deranjeze din punctul de vedere al scopului urmărit.

4.3.4. Activarea lipazei pancreatice prin precipitare la pH controlat [297]

Dependența activității enzimelor de pH este binecunoscută. Această influență se datorește modificării micromediului în care se găsește enzima și se manifestă prin intervenția în balanța forțelor care stabilizează conformația enzimei, o parte a acestor forțe fiind de natură electrostatică [298]. Starea ionică a proteinei se modifică datorită schimbării valorilor pK ale catenelor laterale ce conțin grupări funcționale ionizate sau ionizabile, ca urmare a modificării echilibrelor ionice datorită variației pH-ului și are drept consecință schimbări în structura tridimensională a enzimei. Pe de altă parte, structura covalentă a enzimei nu este în general afectată, ceea ce înseamnă că procesul poate fi reversibil, adică prin revenirea la valoarea inițială a pH-ului efectul activator sau inhibitor să dispară. Din acest motiv, Klibanov [299] consideră că comportarea catalitică a enzimelor în soluții apoase trebuie să fie aceeași indiferent de influențele suferite anterior, pentru că molecula enzimei va adopta oricum conformația cea mai favorabilă din punct de vedere termodinamic în condițiile date. Această afirmație nu este în totalitate susținută de datele experimentale, pentru că se cunoaște de exemplu că multe enzime la valori de pH sub 4,0 sau peste 9,0 sunt inactivate ireversibil, ceea ce înseamnă că în realitate mecanismele acestea sunt mult mai complicate.

În ce privește activitatea enzimelor în solvenți organici, situația este diferită. Așa cum a rezultat din studiul documentar, micromediul în care se găsește enzima este format în acest caz dintr-o cantitate minimă de apă în care are loc de fapt solvatarea enzimei și din solvențul organic respectiv, care poate fi sau nu miscibil cu apa. Indiferent de mediul în care se găsește lipaza, ea poate exista în două stări conformaționale, una activă și cealaltă inactivă. Trecerea de la forma inactivă la cea activă și invers se datorește deplasării unui așa numit "capac", un mic segment elicoidal constituit din resturi de aminoacizi, care poate bloca sau nu accesul substratului la centrul activ al enzimei. Majoritatea referințelor din literatura de specialitate indică faptul că lipazele sunt mai puțin active în solvenți organici decât în apă sau în amestecuri apă-solvent organic miscibil cu apa. Această inactivare este considerată a se datora pe de o parte unor limitări difuzionale, iar pe de altă parte faptului că acel "capac" ce a fost menționat anterior se găsește în poziție "închisă" [300]. În ultima perioadă s-a demonstrat că enantioselectivitatea lipazei în solvenți organici este dependentă de modul în care a fost obținută enzima, ceea ce sugerează faptul că în medii organice este conservată conformația pe care enzima a dobândit-o anterior [301].

Ideea acestei cercetări a fost de a găsi o modalitate practică și cât mai eficientă pentru a induce o conformație activă a moleculii de lipază și de a o conserva pentru utilizarea acestei enzime ca biocatalizator în reacții de sinteză organică. Plecând de la faptul că purificarea lipazei pancreatice include o etapă de precipitare cu acetonă și de la dependența activității enzimelor de pH, s-a emis ipoteza că pH-ul soluției din care se face precipitarea cu acetonă ar putea să influențeze activitatea enzimei purificate în mediu de solvenți organici. Pe baza acestor considerente, s-a făcut precipitarea cu acetonă din soluții având pH-uri diferite în domeniul 7÷9, în care se știe că lipaza pancreatică are activitatea maximă. A fost studiată de asemenea activitatea și specificitatea de substrat a acestor preparate în reacția de hidroliză a trigliceridelor.

4.3.4.1. Dependența activității hidrolitice și a specificității de substrat de pH-ul la care are loc precipitarea

Modul de lucru: s-au cântărit 10 g enzimă brută 3 (cu caracteristici conform tabelului 4.6), care s-au suspendat în 200 ml soluție tampon, după cum urmează:

I - soluție tampon $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1 M de pH 7,0;

II - soluție tampon Tris/HCl 0,05 M de pH 8,0;

III - soluție tampon Tris/HCl 0,05 M de pH 9,0.

Fiecare soluție a conținut NaCl pentru a realiza în extract o concentrație de NaCl de 0,1 M. Reactivii utilizați au fost de proveniență comercială (Chimopar S.A.), iar soluțiile tampon au fost preparate în laborator. S-a agitat magnetic timp de 30 minute, la temperatura camerei, după care s-a filtrat prin tifon pentru îndepărtarea resturilor de țesut organic și s-a centrifugat la 4.200 rot/min timp de 20 de minute. S-a colectat supernatantul limpede și s-a precipitat cu acetonă răcită la -15°C , în picături, până la un conținut de acetonă de 60 %. S-a lăsat 15 minute pentru perfectarea precipitării, apoi s-a centrifugat timp de 10 minute la 4200 rot/min. Enzima precipitată s-a uscat la aer. S-a determinat conținutul în apă al acestor preparate prin titrare după metoda Karl-Fischer (conținutul în apă al enzimei brute a fost 5,8 %). Cantitățile obținute după precipitarea cu acetonă au fost:

- enzima precipitată la pH 7 (denumită lipază I): 5,2 g, conținut în apă 19 %
- enzima precipitată la pH 8 (denumită lipază II): 3,2 g, conținut în apă 8,1 %
- enzima precipitată la pH 9 (denumită lipază III): 3,6 g, conținut în apă 8,8 %

S-au determinat activitățile tuturor acestor preparate, în reacția de hidroliză a trigliceridelor emulsionate, în modul descris în capitolul 4.1. Pentru determinarea specificității de substrat, s-au utilizat: două trigliceride conținând resturi de acizi carboxilici cu catenă scurtă, triacetina (triacetat de glicerină, provenit de la Fluka), și tributirina (tributirat de glicerină, Merck) și una cu catenă lungă, trioleina (trioleat de glicerină, Loba Feinchemie). Aceste determinări de activitate s-au făcut la pH 8,0 în soluție tampon Tris/HCl 0,1 M. Fiecare determinare s-a repetat de trei ori, în tabelul 4.11 fiind prezentate valorile medii.

Tabelul 4.11. Activitățile preparatelor lipazice obținute prin precipitare cu acetonă la valori controlate de pH

Preparat	Substrat	Conținut în proteină mg/mg	Activitate		
			U/mg	U/mg proteină	Relativă
Preparat brut 3	Triacetină	0.556	1.21	2.18	1.00
	Tributirină		2.92	5.25	
	Trioleină		0.96	1.73	
Lipază I (pH 7,0)	Triacetină	0.649	1.06	1.63	0.73
	Tributirină		2.35	3.62	
	Trioleină		0.83	1.28	
Lipază II (pH 8,0)	Triacetină	0.611	1.92	3.14	1.29
	Tributirină		3.31	5.42	
	Trioleină		1.48	2.42	
Lipază III (pH 9,0)	Triacetină	0.583	1.99	3.41	1.48
	Tributirină		3.64	6.24	
	Trioleina		1.72	2.95	

Activitățile relative s-au calculat prin raportarea valorilor medii ale activităților specifice pentru cele trei substraturi la valoarea medie a activității specifice a preparatului brut. Se poate observa că activitatea catalitică a lipazei depinde și în mediu apos de modul în care a fost obținută enzima, fapt reflectat de valorile diferite ale activității obținute pentru cele trei preparate. Activitatea maximă s-a înregistrat pentru enzima precipitată după dizolvare la pH 9, corespunzătoare unei creșteri a activității medii relative de aproape 50 % față de enzima brută, în timp ce lipaza precipitată la pH 7 s-a dezactivat față de enzima brută.

Faptul că este vorba despre o anumită conformație specifică fiecărui preparat care depinde de pH-ul soluției din care s-a făcut precipitarea este confirmat de specificitatea de substrat a preparatelor obținute, așa cum rezultă din figura 4.3, construită cu datele din tabelul 4.11.

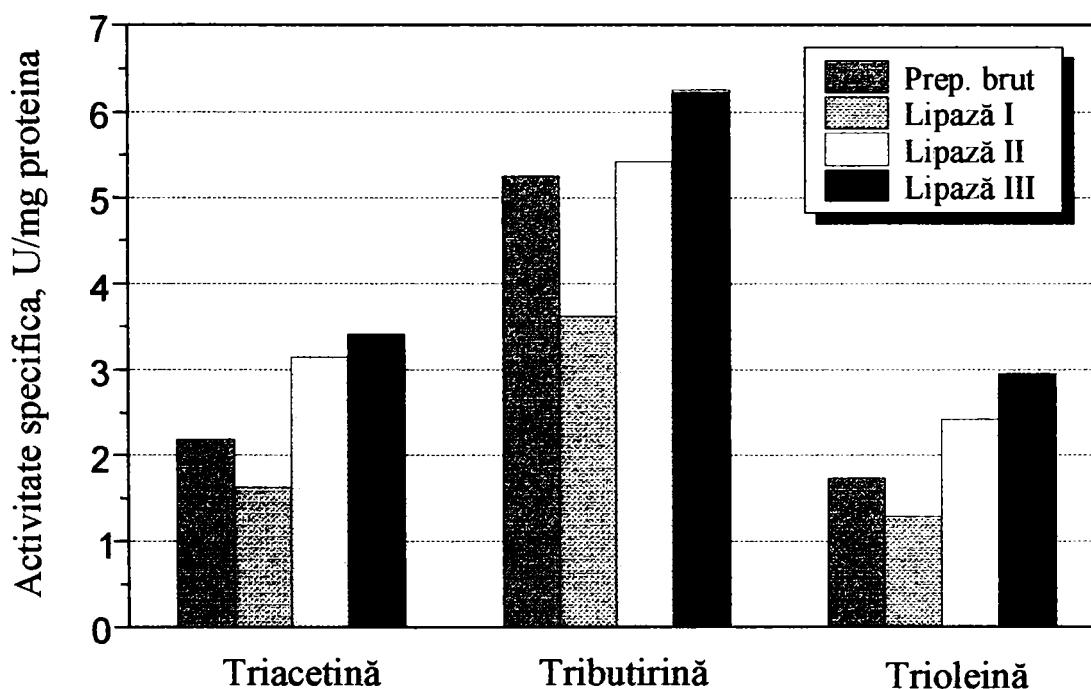


Figura 4.3. Specificitățile de substrat ale preparatelor lipazice purificate prin precipitare cu acetonă

Se poate deci remarca faptul că într-adevăr pH-ul soluției din care se face precipitarea influențează în bună măsură comportamentul ulterior al enzimei. Relația dintre pH și activitate pentru orice enzimă depinde de comportarea acido-bazică a enzimei și a substratului, natura solventului, ca și de mulți alți factori a căror cuantificare este dificilă. În principiu însă, se poate afirma că, datorită naturii proteice, enzimele au comportare de amfoliți, putând disocia la nivelul grupărilor $-COOH$ și $-NH_2$ (sau a altor grupări ionizabile), în funcție de valoarea pH-ului. În consecință, la orice valoare a pH-ului lipaza poate conține grupări încărcate pozitiv sau negativ, inclusiv la aminoacizii care fac parte din centrul activ sau contribuie la adoptarea conformației celei mai favorabile pentru desfășurarea actului catalitic. Din cauza interacțiunilor de natură electrostatică, determinate de sarcinile electrice existente la nivelul moleculei de enzimă, se vor produce anumite modificări conformaționale, care vor fi influențate de valoarea pH-ului. Prin precipitarea

enzimei la temperatură scăzută, are loc probabil o "înghețare" parțială a acestei conformații, care după aceea nu mai revine la forma inițială nici la redizolvarea enzimei, deoarece reșezarea din punct de vedere conformațional a unei întregi zone foarte delicate, cum este centrul catalitic al enzimei, nu este totuși un lucru simplu. Acest raționament ar putea deci explica satisfăcător dependența activității ulterioare a enzimei de pH-ul la care are loc precipitarea, cât și de ce acest pH optim de precipitare (9,0 în cazul nostru) este puțin diferit de pH-ul la care activitatea extractului apos inițial de lipază a fost maximă (8,0 conform datelor tabelului 4.7). Un răspuns mai exact la aceste întrebări va putea fi dat, evident, prin utilizarea unor tehnici spectroscopice moderne, ce permit elucidarea caracteristicilor structurale ale proteinelor amorfe, cum ar fi spectrometria RMN cu schimb de izotopi de hidrogen [291, 292] sau spectrometria RMN de ^{13}C în stare solidă [293]. Aceste metode vor permite determinarea exactă a structurilor preparatelor enzimatiche purificate, comparativ cu enzima inițială.

În ce privește specificitatea de substrat a lipazelor purificate, se observă că aceasta se manifestă față de triglicerida având în moleculă resturi acil cu lungime medie (C_4) a catenei hidrocarbonate. Această specificitate este cunoscută din literatură și trebuie remarcat doar că ea nu se modifică în urma operațiilor la care a fost supusă enzima și nu depinde în esență de pH-ul la care se face precipitarea cu acetonă. Specificitatea de substrat în cazul unor substraturi asemănătoare structural, cum ar fi trigliceridele, este determinată de afinitatea acelei părți din moleculă care nu este modificată prin actul catalitic (în cazul nostru catena hidrocarbonată din restul acil) față de un centru de legare, care reprezintă o zonă distinctă față de centrul activ. Faptul că această specificitate nu se schimbă reprezintă o confirmare a faptului că modificările ce au loc afectează numai zona centrului activ al enzimei.

Concluzia care se poate trage din aceste determinări este că metoda purificării prin precipitare cu acetonă din soluție apoasă dă cele mai bune rezultate la valoarea pH-ului soluției inițiale de 9,0. În ciuda dezactivării unei părți din enzimă în cursul operațiilor de purificare, considerăm această metodă utilă, întrucât se obține un preparat omogen, solubil în apă și care este lipsit de resturi de țesut organic.

În esență, se poate afirma că obținerea lipazei din pancreas este o metodă mai simplă decât cultivarea unor microorganisme, care pornește de la o materie primă ieftină și permite obținerea de preparate purificate în condiții reproductibile și în cantități suficiente de mari chiar în condiții de laborator. În plus, lipaza pancreatică s-a dovedit a fi mult mai puțin sensibilă la depozitare decât cea de origine microbială. Din acest motiv numai aceste preparate au fost testate în continuare drept catalizatori în reacții de esterificare și transesterificare.

4.3.4.2. Studiul activității de esterificare și transesterificare a preparatelor lipazice obținute prin precipitare la pH controlat [294, 295]

Așa cum a rezultat din studiul documentar, lipazele pot fi catalizatori eficienți într-o serie de reacții de esterificare și transesterificare. Desfășurarea acestor reacții este recomandată a se face în microemulsii sau în solvenți organici cu un conținut cât mai mic de apă pentru a nu favoriza reacțiile de hidroliză, dar în același timp suficient pentru a menține conformația catalitică activă a enzimei.

A fost studiată activitatea preparatelor enzimatiche purificate obținute prin precipitare cu acetonă la diferite valori de pH (și denumite lipază I, II, respectiv III) în reacții de esterificare și transesterificare ale 1-pentanolului. Drept mediu de reacție organic

s-a ales n-hexanul, un solvent nemiscibil cu apa, care conform datelor din literatura de specialitate dă rezultate bune în reacții catalizate de lipaze în medii neapoase.

Activitatea de esterificare, respectiv transesterificare a fost exprimată cantitativ prin conversia 1-pentanolului după 1, respectiv 3 ore de reacție la 37°C. Determinarea conversiei s-a făcut prin analiză cromatografică gaz-lichid.

S-au utilizat reactivi de puritate analitică: 1-pentanol (Fluka), acid n-hexanoic (caproic, Loba Chemie), n-hexan (Merck) și tributirat de glicerină (Merck). Hexanul a fost menținut pe site moleculare și a avut un conținut de apă de 0,05 %, determinat prin metoda Karl Fischer.

Modul de lucru. Într-un reactor de sticlă cu capacitatea de 50 cm³ prevăzut cu manta termostatabilă și posibilitate de agitare magnetică s-au introdus 20 ml solvent organic (n-hexan) și cantitățile stabilite de acid (sau ester) și 1-pentanol. Rapoartele molar alcool/acid, respectiv alcool/ester au fost cele stoechiometrice, 1/1 în cazul esterificării și respectiv 3/1 în cazul reacției de transesterificare cu tributiratul de glicerină. S-a pornit agitarea și s-a termostatat la temperatura de reacție de 37°C. S-a luat o probă de 1 ml pentru determinarea concentrației inițiale a 1-pentanolului, peste care s-au adăugat 1 ml soluție de n-decan în n-hexan pentru analiza cantitativă cromatografică.

S-au cântărit aproximativ 0,2 g preparat enzimatic și s-au introdus în amestecul de reacție, considerându-se acesta ca momentul inițial al reacției. S-a lăsat să reacționeze timp de 3 ore, după care reacția a fost stopată prin filtrarea enzimei (insolubilă în mediul de reacție). Din amestecul de reacție s-au luat probe de 1 ml după o oră de reacție și la terminarea ei. Aceste probe s-au analizat în același mod ca și proba inițială. S-au calculat concentrațiile de 1-pentanol și conversia pentanolului. Activitățile de esterificare și transesterificare au fost exprimate în unități enzimatiche, o unitate fiind definită drept cantitatea de enzimă ce catalizează conversia unui μmol de substrat (1-pentanol), într-un minut, în condițiile date.

4.3.4.2.1. Analiza 1-pentanolului prin cromatografie gaz-lichid

Se va descrie în mod puțin mai detaliat această analiză, deoarece atât condițiile aparative cât și modalitatea de analiză cantitativă care au fost stabilite cu acest prilej vor fi utilizate, cu mici modificări, pentru celelalte studii. Condițiile de analiză cromatografică au fost stabilite după o serie de încercări pe coloane cu polarități și concentrații ale fazei staționare diferite, astfel:

- cromatograf tip Chromatrom GCHF 18.3 echipat cu detectoare de ionizare în flacără în sistem dual;
- gaz purtător: azot, cu debitul de 40 ml/min;
- coloană din oțel inoxidabil cu dimensiunile de 2 m x 4 mm, umplută cu fază staționară de tip FFAP (polară) cu concentrația 10 %, depusă pe Chromosorb W-AW-DMCS (spălat acid și silanizat) de granulație 80-100 mesh;
- temperatura coloanei liniar crescătoare între 70-210°C, cu viteza de încălzire de 16°C/min și cu menținerea la temperatura finală timp de 5 minute
- temperatura în injector: 220°C
- temperatura în detector: 250°C
- amplificare electronică: 3×10^8
- viteza de înregistrare: 30 cm/oră

Un exemplu de cromatogramă, obținută în condițiile menționate, pentru esterificarea acidului n-hexanoic cu 1-pentanolul este dat în figura 4.4.

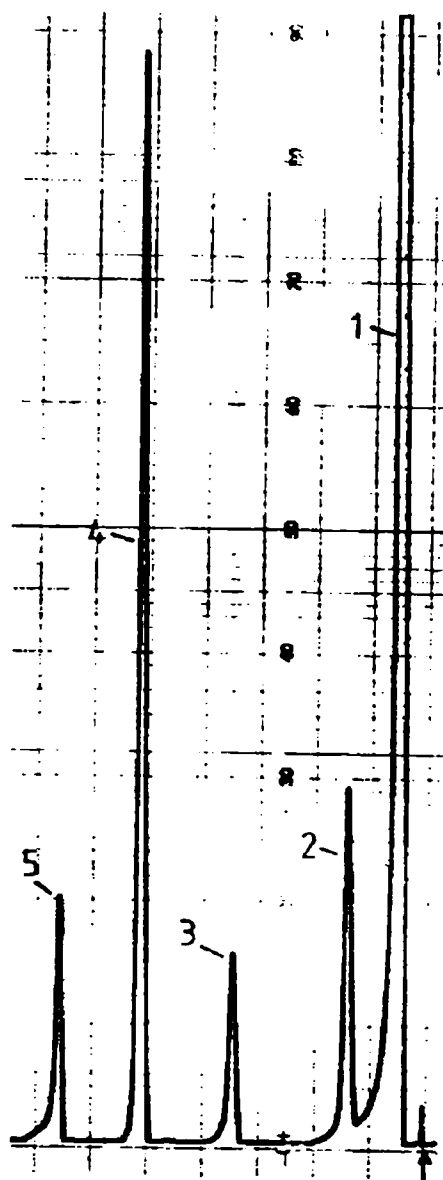


Figura 4.4. Cromatograma gaz-lichid a amestecului de reacție de la esterificarea acidului n-hexanoic cu 1-pentanolul, la 37°C, după o oră, în prezența lipazei II (1- n-hexan; 2- n-decan; 3- 1-pentanol; 4-hexanoat de 1-pentil; 5- acid hexanoic)

Identificarea picurilor cromatografice din această figură s-a făcut prin compararea timpilor de retenție cu cei ai unor standarde autentice, care au fost chiar pentanolul și acidul hexanoic utilizate drept materii prime, respectiv hexanoatul de 1-pentil sintetizat în laborator pe cale chimică obișnuită.

Valorile principalilor parametri cromatografici calculați pe baza cromatogramei sunt prezentate în tabelul 4.12.

Tabelul 4.12. Valorile principalilor parametri cromatografici pentru componentele amestecului de reacție de la esterificarea acidului hexanoic cu n-pentanol

Nr. picului (fig. 2.1.4)	Atribuire	Timp de retenție t_R (min)	Timp de retenție ajustat ^a t_R' (min)	Factor de capacitate ^b k'	Coef. de separare ^c α
1.	n-hexan (solv.)	1,0	0,47	0,88	-
2.	n-decan (standard)	2,2	1,67	3,13	3,55
3.	1-pentanol	6,4	5,87	11,01	3,52
4.	hexanoat de 1-pentil	10,0	9,47	17,76	1,61
5.	acid hexanoic	12,8	12,27	23,02	1,30

^a reprezintă diferența dintre timpul de retenție măsurat al componentei și timpul de retenție al unei componente nereținute pe coloană t_M . Valoarea t_M se determină prin calcul, în funcție debitul fazei mobile F și dimensiunile L și d_c ale coloanei, cu ajutorul relației aproximative [296]:

$$t_M \cong \frac{L \cdot d_c^2}{1,5 \cdot F} \quad \text{În cazul nostru } t_M = 0,533 \text{ min}$$

^b reprezintă unul din principalii parametri cromatografici care caracterizează retenția componentelor și se calculează cu relația [296]:

$$k' = \frac{t_R'}{t_M}$$

^c reprezintă unul din principalii parametri cromatografici care caracterizează separarea componentelor și se calculează pentru perechile de componente care eluează succesiv, cu relația [296]:

$$\alpha = \frac{k'_i}{k'_{(i-1)}}$$

Din datele tabelului 4.12 se poate remarca faptul că s-a realizat o separare foarte bună a tuturor componentelor, fapt relevat de valorile supraunitare ale tuturor coeficienților de separare. Valorile mari ale factorului de capacitate pentru unele componente sunt inevitabile când sistemul conține componente cu polarități și volatilități foarte diferite, cum este în cazul nostru.

Pentru analiza cantitativă a 1-pentanolului din amestecul de reacție prin cromatografie de gaz-lichid s-a ales metoda standardizării interne, iar ca substanță standard s-a folosit, așa cum s-a văzut, n-decanul.

S-au cântărit diferite cantități de 1-pentanol și s-au dizolvat în 1 ml n-hexan, după care s-au adăugat aproximativ 6 μ l n-decan, cântărindu-se exact cantitatea adăugată. Cantitățile de alcool și standard au fost alese astfel încât concentrațiile și raportul acestora să se înscrie în domeniul reacției urmărite. Probele au fost cromatografiate în condițiile menționate anterior. Pentru a elimina erorile de măsură, fiecare probă a fost injectată de 4-5 ori, luându-se în calcul media determinărilor ariilor respective, care sunt prezentate în tabelul 4.13.

Tabelul 4.13. Standardizarea gaz-cromatografică a 1-pentanolului cu n-decan

Nr. probă	Cantități		Raport arii A_{alc}/A_{st}	Raport cantitativ m_{alc}/m_{st}
	1-pentanol (g)	n-decan (g)		
1.	0,0035	0,0048	0,479	0,729
2.	0,0084	0,0040	1,096	2,100
3.	0,0121	0,0042	1,564	2,881
4.	0,0158	0,0050	2,061	3,160
5.	0,0198	0,0042	2,629	4,714

Reprezentarea grafică a raportului ariilor în funcție de raportul cantitativ al componentelor (pentanol/decan) este dată în figura 4.5.

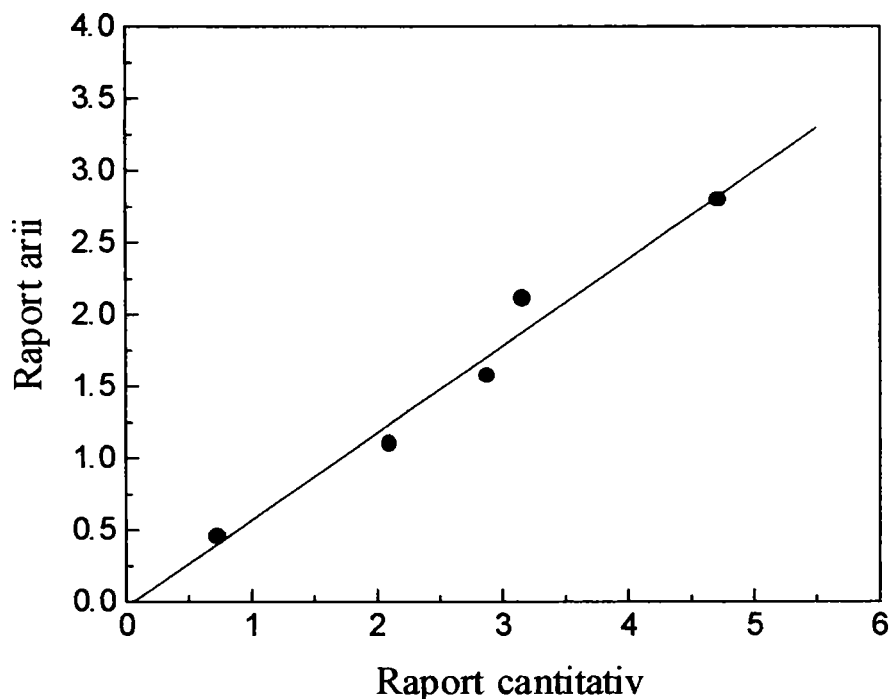


Figura 4.5. Dreapta de standardizare a 1-pentanolului cu n-decan

Se observă că această dependență este liniară, iar din ecuația dreptei corespunzătoare se va putea calcula cantitatea de alcool care se găsește la un moment dat în proba luată din amestecul de reacție:

$$m_{alc} = \left(\frac{A_{alc}}{A_{st}} + 0,0252 \right) \cdot \frac{m_{st}}{0,5756}$$

unde m_{st} este cantitatea de standard introdusă în sistemul de reacție.

4.3.4.2.2. Testarea preparatelor lipazice în reacția de esterificare

Pentru această reacție s-au folosit concentrații inițiale echimolare de reactanți, 1-pentanol și acid hexanoic, de 0,3 moli/l.

Concentrația soluției de n-decan în proba supusă analizei cromatografice (constituită din 1 ml amestec de reacție și 1 ml soluție de standard) a fost 0,0388 moli/l. Nu s-a introdus apă în sistemul inițial de reacție, conținutul de apă al acestuia fiind deci determinat doar de apa din materiile prime și din solventul utilizat, ceea ce înseamnă un conținut mai mic de 0,1%.

Rezultatele determinărilor sunt prezentate în tabelul 4.14 și figura 4.6.

Tabelul 4.14. Activitatea preparatelor lipazice în reacția de esterificare a acidului hexanoic (0,3 M) cu 1-pentanol (0,3 M) în n-hexan, la 37°C

Tipul preparatului	Conversia 1-pentanolului după 1 h de reacție	Activitatea de esterificare	
		U/mg preparat	Relativă
Preparat brut 3	65.7	0.164	1.00
Lipază I (pH 7,0)	8.7	0.020	0.12
Lipază II (pH 8,0)	92.0	0.230	1.40
Lipază III (pH 9,0)	81.9	0.205	1.25

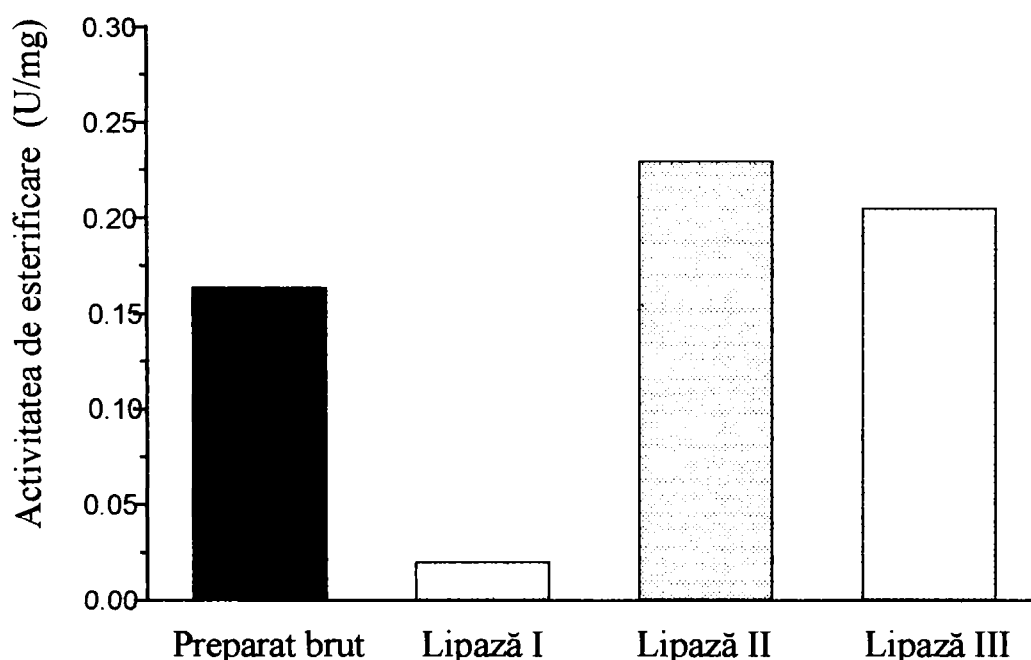


Figura 4.6. Activitatea de esterificare a preparatelor lipazice purificate prin precipitare cu acetonă la valori controlate de pH

Se observă că atât preparatul brut cât și cele purificate manifestă activitate catalitică în reacția de esterificare dintre acizi monocarboxilici și alcooli monohidroxicili. Această

activitate scade la preparatul obținut prin precipitare la pH 7 comparativ cu cel brut, însă crește la celelalte două preparate, tendință identică cu cea care a fost observată la reacția de hidroliză a trigliceridelor. Însă în timp ce scăderea de activitate menționată este în concordanță cu cea de la hidroliza trigliceridelor, se observă că la esterificare cea mai bună activitate a fost înregistrată la lipaza II, purificată prin precipitare la pH 8. Acest preparat a avut o activitate catalitică relativă de esterificare mai mare cu 40 % decât preparatul brut, ceea ce la prima vedere nu pare o creștere foarte spectaculoasă, însă semnifică o mărire a conversiei de la 66 % la peste 90 % după numai o oră de reacție, un aspect foarte important din punct de vedere preparativ.

Exprimând activitatea în unități/mg (ca și în cazul hidrolizei) se obține pentru activitatea de esterificare a preparatului obținut prin precipitare la pH 8,0 o valoare a activității de 0,23 unități/mg, mai mică de aproximativ 8 ori decât cea înregistrată în cazul hidrolizei, dar de același ordin de mărime, ceea ce justifică afirmația că lipazele pancreatice exercită o activitate catalitică în reacții de esterificare comparabilă cu principala lor activitate, cea hidrolitică. Acest fapt face posibilă utilizarea preparatelor purificate prin precipitare cu acetonă pentru obținerea de esteri ai acizilor monocarboxilici cu alcooli monohidroxilici.

4.3.4.2.3. Testarea preparatelor lipazice în reacția de transesterificare

Această testare s-a făcut prin reacția de transesterificare (alcoholiză) dintre tributirat de glicerină (tributirină) și 1-pentanol.

Condițiile de reacție au fost asemănătoare cu cele de la esterificare, cu excepția faptului că s-a folosit un raport molar inițial alcool/ester de 3:1, ținând cont de faptul că tributirina are teoretic 3 grupări esterice reactive și fără a lua în considerare faptul că lipaza pancreatică este o enzimă 1,3-selectivă în reacțiile trigliceridelor.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 4.15 și figura 4.7.

Tabelul 4.15. Activitatea preparatelor lipazice în reacția de transesterificare a tributiratului de glicerină (0,1 M) cu 1-pentanol (0,3 M) în n-hexan, la 37°C

Tipul preparatului	Conversia 1-pentanolului după 3 h de reacție %	Activitatea de transesterificare	
		U/mg preparat	Relativă
Preparat brut 3	23.5	0.027	1.00
Lipază I (pH 7,0)	4.9	0.004	0.15
Lipază II (pH 8,0)	34.2	0.029	1.07
Lipază III (pH 9,0)	35.5	0.030	1.11

Și în acest caz se poate constata că toate preparatele lipazice au manifestat activitate catalitică, dar semnificativ mai mică decât la esterificare și foarte mică în cazul lipazei I. Creșterea activității la celelalte preparate comparativ cu enzima brută este considerabil mai mică decât în cazul esterificării. Acest lucru se datorește însă probabil faptului că conversia de aproximativ 35 % înregistrată după 3 ore de reacție este apropiată de valoarea conversiei de echilibru. Dacă ținem cont de faptul că în acest caz sunt posibile de fapt trei reacții consecutive, această valoare ar corespunde unei conversii complete a substratului limitativ în dibutirat de glicerină și s-ar putea ca reactivitatea acestuia în condițiile date să fie mai scăzută. De asemenea, trebuie menționat că a fost efectuată o singură încercare și nu s-a făcut optimizarea condițiilor de reacție, de exemplu a conținutului de apă, care ar putea

influența valoarea conversiei. În acest caz exprimarea activității doar prin valoarea conversiei după un anumit timp nu este suficient de relevantă, fiind necesară o metodă de urmărire cinetică a activității catalitice a enzimei. O asemenea metodă este utilă și pentru investigarea reacțiilor de hidroliză și esterificare catalizate de lipaze, permițând o cunoaștere mai amănunțită a actului catalitic și a parametrilor care pot influența reacția.

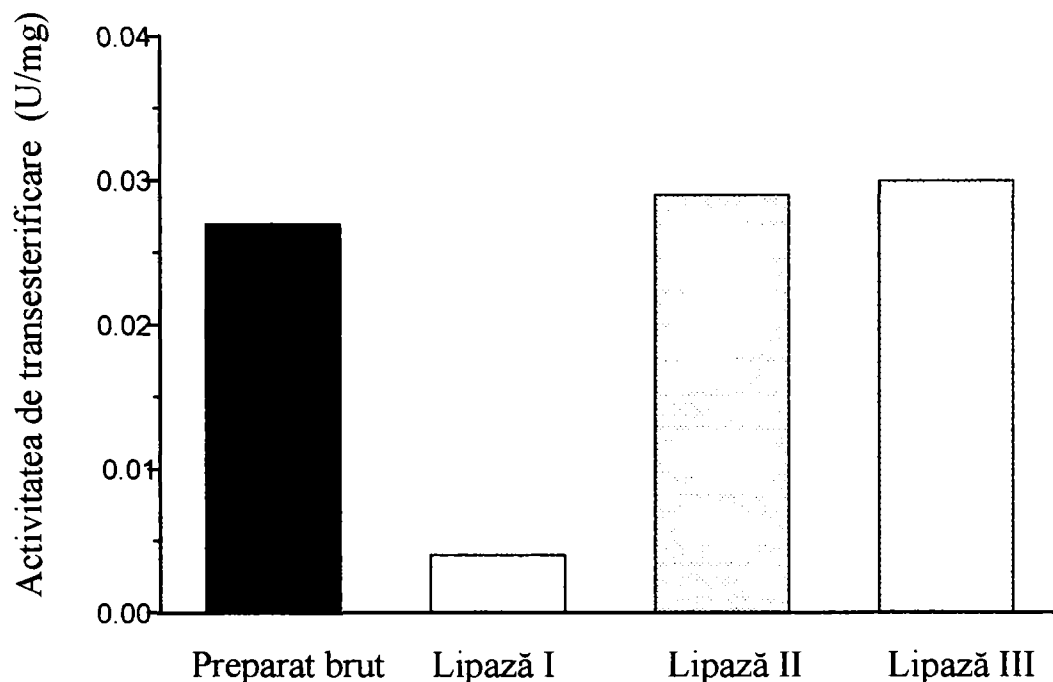


Figura 4.7. Activitatea de transesterificare a preparatelor lipazice purificate prin precipitare cu acetonă la valori controlate de pH

4.3.5. Concluzii

Ținând cont de multiplele probleme pe care le ridică obținerea enzimelor din culturi de microorganisme s-a încercat obținerea unor preparate active de lipază prin extracție din pancreas de porc, un subprodus ieftin și ușor accesibil în cantități mari. Preparatul brut s-a obținut prin deshidratarea și delipidizarea pancreasului proaspăt cu acetonă și eter etilic, după o rețetă proprie, cu un randament cuprins între 7-10 % față de pancreas..

Activitățile specifice s-au situat între 1,1-2,0 unități/mg proteină, depinzând atât de materia primă cât și de perioada și condițiile de stocare ale acestora până la prelucrare, fiind comparabile și chiar mai mari decât ale unor enzimele comerciale oferite de firme cu renume.

Purificarea preparatului brut s-a efectuat prin cromatografie de exclusiune sterică preparativă și precipitare cu solvenți organici, fără a se urmări o purificare avansată ci doar obținerea pe o cale cât mai simplă a unui preparat activ, având stabilitate operațională și la depozitare bune.

Extracția enzimei din preparatul brut se realizează cel mai bine în soluție apoasă tamponată la pH 8 cu soluție tampon Tris/HCl și la o tărie ionică de 0,1 M NaCl. Ioni de sodiu au și efect activator asupra lipazei pancreatice.

La purificarea prin cromatografie pe gel urmată de precipitare cu acetonă până la un conținut de acetonă de 60 % s-au obținut randamente de regăsire ale activităților lipazice cuprinse între 30-60 %, într-o cantitate de proteină care reprezenta aproximativ 7-10 % din cea inițială și un factor de purificare față de produsul solid brut de 4,5. Pentru simplificarea procedurii, s-a recurs direct la precipitarea cu acetonă a extractelor apoase. S-a obținut un factor de purificare mai mic, cuprins între 2 și 3, însă randamentul de regăsire a activității enzimice totale a fost mai mare, de aproape 80 %, datorită faptului că s-a obținut o cantitate considerabil mai mare de preparat purificat (aproximativ 30 % față de preparatul brut), comparativ cu procedeul care include și cromatografia pe gel. În aceste condiții s-a ajuns la concluzia că varianta de precipitare directă a extractelor cu 60 % acetonă este mai avantajoasă, ducând la un preparat solid suficient de activ, solubil în apă și stabil.

Studiul mai detaliat al influenței pH-ului soluției de extracție din care se face precipitarea cu acetonă a arătat că activitatea preparatelor purificate solide este mai mare în cazul în care acest pH are valoarea 9, deși diferența de activitate față de preparatul obținut la pH 8 nu este mare. Această aparentă anomalie se explică prin faptul că conformația enzimei suferă mici modificări și în momentul precipitării cu solvenți organici și toate aceste modificări conformaționale nu sunt total reversibile la redizolvarea enzimei. Influența pH-ului soluției la care se face extracția enzimei este foarte însemnată, ceea ce se reflectă prin inactivarea însemnată a preparatului obținut la pH 7. În același timp, specificitatea de substrat a lipazei în reacția de hidroliză a trigliceridelor nu a depins de pH-ul soluției din care a avut loc precipitarea cu acetonă. Această specificitate s-a manifestat față de triglicerida având o lungime redusă (C_3) a lanțului hidrocarbonat legat de restul acil.

Preparatele purificate prin extracție la pH controlat urmată de precipitare cu acetonă au manifestat activitate catalitică și în reacții de esterificare și transesterificare în solvenți organici. Reacțiile model alese au fost esterificarea 1-pentanolului cu acid hexanoic, respectiv transesterificarea tributirului de glicerină cu 1-pentanol, în mediu de n-hexan. Activitatea de esterificare cea mai mare s-a înregistrat în cazul preparatului obținut prin precipitare la pH 8 și acest preparat a permis obținerea unei conversii de peste 90 % după o oră de reacție. Chiar dacă activitatea în mediu organic este mai mică decât cea în mediu apos, se poate afirma că prin metoda elaborată s-a reușit conservarea în mare parte a conformației catalitice active a lipazei.

5. Modelul cinetic al reacțiilor de esterificare și transesterificare catalizate de lipază

Așa cum se poate observa din studiul documentar, cinetica reacțiilor catalizate de lipaze este extrem de complicată, datorită faptului că aceste reacții au loc de multe ori la interfața a două faze nemiscibile și pot fi supuse unor limitări difuzionale sau de altă natură. Din acest motiv există zeci de modele cinetice bazate pe diverse ipoteze care încearcă să simplifice fenomenele care loc în timpul acestor procese. Aceste modele diferă foarte mult una de alta și în general fiecare dintre ele se referă doar la un sistem particular de reacție, neputând avea valabilitate mai generală.

Studiul activității catalitice a enzimelor se poate face numai indirect, prin urmărirea efectelor acestei activități asupra unui substrat dat. Exprimarea cantitativă a activității se face prin numărul de moli de substrat transformați de enzimă într-un anumit interval de timp, ceea ce înseamnă dimensiuni de viteză de reacție. Rezultă așadar că urmărirea cinetică a reacțiilor catalizate reprezintă cea mai bună metodă de investigare a activității și eficienței catalitice a enzimelor. Din acest punct de vedere, realizarea unei modelări cinetice a procesului prezintă două avantaje:

- un model bun permite prevederea evoluției reacției în anumite condiții date;
- pe baza modelului se pot calcula anumiți parametri cinetici care să aibă semnificație fizică pentru sistemul de reacție dat.

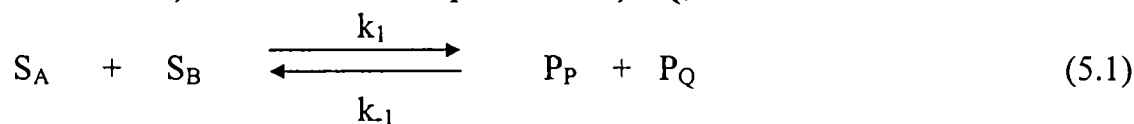
Trebuie precizat și faptul că investigarea cinetică a reacțiilor catalizate de enzime se bazează de foarte multe ori pe determinarea vitezelor inițiale, care reprezintă un parametru cantitativ foarte util pentru aprecierea eficienței catalitice a enzimelor. S-a arătat că evoluția în timp a reacțiilor catalizate de enzime este de cele mai multe ori de forma unei curbe de saturație. Acest lucru este valabil și la reacțiile catalizate de lipaze care sunt reacții de echilibru și unde se înregistrează o însemnată scădere a vitezei de reacție pe măsura apropierii de conversia de echilibru. Determinarea experimentală cu precizie suficientă a vitezei inițiale pentru asemenea procese nu este foarte ușoară. În aceste condiții este de dorit ca modelul cinetic să ofere și o posibilitate de calcul mai exact a acestor viteze inițiale.

5.1. Expresia matematică a modelului cinetic [302]

S-a încercat așadar elaborarea unui model cinetic cât mai simplu și mai universal pentru reacțiile catalizate de lipaze. S-a arătat că aceste reacții pot fi extrem de diverse și se pot desfășura atât în medii apoase cât și apos-organice sau organice. În esență însă, toate aceste procese pot fi considerate reacții reversibile de ordinul II și modelul ales trebuie să pornească de la relațiile cinetice caracteristice acestui tip de reacții.

Drept referință s-a luat modelul care a fost elaborat de Kosugi și Suzuki pentru reacțiile de hidroliză a trigliceridelor [97] și care a fost după aceea îmbunătățit de Han și Rhee [100] pentru reacțiile de hidroliză în care nu se mai lucrează cu exces mare de apă. Ideea a fost de a extinde un asemenea model și pentru reacțiile de esterificare și transesterificare care au loc în solvenți organici, obținând așadar unul cu valabilitate generală pentru toate reacțiile de echilibru catalizate de lipaze.

În reacțiile reversibile de ordinul II din doi reactanți S_A și S_B (A fiind considerat reactantul limitativ) se formează două produse P_P și P_Q , conform schemei:



Expresia vitezei de reacție pentru acest tip de reacții se poate scrie:

$$-\frac{dA}{dt} = k_1 \cdot A \cdot B - k_{-1} \cdot P \cdot Q \quad (5.2)$$

unde A și B sunt concentrațiile celor doi reactanți la timpul t, P și Q concentrațiile produșilor la timpul t, iar k_1 și k_{-1} sunt constantele de viteză pentru reacția directă, respectiv reacția inversă.

Considerând că în momentul inițial al reacției avem concentrațiile A_0 și B_0 ale reactanților, concentrațiile produșilor în orice moment al reacției vor fi:

$$P = Q = A_0 - A = B_0 - B \quad (5.3)$$

Întrucât expresia cinetică (5.2) ce descrie variația concentrației reactantului A în timp are forma unei curbe descrescătoare, este mult mai avantajos să se exprime această concentrație sub formă de conversie fracțională:

$$X = \frac{A_0 - A}{A_0} \quad (5.4)$$

obținându-se astfel în funcție de timp o curbă de saturație obișnuită, care exprimă și în realitate evoluția reacției enzimatică, așa cum s-a arătat.

Un avantaj suplimentar al acestui procedeu care nu introduce erori suplimentare (valoarea lui A_0 fiind cunoscută cu suficientă precizie) este că în toate cazurile valorile de pe axa Y vor fi cuprinse între 0 și 1.

Din relația (5.4) rezultă:

$$A = A_0 - X \cdot A_0 \quad \text{și în mod similar:}$$

$$B = B_0 - X \cdot A_0$$

Înlocuind aceste valori în ecuația (5.2) vom putea scrie expresia vitezei de reacție pe baza conversiei fracționale în timp a reactantului A:

$$-\frac{dA}{dt} = k_1 \cdot A \cdot B - k_{-1} (A_0 - A)^2 \quad (5.5)$$

$$\frac{dX}{dt} = \left[k_1 (1 - X) \cdot A_0 (B_0 - X A_0) - k_{-1} X^2 A_0^2 \right] \cdot \frac{1}{A_0}$$

$$\frac{dX}{dt} = k_1 (1 - X)(B_0 - X A_0) - k_{-1} \cdot X^2 \cdot A_0 \quad (5.6)$$

La atingerea echilibrului vom avea condiția:

$$\frac{dX}{dt} = 0$$

iar conversia va fi egală cu cea de echilibru:

$$X = X_e, \text{ așadar:}$$

$$0 = k_1(1 - X_e)(B_0 - X_e A_0) - k_{-1} \cdot A_0 \cdot X_e^2 \quad (5.7)$$

Relația (5.7) se poate împărți cu k_{-1} , rezultând valoarea constantei de echilibru a reacției:

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{A_0 \cdot X_e^2}{(1 - X_e)(B_0 - X_e \cdot A_0)} \quad (5.8)$$

Valoarea constantei de viteză k_{-1} rezultată din ecuația (5.8) se înlocuiește în ecuația diferențială (5.6):

$$k_{-1} = \frac{k_1(1 - X_e)(B_0 - X_e A_0)}{A_0 \cdot X_e^2} \quad (5.9)$$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{k_1}{X_e^2} \left[(1 - X)(B_0 - X A_0) X_e^2 - (1 - X_e)(B_0 - X_e A_0) X^2 \right]$$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{k_1}{X_e^2} \left[(X_e A_0 + X_e B_0 - B_0) X^2 - X_e^2 (A_0 + B_0) X + X_e^2 B_0 \right] \quad (5.10)$$

Prin integrarea ecuației (5.10) se obține :

$$\frac{X_e}{X_e(A_0 + B_0) - 2B_0} \cdot \ln \frac{X_e - X}{X_e + \left[1 - \left(1 + \frac{A_0}{B_0} \right) X_e \right] X} = k_1 \cdot t \quad (5.11)$$

Relația (5.11) se poate aduce la o formă de tip $X = f(t)$, în care parametrii ce trebuie determinați sunt X_e și k_1 :

$$\ln \frac{X_e - X}{X_e + \left[1 - \left(1 + \frac{A_0}{B_0} \right) X_e \right] X} = \left(A_0 + B_0 - \frac{2B_0}{X_e} \right) \cdot k_1 \cdot t \quad (5.12)$$

Dacă notăm pentru simplificare:

$$\beta = 1 + \frac{A_0}{B_0} \quad \text{și} \quad \varepsilon = \left(A_0 + B_0 - \frac{2B_0}{X_e} \right) k_1$$

vom avea:

$$\frac{X_e - X}{X_e + (1 - \beta X_e)X} = e^{\varepsilon t} \quad (5.13)$$

respectiv:

$$X_e - X = X_e \cdot e^{\varepsilon t} + X \cdot e^{\varepsilon t} - \beta \cdot X_e \cdot X \cdot e^{\varepsilon t}$$

$$X = \frac{X_e (1 - e^{\varepsilon t})}{e^{\varepsilon t} (1 - \beta X_e) + 1} \quad (5.14)$$

Ecuția (5.14) permite calculul curbei cinetice pe baza datelor experimentale. Este o ecuație parametrică ce nu poate fi rezolvată decât prin optimizare. Aceasta înseamnă că în urma calculului de optimizare rezultă valorile ε (adică ale constantei de viteză k_1) și X_e pentru care curba $X = f(t)$ dată de ecuația (5.14) se corelează cel mai bine cu datele experimentale. Datorită însă faptului că ea conține un termen exponențial repetat, există riscul apariției unor instabilități în timpul calculului de optimizare. De aceea s-a recurs la o altă variantă de simplificare, ce a fost utilizată și de Kosugi și Suzuki, considerând timpul t_m în care conversia ajunge la jumătate din valoarea de echilibru, adică:

$$t = t_m \quad \text{pentru} \quad X = X_e / 2 ;$$

Înlocuind în ecuația (5.12) rezultă:

$$\frac{X_e \cdot \ln \left[3 - \left(1 + \frac{A_0}{B_0} \right) X_e \right]}{2B_0 - X_e (A_0 + B_0)} = k_1 \cdot t_m \quad (5.15)$$

Din această relație se poate calcula constanta de viteză k_1 , dacă se cunosc valorile parametrilor X_e și t_m , cât și concentrațiile inițiale ale reactanților.

Împărțind relația (5.11) la (5.15) rezultă:

$$\frac{t}{t_m} = \frac{\ln \frac{X_e - X}{X_e + \left[1 - \left(1 + \frac{A_0}{B_0} \right) X_e \right] X_e}}{\ln \frac{1}{3 - \left(1 + \frac{A_0}{B_0} \right) X_e}} \quad (5.16)$$

Exprimând și de această dată pe $X = f(t)$, vom avea:

$$X = \frac{X_e \cdot \left(1 - \left[3 - \left(1 + \frac{A_0}{B_0} \right) X_e \right]^{-\frac{t}{t_m}} \right)}{1 + \left[1 - \left(1 + \frac{A_0}{B_0} \right) X_e \right] \cdot \left[3 - \left(1 + \frac{A_0}{B_0} \right) X_e \right]^{-\frac{t}{t_m}}} \quad (5.17)$$

care este de data aceasta o funcție putere, având drept parametri pe X_e și t_m . Aceștia nu se pot calcula direct, însă se pot determina prin optimizare cu ajutorul unui program de calcul prin metoda Simplex. Acest program a fost elaborat în laboratorul nostru, este scris în limbaj Pascal și a fost denumit ATHANOR. Relația (5.17) modelează procesul, permițând calculul constantelor cinetice k_1 și k_{-1} și a constantei de echilibru, pe baza valorilor optimizate ale parametrilor X_e și t_m .

5.2. Validarea modelului pentru reacții de esterificare și transesterificare catalizate de lipaza pancreatică

În continuare s-a încercat utilizarea și validarea acestui model pentru mai multe tipuri de reacții catalizate de lipaza pancreatică, reacții care vor fi studiate în capitolele următoare ale acestei lucrări. Rezultatele acestor experimente vor fi prezentate în continuare.

5.2.1. Reacția de esterificare a acidului hexanoic cu 1-pentanolul

Pentru exemplificarea acestui tip de reacție s-a mers pe o variantă în care viteza reacției să nu fie foarte mare, pentru a permite mai bine urmărirea ei în timp. Această urmărire s-a efectuat timp de 6 ore, prin analiză gaz-cromatografică. Lipaza folosită a fost preparat pancreatic brut obținut în laborator.

Evoluția în timp a reacției de esterificare dintre acid hexanoic și 1-pentanol se poate urmări în figura 5.1 și se observă că are forma unei curbe de saturație. Această curbă s-a construit pe baza datelor din tabelul 5.1.

Tabelul 5.1. Esterificarea acidului hexanoic (0,12 M) cu 1-pentanol (0,10 M) în n-hexan, la 37°C, în prezența lipazei pancreatice (5,07 g/l)

Conversie acid hexanoic	Timp de reacție (minute)
0,045	15
0,080	30
0,127	45
0,172	60
0,262	90
0,375	120
0,486	180
0,612	240
0,776	510

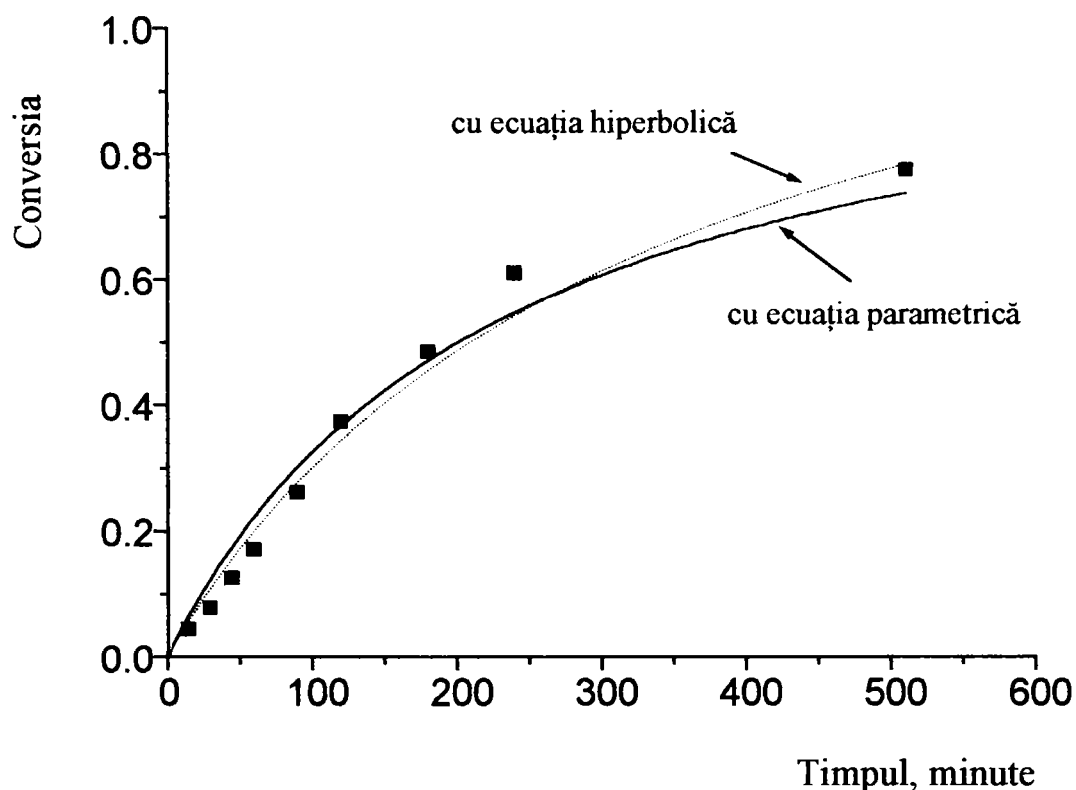


Figura 5.1. Modelarea cinetică a reacției de esterificare a acidului hexanoic cu 1-pentanol, catalizată de lipaza pancreatică

Pentru a obține valorile inițiale ale parametrilor X_e și t_m care să servească drept valori inițiale pentru optimizarea conform ecuației (5.17) se poate utiliza un alt model, mai simplu, care a fost propus de asemenea de Kosugi și Suzuki [97]. Se poate observa că punctele experimentale din figura 5.1 se așează pe o hiperbolă rectangulară. O asemenea hiperbolă poate fi ușor liniarizată, dacă reprezentăm inversa conversiei (pe care o notăm cu $1/X$) în funcție de inversa timpului ($1/t$), obținându-se cu aproximare bună o dreaptă, așa cum se poate vedea din figura 5.2.

Dacă notăm coordonatele punctelor de intersecție ale acestei drepte cu axa Ox ($-1/a, 0$) și cu axa Oy ($0, 1/b$), ecuația dreptei din figura 5.2 se va putea scrie astfel:

$$\frac{1}{X} = \frac{1}{a} + \frac{1}{b} \cdot \frac{1}{t} \quad (5.18)$$

unde b reprezintă conversia reactantului limitativ la timpul t . Ecuația (5.19) poate fi rearanjată în forma:

$$X = \frac{t \cdot b}{a + t} \quad (5.19)$$

$$X = \frac{b}{\frac{a}{t} + 1} \quad (5.20)$$

Din relația (5.20) rezultă că valoarea lui X tinde spre b dacă t tinde spre infinit, așadar b reprezintă de fapt conversia finală sau cea de echilibru.

Ecuția (5.19) poate fi scrisă și în forma:

$$t = \frac{X \cdot a}{b - X} \quad (5.21)$$

ceea ce ne permite observația că: $t = a$, pentru $X = b/2$, adică a reprezintă de fapt timpul necesar pentru ca să se atingă o valoare a conversiei egală cu jumătate din cea finală. Așadar parametrii a și b din ecuația (5.19) au de fapt aceeași semnificație ca și parametrii t_m și X_e din ecuația (5.17).

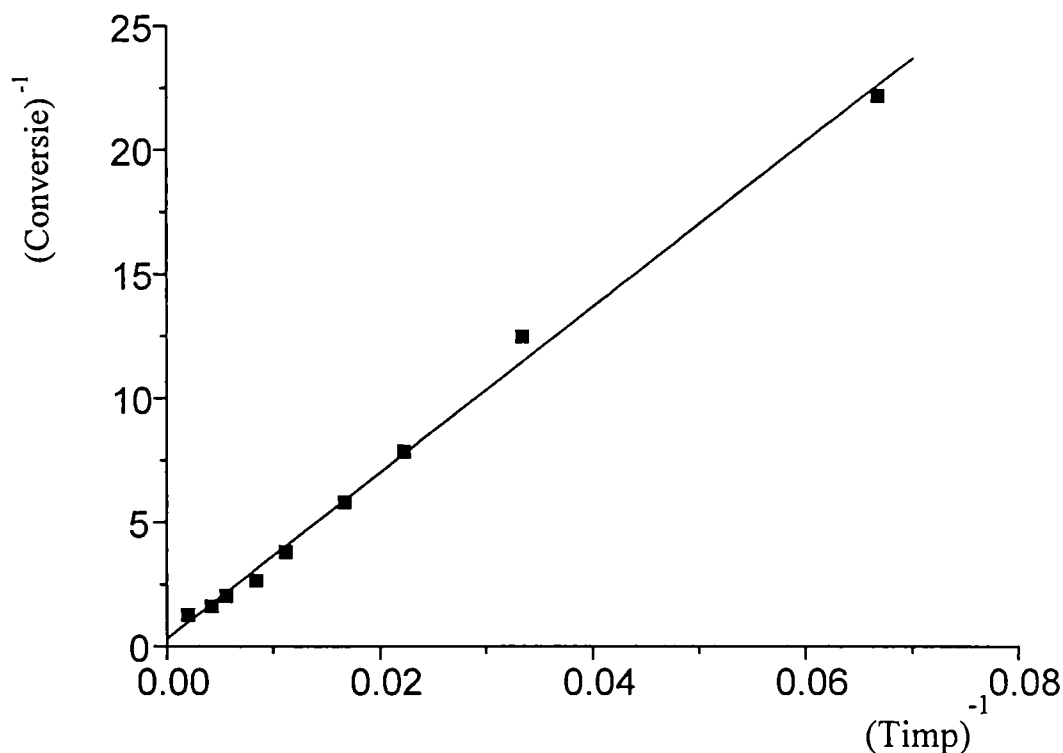


Figura 5.2. Estimarea parametrilor X_e și t_m pe baza ecuației hiperbolei brute liniarizate

Relația (5.19) reprezintă ecuația unei hiperbole rectangulare cu parametrii b și a , adică X_e și t_m . Acești parametri pot fi determinați pe baza datelor experimentale (valorile conversiei în timp) prin simplă liniarizare, așa cum s-a arătat, însă această determinare poate avea erori destul de mari (de exemplu, în cazul ales de noi se obțin valorile $X_e = 2,92$ și $t_m = 976$ min). Din această cauză am ales varianta optimizării ecuației hiperbolice ce descrie evoluția reacției, cu ajutorul unui program de calcul ce folosește metoda Simplex (ATHANOR). Această optimizare se face în așa fel încât ecuația hiperbolică obținută, de forma (5.19), să aibă o corelare cât mai bună cu punctele experimentale. În figura 5.1, curba punctată trasată cu ajutorul calculatorului reprezintă ecuația hiperbolică optimizată, iar punctele figurate sunt cele experimentale. În acest caz, parametrii X_e și t_m determinați în urma optimizării au următoarele valori:

$$X_e = 1,32$$

$$t_m = 329 \text{ min}$$

Coeficientul de corelare neliniară dintre ecuația hiperbolică și punctele experimentale este 0,993. Se observă că valoarea obținută pentru conversia de echilibru este mai mare decât 1, ceea ce este explicabil în condițiile în care această valoare nu are de fapt semnificație fizică de conversie și nu s-au colectat suficiente date experimentale pentru partea aplatizată a curbei cinetice, în apropierea echilibrului. Valoarea vitezei inițiale, obținută din derivata în origine a ecuației hiperbolice, este:

$$v_i = 0,040 \text{ min}^{-1}$$

Aceste valori obținute prin optimizarea hiperbolei au fost utilizate ca date inițiale pentru modelarea cu ajutorul ecuației (5.17). Celelalte date inițiale pentru această modelare au fost:

- concentrația inițială a reactantului limitativ (în cazul nostru alcoolul): 0,100 moli/l
- concentrația inițială a celuilalt reactant (acidul): 0,120 moli/l

Valorile parametrilor cinetici obținuți în urma optimizării au fost următoarele:

- conversia la echilibru: $X_e = 1,09 \pm 0,07$
- timpul necesar atingerii unei conversii de 50 % față de cea de echilibru
 $t_m = 236 \pm 15 \text{ min.}$
- constanta de viteză a reacției de esterificare: $k_1 = 0,039 \text{ moli}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
- viteza inițială a reacției de esterificare: $v_i = 0,046 \text{ min}^{-1}$

Coeficientul de corelare neliniară dintre ecuația parametrică și punctele experimentale este 0,970.

În acest caz se observă că potrivit modelului reacția are loc practic până la o conversie totală, deci nu vom putea calcula o constantă de echilibru. De asemenea, se observă că valoarea de calcul obținută pentru conversia de echilibru trece puțin peste 100 %, ceea ce este în limitele erorilor inerente ale modelului și este explicabilă ținând cont de faptul că ea corespunde de fapt conversiei la timp infinit și că nu a fost impusă nici o limitare matematică a valorii superioare a acestui parametru. Se mai poate remarca faptul că în cazul optimizării cu ecuația (5.17) se obțin și valorile unor parametri cinetici caracteristici procesului. Curba cinetică aferentă ecuației (5.17) a fost de asemenea trasată în figura 5.1 (cu linie continuă).

5.2.2. Reacția de transesterificare a tributiratului de glicerină cu 1-pentanol

Pentru această reacție s-a utilizat lipază III (precipitată cu acetonă din soluție tampon de pH 9) și raport echimolar al reactanților, condiții în care produșii formați sunt dibutiratul de glicerină și butiratul de n-pentil (un ester aromatizant). Reacția s-a efectuat la 37°C, în n-hexan. Urmărirea reacției s-a făcut prin cromatografie gaz-lichid, timp de 8 ore, până în apropierea echilibrului.

Valorile conversiei, determinate experimental, sunt prezentate în tabelul 5.2 iar curba cinetică este redată în figura 5.3, cu mențiunea că punctele din figură sunt cele experimentale, iar curba reprezintă modelul cinetic conform ecuației (5.17).

Valorile parametrilor cinetici obținuți în urma modelării sunt:

- conversia la echilibru: $X_e = 0,611 \pm 0,011$
- timpul necesar atingerii unei conversii de 50 % față de cea de echilibru:
 $t_m = 40,34 \pm 2,03 \text{ min.}$
- constanta de viteză a reacției de esterificare: $k_1 = 0,051 \text{ moli}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
- constanta de viteză a reacției inverse: $k_{-1} = 0,0206 \text{ moli}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{min}^{-1}$
- constanta de echilibru: $K = 2,47$
- viteza inițială: $v_i = 0,0112 \text{ min}^{-1}$

Coeficientul de corelare neliniară dintre datele experimentale și ecuația (5.17) a fost 0,996.

Tabelul 5.2. Transesterificarea tributiraturului de glicerină (0,22 moli/l) cu 1-pentanol (0,22 moli/l) la 37°C, în mediu de n-hexan, în prezența lipazei pancreatice.

Conversie 1-pentanol	Timp de reacție, minute
0,077	10
0,173	20
0,236	30
0,314	45
0,409	60
0,500	90
0,518	120
0,568	180
0,605	300
0,608	480

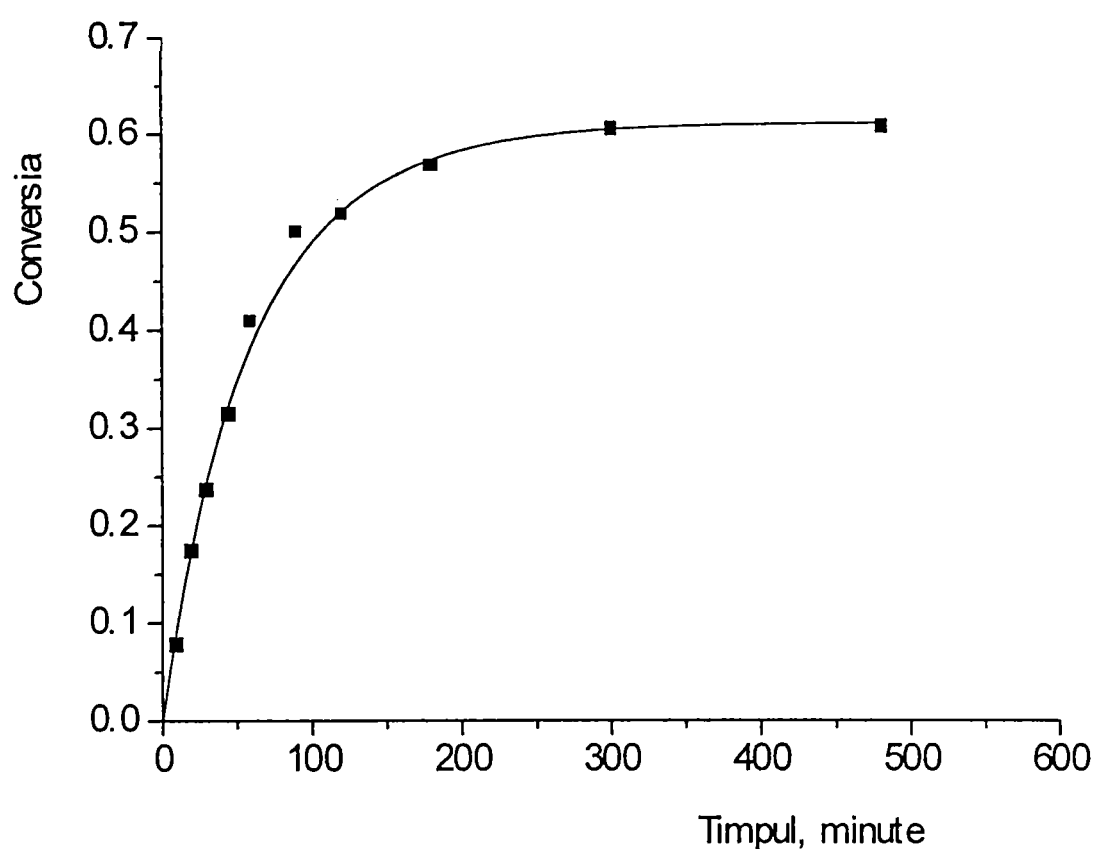


Figura 5.3. Modelarea cinetică a reacției de transesterificare a tributiraturului de glicerină cu 1-pentanol, catalizată de lipaza pancreatică

5.2.3. Reacția de esterificare a acidului oleic cu glicerina

În acest caz cinetica procesului este mai complicată, deoarece, dacă ținem cont de specificitatea de poziție a lipazei pancreatice, vom avea două reacții consecutive concurente, de formare a monooleatului și a dioleatului de glicerină. În această situație, singura posibilitate pentru a folosi acest model cinetic este să considerăm o reacție globală, ținând cont doar de legăturile esterice care se formează:



unde R este fie rest de glicerină, fie rest de monogliceridă

În acest caz se va lua în calcul ca valoare inițială pentru parametrul B_0 concentrația de legături hidroxil esterificabile, care în cazul nostru este egală cu de două ori concentrația glicerinei.

Reacția de esterificare s-a făcut cu un exces de 9 moli glicerină la un mol acid oleic. Concentrația inițială de apă în sistem a fost de 15,4 % (în volume), respectiv 8,58 mol/l, iar raportul molar inițial apă/acid oleic a fost 9,87/1. Urmărirea reacției s-a făcut prin determinarea acidului oleic nereacționat prin titrare potențiomtrică.

Concentrația de enzimă în sistemul de reacție a fost 16,1 g/l. Lipaza pancreatică utilizată a fost de la firma ICN Pharmaceuticals. Valorile experimentale ale conversiei sunt prezentate în tabelul 5.3.

Tabelul 5.3. Variația conversiei de acid oleic în timp, pentru reacția de esterificare cu glicerina în prezența lipazei pancreatice.

Conversie acid oleic %	Timp h
0,065	1
0,125	2
0,204	3
0,295	5
0,352	6
0,367	7
0,413	8
0,470	9
0,495	10
0,602	96
0,631	144
0,636	250

Datele inițiale pentru calculul cinetic sunt:

- concentrația inițială de acid oleic:

$$A_0 = 0,867 \text{ mol/l}$$

- concentrația inițială de legături hidroxil esterificabile:

$$B_0 = 16,05 \text{ mol/l}$$

Reprezentarea grafică a conversiei în timp este dată în figura 5.4. (până la 100 de ore de reacție), unde punctele de pe grafic sunt cele experimentale, iar curba trasată este cea calculată cu ajutorul ecuației (5.17).

Rezultatele obținute din calculul cinetic sunt următoarele:

- conversia de echilibru $X_e = 0,605 \pm 0,011$

- timpul necesar atingerii a 50 % din valoarea conversiei de echilibru: $t_m = 4,94 \pm 0,24$ ore

- coeficientul de corelare neliniară: 0,993

- constanta de echilibru: $K = 0,052$

- constanta de viteză a reacției de esterificare: $k_1 = 0,00481 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$

- constanta de viteză a reacției inverse: $k_{-1} = 0,0773 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$

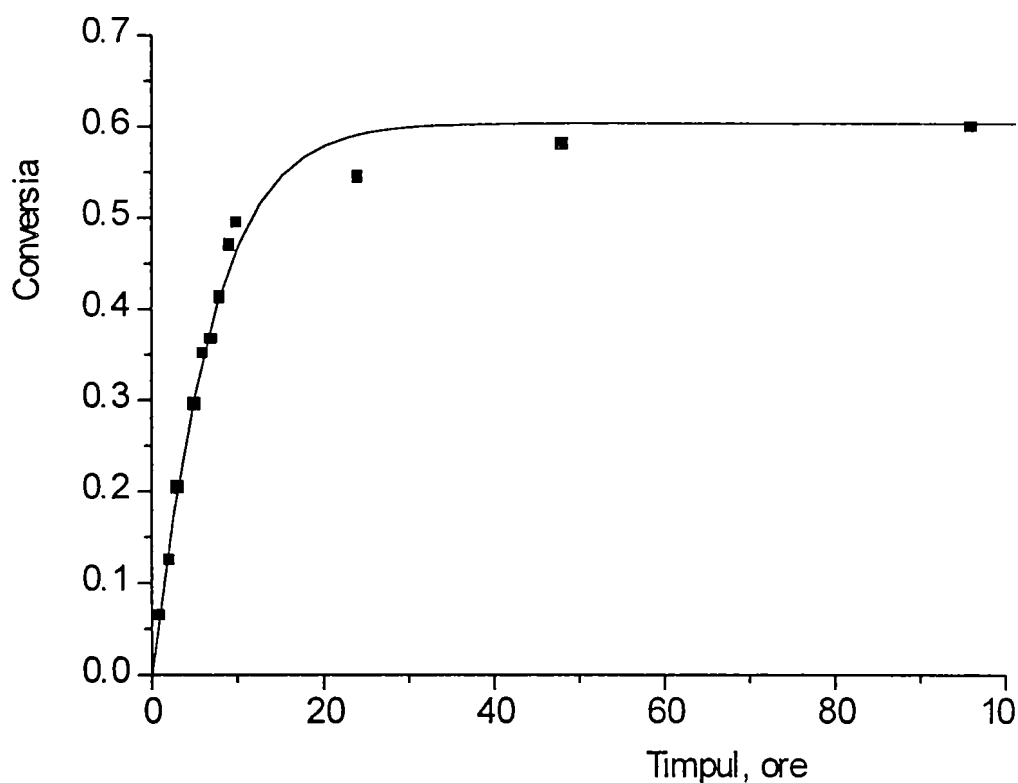


Figura 5.4. Modelarea reacției de esterificare a acidului oleic cu glicerina, în prezența lipazei pancreatice.

Viteza inițială de reacție, rezultată din derivata de ordinul 1 a ecuației (5.17) în punctul $t = 0$, are valoarea:

$$v_i = 0,0773 \text{ h}^{-1}$$

Se poate observa o corelare bună a datelor experimentale cu modelul teoretic. Valoarea mică a constantei de echilibru se datorește excesului mare de glicerină și faptului că în calculul acestei valori nu s-a ținut cont de concentrația inițială de apă din sistem ci numai de apa rezultată în reacție. Datorită faptului că parametrii cinetici obținuți reprezintă de fapt valori medii pentru cele două reacții consecutive, ei trebuie luați în considerare ca mărimi aparente. Viteza inițială aparentă va putea fi considerată egală cu cea reală, pentru că există o probabilitate mare ca la începutul reacției să se formeze numai monoester.

5.2.4. Reacția de acilare a 1,3-butandiolului cu acetat de n-butil

Și această reacție este o transesterificare, în care însă se obține practic numai monoesterul datorită faptului că lipaza manifestă regioselectivitate față de gruparea hidroxil primară a diolului, așa cum se va arăta mai departe. Această reacție s-a efectuat utilizând un exces de acetat de n-butil (raport molar 7/1), care a îndeplinit și rolul de mediu de reacție. Enzima folosită a fost lipază pancreatică brută obținută în laborator.

Valorile conversiei 1,3-butandiolului în timp, determinate prin analiză gaz-cromatografică, sunt prezentate în tabelul 5.4, iar rezultatele modelării în figura 5.5.

Tabelul 5.4. Acetilarea 1,3-butandiolului (0,99 moli/l) cu acetat de n-butil (7,1 moli/l) la 37°C, în prezența lipazei pancreatice.

Conversie 1,3-butandiol	Timp de reacție, ore
0,272	1
0,383	2
0,525	3
0,574	4
0,676	5
0,702	6
0,765	8
0,885	24
0,889	48

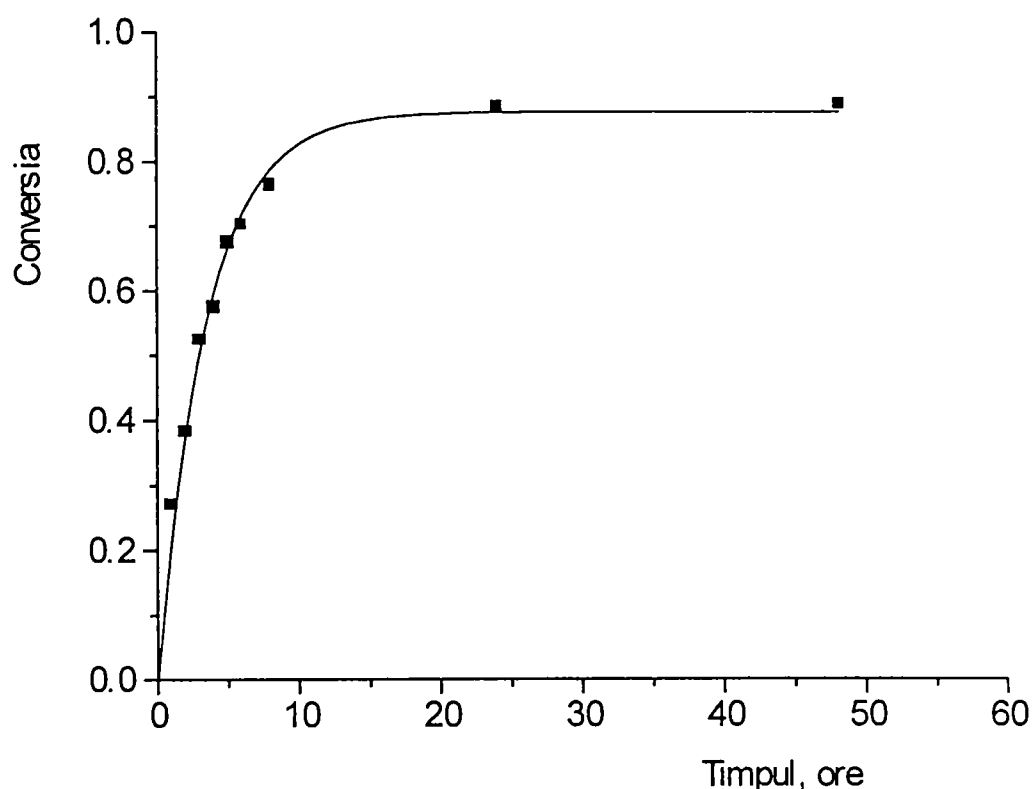


Figura 5.5. Modelarea reacției de acilare a 1,3-butandiolului cu acetat de n-butil, în prezența lipazei pancreatice.

Valorile parametrilor cinetici rezultați din această modelare sunt:

- conversia la echilibru: $X_e = 0,88 \pm 0,02$
- timpul necesar atingerii unei conversii de 50 % față de cea de echilibru: $t_m = 2,41 \pm 0,14$ ore.
- constanta de viteză a reacției de esterificare: $k_1 = 0,0355 \text{ moli}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{h}^{-1}$
- constanta de viteză a reacției inverse: $k_{-1} = 0,0354 \text{ moli}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{h}^{-1}$
- constanta de echilibru: $K = 1,00$
- viteza inițială: $v_i = 0,252 \text{ h}^{-1}$

Coeficientul de corelare neliniară a fost 0,993.

5.3. Concluzii

Pornindu-se de la ecuația cinetică a reacțiilor reversibile de ordinul II s-a reușit elaborarea unui model cinetic al reacțiilor de esterificare și transesterificare în medii bifazice apă-solvent organic sau organice cu conținut redus de apă. Acest model permite calcularea unor parametri cinetici: constanta de viteză a reacției directe și inverse, constanta de echilibru, viteza inițială de reacție, pe baza cunoașterii valorilor a doi parametri: conversia de echilibru și timpul necesar atingerii a 50 % din conversia de echilibru.

Valorile acestor parametri rezultă pe baza unui calcul de optimizare a ecuației parametrice cu datele experimentale. Pentru acest calcul a fost elaborat un program original denumit ATHANOR, care utilizează pentru optimizare metoda Simplex.

Modelul a fost verificat pentru mai multe tipuri de reacții catalizate de lipaze, care vor fi studiate în celelalte capitole ale acestei teze. S-au obținut în toate cazurile corelări foarte bune între model și punctele experimentale. În cazul reacțiilor în care unul dintre substraturi este un polioli, trebuie făcută precizarea că modelul, întrucât se bazează pe valorile conversiei globale a substratului limitativ, nu poate face diferență între reactivitatea diferitelor grupări hidroxilice și se obțin parametri cinetici aparenti, corespunzători reacției globale.

Veridicitatea modelului este cu atât mai bună cu cât numărul punctelor experimentale este mai mare și necesită urmărirea reacției până la valori cât mai apropiate de echilibru. Aceasta reprezintă un dezavantaj în cazul unor reacții a căror viteză este mai mică și atingerea echilibrului necesită sute de ore.

6. Influența parametrilor de reacție asupra activității de esterificare a lipazei pancreatice în mediu de solvent organic [304-306]

Așa cum s-a arătat anterior, lipaza își păstrează activitatea catalitică în solvenți organici, ceea ce permite realizarea unor reacții de esterificare ce nu pot avea loc cu randamente mari în mediu apos din cauza deplasării echilibrului spre hidroliză. Evident că aceste reacții sunt influențate de o serie de parametri cum ar fi: proveniența și concentrația enzimei, temperatura, concentrația inițială a substratului, concentrația inițială a apei în sistem, natura solventului organic utilizat, ca și, așa cum s-a demonstrat, de condițiile în care a fost obținută enzima. Pentru a putea studia influența acestor parametri asupra activității catalitice a lipazei pancreatice în reacții de esterificare în solvenți organici este necesară alegerea unei caracteristici care să permită aprecierea cantitativă a acesteia. Utilizarea în acest scop a activității, așa cum a fost ea definită în capitolul 4.1, nu este cea mai indicată, deoarece ea nu reprezintă de fapt decât o măsură a vitezei reacției enzimatică la un moment dat (în cazul nostru după 30 de minute de la startul reacției), iar vitezele acestor reacții se modifică în timp, după cum s-a văzut din datele de literatură prezentate. Din acest motiv am ales ca mărime caracteristică pentru evaluarea comparativă a reacțiilor efectuate în diverse condiții viteza inițială de reacție.

Viteza unei reacții enzimatică este dată de variația concentrației de substrat transformat sau produs obținut în raport cu timpul. Viteza inițială reprezintă expresia acestei viteze în momentul zero al reacției și poate fi determinată cel mai simplu ducând tangenta în origine la curba ce descrie variația respectivă. Această metodă este uneori mai de încredere decât ne-am aștepta, însă totuși se recomandă utilizarea ei doar în cazul inexistenței unor alternative mai precise. Din fericire, în cazul majorității reacțiilor enzimatică curba cinetică ce corespunde la o destul de mare diversitate de mecanisme are expresia matematică de tipul ecuației Michaelis-Menten, iar forma grafică a variației concentrației de substrat transformat este de tipul unei hiperbole rectangulare, deși sunt posibile și o serie de alte tipuri de curbe în funcție de cinetica procesului respectiv. Metodele moderne de calcul și programele de calculator performante existente la această oră permit corelări foarte precise ale datelor experimentale cu modelul matematic ales, indiferent care ar fi acesta.

Modul de lucru general. Într-un reactor de sticlă cu capacitatea de de 50 ml, prevăzut cu manta de termostatare și posibilitate de agitare magnetică, s-au introdus câte 10 ml de soluții ale celor 2 reactanți (acidul carboxilic și alcoolul) în solventul organic, la o anumită concentrație stabilită. S-a pornit agitarea și s-a termostatat la temperatura de reacție. S-a cântărit enzima și s-a introdus în amestecul de reacție, considerându-se acesta ca momentul zero al reacției. Amestecul de reacție a fost menținut sub agitare timp de câteva ore, luându-se probe de aproximativ 0,5 ml la intervale de timp determinate. Aceste probe au fost filtrate imediat pentru a stopa reacția prin îndepărtarea enzimei, apoi au fost analizate prin cromatografie gaz-lichid. Cu ajutorul dreptelor corespunzătoare de standardizare s-au calculat cantitățile de alcool, respectiv ester aflate în amestecul de reacție. Raportându-se la volumul inițial de substrat s-au determinat concentrațiile în ester, care au servit drept date inițiale pentru calcularea vitezelor inițiale de reacție.

Reactivii utilizați în aceste studii au fost de puritate analitică și anume: acid butiric, acid octanoic, acid undecanoic, acid oleic, 1-hexanol, 1-heptanol, n-decan, 1,4-dioxan și n-hexan achiziționate de la Merck, 1-pentanol, 1-octanol, izooctan și ciclohexan de la

Fluka, acid pelargonic, acid palmitic, acid stearic și izobutanol de la Riedel de Haen (Germania), acid hexanoic de la Loba Feinchemie (Austria), 1-butanol, acetonă, toluen și tetraclorură de carbon de la Chimopar București. Ei au fost folosiți ca atare, fără purificări suplimentare, cu excepția solvenților organici utilizați drept medii de reacție, care au fost anhidrificați conform metodelor indicate în literatura de specialitate [303] și apoi au fost păstrați pe site moleculare.

Lipaza pancreatică folosită drept catalizator a fost fie de proveniență comercială (de la firma Fluka din Elveția), fie a fost obținută în laborator și utilizată sub formă brută (pudră acetonică pancreatică) sau purificată prin precipitare cu acetonă din soluții cu pH controlat. Această alegere a enzimei a fost influențată de faptul că în unele cazuri nu s-a urmărit folosirea unui preparat foarte activ pentru a putea urmări mai bine evoluția în timp a procesului.

Calculul vitezelor inițiale. Reacțiile de esterificare catalizate de lipază în mediu de solvenți organici pot fi încadrate în categoria reacțiilor a căror evoluție în timp respectă o cinetică formală de tip Michaelis-Menten, așa cum se poate observa din datele tabelului 6.1 și din figura 6.1, care redau evoluția în timp a reacției de esterificare dintre acidul butiric și 1-pentanol, la 37°C, catalizată de lipaza pancreatică purificată prin precipitare cu acetonă la pH 8. Pentru reprezentarea grafică s-a ales utilizarea concentrației esterului, pentru a avea o curbă ascendentă.

Tabelul 6.1. Variația concentrațiilor în timp pentru esterificarea acidului butiric (0,149 M) cu 1-pentanol (0,149 M, 13,12 g/l) catalizată de lipaza pancreatică purificată prin precipitare cu acetonă (6,66 g/mol substrat), în mediu de izooctan.

Timpe de reacție (min.)	Concentrația alcoolului (g/l)	Concentrația esterului (moli/l)
15	11,05	0,023
30	9,20	0,044
45	5,65	0,085
60	3,04	0,114
75	1,95	0,127
90	1,49	0,132
120	1,32	0,134

Calculul vitezei inițiale se poate face pe baza modelului care a fost prezentat în capitolul 5.1, utilizând prima derivată a funcției parametrice (5.17). Acest lucru însă necesită urmărirea reacției un timp destul de îndelungat pentru a avea mai multe valori situate în apropierea conversiei de echilibru. Din acest motiv, în situațiile în care nu ne interesează valorile constantelor cinetice ci numai vitezele inițiale, este mai practic să se folosească modelul hiperbolic, care a fost de asemenea prezentat în capitolul 5.2.1. S-a demonstrat pe exemplul respectiv că acest model dă valori apropiate (puțin mai mici) ale vitezei inițiale comparativ cu cele obținute din valoarea primei derivate în punctul $t = 0$ a ecuației parametrice.

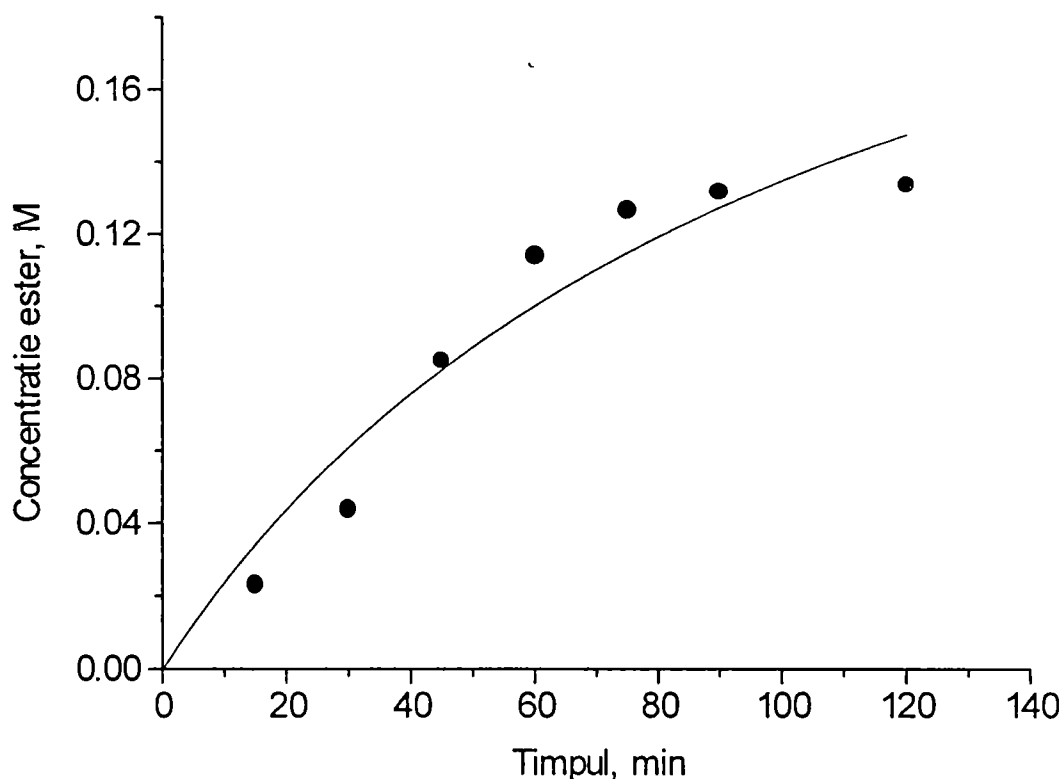


Figura 6.1. Determinarea vitezei inițiale de reacție la esterificarea acidului butiric cu 1-pentanolul în cataliză enzimatică, pe baza modelului hiperbolic

Se poate remarca faptul că punctele experimentale se corelează destul de bine cu modelul hiperbolic. Pe baza acestui model, viteza inițială de reacție va fi egală cu derivata ecuației hiperbolice în punctul $t = 0$, adică cu raportul celor doi parametri ai hiperbolei. În cazul nostru $v_i = 2,59 \cdot 10^{-3} \text{ moli} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

O altă posibilitate de calcul a vitezei inițiale, mai ales dacă reacția este lentă și nu se ajunge în zona de saturare caracteristică modelului hiperbolic, este bazată pe observația că în prima fază a reacției creșterea concentrației în timp este aproximativ liniară. Așadar se poate calcula viteza inițială prin corelarea liniară a acestor valori, cu mențiunea că valorile astfel obținute vor fi ceva mai mici decât cele rezultate conform modelului hiperbolic. În cazul prezentat, prin corelarea liniară a primelor 5 valori ale concentrației de ester din tabelul 6.1 rezultă o valoare vitezei inițiale de $v_i = 1,85 \cdot 10^{-3} \text{ moli} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. În determinările următoare s-a căutat să se utilizeze modelul hiperbolic de calcul a vitezei inițiale, cu unele excepții care vor fi menționate.

Analiza cromatografică. Etalonarea concentrațiilor de 1-butanol, *i*-butanol, 1-hexanol, 1-heptanol și 1-octanol, în vederea determinării cantitative prin cromatografie gaz-lichid s-a efectuat în modul descris în capitolul 4.3.4.2.1 pentru 1-pentanol. Ca standard intern s-a folosit *n*-decanul. Parametrii dreptelor corespunzătoare, rezultate din etalonare, sunt prezentate în tabelul 6.2.

Tabelul 6.2. Parametri de corelare liniară pentru calculul cantitativ al concentrației unor alcooli monohidroxilici prin cromatografie gaz-lichid

Denumirea alcoolului	Parametri de corelare liniară pentru calculul concentrației	
	Ordonata la origine	Panta dreptei
1-butanol	0,196	0,771
i-butanol	0,036	0,690
1-hexanol	0,062	0,605
1-heptanol	0,230	1,215
1-octanol	0,064	0,751

Aceste valori au fost utilizate pentru calculul concentrațiilor de alcool și ester din sistemele de reacție respective.

6.1. Dependența vitezei inițiale de concentrația de enzimă

Acest studiu s-a efectuat folosind lipază pancreatică provenită de la firma Fluka având activitatea, determinată în laboratorul nostru, de 0,53 unități/mg. Determinările au fost efectuate pentru reacția de esterificare a acidului butiric cu n-heptanolul, pornindu-se de la concentrații echimolare ale reactanților (0,149 moli/l) în n-hexan. Temperatura de reacție a fost 37°C, iar concentrația enzimei în sistem a fost cuprinsă în intervalul 5-10 g/l. Reacțiile au fost urmărite timp de 3 ore. S-au determinat concentrațiile de ester și conversiile în ester pentru fiecare probă (tabelul 6.3).

Tabelul 6.3. Esterificarea acidului butiric (0,149 moli/l) cu n-heptanol (0,149 moli/l) în n-hexan, la diferite concentrații inițiale de lipază pancreatică

Nr. sint.	Conc. lipazei		Timp min.	Conc. ester g/l	Conversie în ester
	g/l	Unit./l			
1.	-	-	180	-	-
2.	4,97	2630	15	0,698	0,025
			30	1,317	0,048
			60	2,974	0,108
			90	3,723	0,136
			120	4,311	0,157
			180	6,764	0,247
3.	7,36	3900	15	0,716	0,026
			30	1,396	0,051
			60	3,418	0,125
			120	7,314	0,267
			180	9,263	0,338
4.	10,07	5340	15	1,386	0,050
			30	2,361	0,086
			60	3,787	0,138
			90	6,325	0,230
			120	8,463	0,309
			180	10,634	0,384

S-a făcut și o reacție în aceleași condiții, dar fără a introduce enzima, condiții în care nu s-a obținut ester în intervalul de timp menționat.

Reprezentarea grafică a concentrațiilor de ester în funcție de timp la diferite concentrații inițiale de lipază este dată în figura 6.2, unde punctele reprezintă datele experimentale, iar curbele modelul hiperbolic.

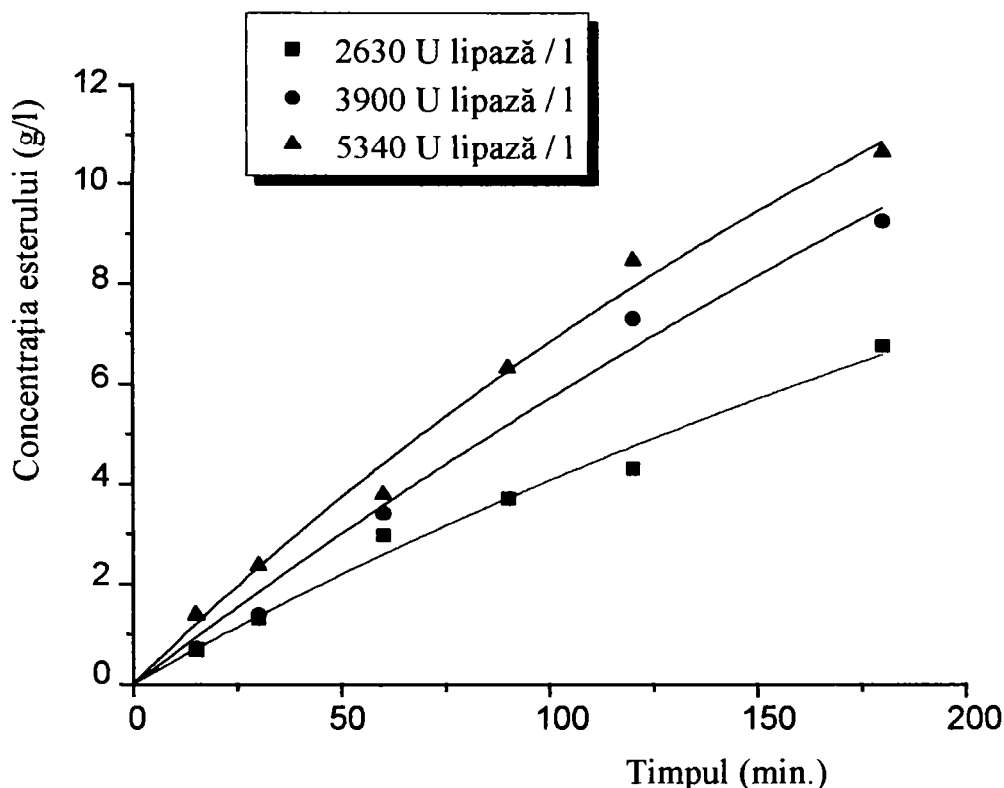


Figura 6.2. Graficul variației concentrației esterului în funcție de timp pentru esterificarea acidului butiric cu n-heptanol la diferite concentrații inițiale de lipază pancreatică

S-au calculat, pe baza parametrilor rezultați din corelarea hiperbolică făcută pe calculator (cu programul Origin 3.1), vitezele inițiale de reacție, exprimate $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, apoi transformate în $\text{moli}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, care sunt prezentate în tabelul 6.4, alături de parametrii hiperbolelor ce au rezultat în urma corelării.

Tabelul 6.4. Vitezele inițiale de reacție pentru esterificarea acidului butiric (0,149 moli/l) cu n-heptanol (0,149 moli/l) în n-hexan, în funcție de concentrația lipazei pancreatice.

Nr. sint.	Conc. lipază g/l	Parametrii hiperbolei		Viteza inițială	
		P_1	P_2	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	$\text{moli}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
1.	0	-	-	0,0	0,0
2.	4,97	29,21	617,48	0,0473	0,0114
3.	7,97	57,44	906,11	0,0634	0,0190
4.	10,07	40,76	496,59	0,0821	0,0246

Reprezentarea grafică a vitezei inițiale de reacție în funcție de concentrația enzimei (exprimată în unități/l) este, în domeniul studiat, o dreaptă cu caracteristicile date în figura 6.3.

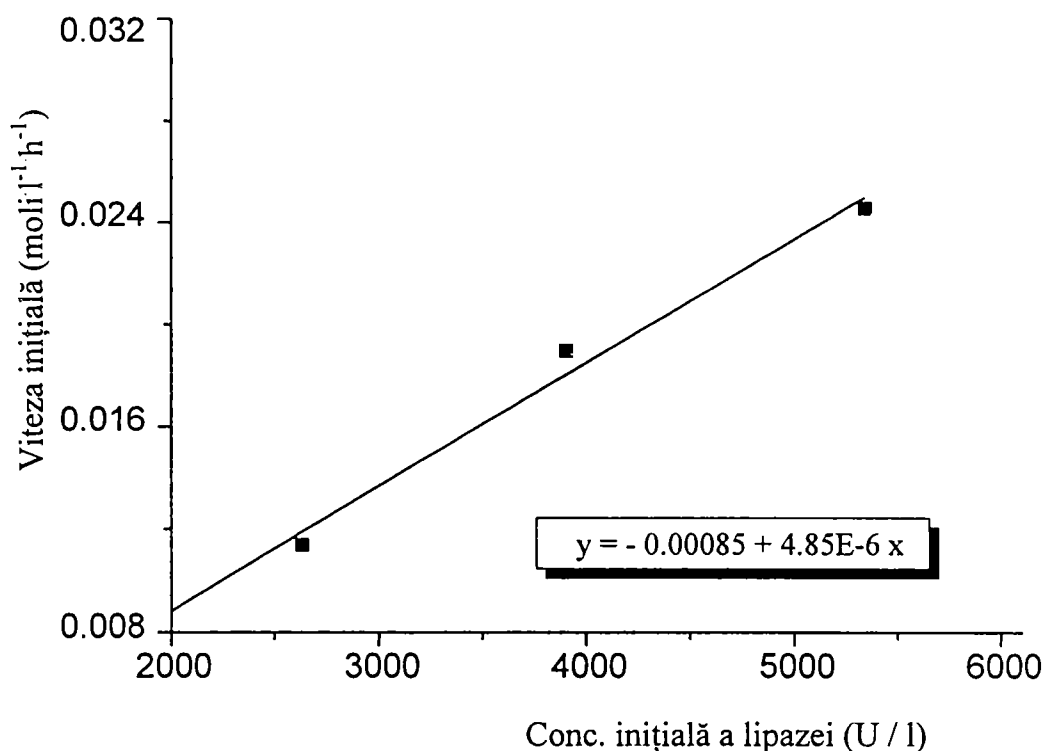


Figura 6.3. Dependența vitezei inițiale de esterificare de concentrația lipazei

Se poate deci afirma că, în limitele studiate, viteza inițială a esterificării, deci activitatea de esterificare a lipazei, crește liniar cu cantitatea de enzimă în limitele care ne interesează, așadar nu putem vorbi despre o saturare a substratului cu enzimă. Rezultă de asemenea că pentru celelalte studii, pentru a avea rezultate veridice, trebuie luate în lucru concentrații identice de lipază raportate la substrat, pentru a evita corectarea rezultatelor ținând cont de influența concentrației enzimei conform figurii 6.3.

6.2. Influența naturii și polarității solventului organic

Este de așteptat ca natura și polaritatea solventului organic să influențeze de asemenea reacțiile de esterificare catalizate de lipază în solvenți organici. Polaritatea solvenților organici poate fi exprimată cantitativ prin intermediul parametrului de solubilitate Hildebrand [307], care caracterizează forțele intermoleculare și ale cărui valori ridicate corespund unei polarități mai mari a solventului.

Determinările experimentale pentru acest studiu s-au făcut de asemenea pentru reacția dintre acid butiric și n-heptanol, luați în concentrații inițiale echimolare (0,149 moli/l). În toate determinările s-au utilizat aceleași concentrații de enzimă (45 g/mol acid), iar temperatura de reacție a fost 37°C. Lipaza utilizată a fost de la firma Fluka.

Desfășurarea reacției a fost urmărită timp de 120-360 de minute, tot prin cromatografie gaz-lichid, prin determinarea cantității de ester formate la diferite intervale de timp. Pentru etalonare s-a folosit butiric de n-heptil obținut în laborator și purificat prin distilare în vid. Solvenții organici utilizați au fost anhidrificali și menținuți pe site moleculare. Conținutul în apă al reactanților și lipazei s-a determinat prin metoda Karl Fischer și a fost : acid butiric: 1,1 %, heptanol: 0,3 % și lipază: 7 %. În consecință, conținutul inițial de apă al sistemului a fost foarte mic (0,07 %). Rezultatele determinărilor sunt prezentate în tabelul 6.5.

Tabelul 6.5. Esterificarea acidului butiric (0,149 moli/l) cu n-heptanol (0,149 moli/l) în diverși solvenți organici, în prezența lipazei pancreatice (45 g/mol acid)

Nr. sint.	Solvent organic	Timp min.	Conc. ester g/l	Conversie în ester
1.	Acetonă	180	0,0	0,0
2.	1,4-Dioxan	30	0,171	0,006
		90	0,334	0,012
		180	0,723	0,026
		240	1,005	0,037
3.	Toluen	15	0,385	0,014
		30	0,692	0,025
		60	1,466	0,053
		90	2,083	0,076
		120	2,592	0,094
		180	3,985	0,145
		240	4,522	0,165
4.	Tetraclorură de carbon	15	0,893	0,032
		30	1,172	0,043
		60	1,594	0,058
		90	2,372	0,086
		120	3,764	0,137
		180	4,432	0,161
		240	5,218	0,189
5.	Ciclohexan	15	1,018	0,037
		30	1,763	0,064
		60	2,513	0,092
		90	4,168	0,152
		120	5,692	0,208
		180	6,551	0,239
		240	8,675	0,316
6.	n-Hexan	15	0,716	0,026
		30	1,396	0,051
		60	3,418	0,125
		120	7,314	0,267
		180	9,263	0,338
		240	10,952	0,399
7.	Izooctan	30	1,627	0,059
		60	3,799	0,138
		90	4,996	0,180
		180	7,680	0,280
		240	10,468	0,382

În figurile 6.4 și 6.5 sunt date reprezentările grafice ale valorilor concentrațiilor de ester obținute experimental și curbele de corelare hiperbolice corespunzătoare.

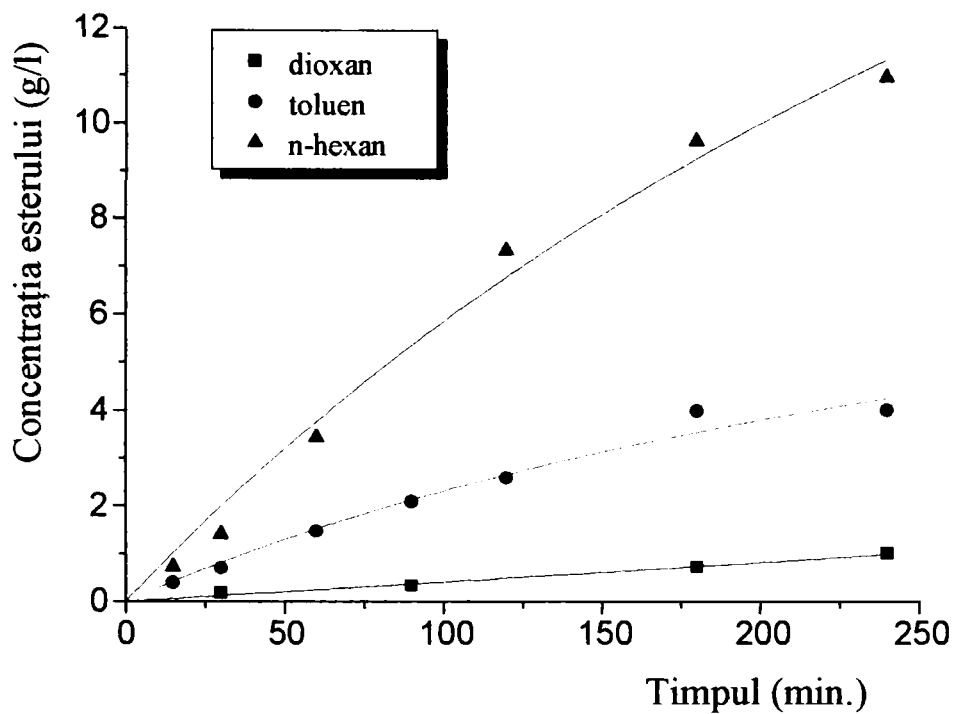


Figura 6.4. Graficul variației concentrației de ester în funcție de timp pentru esterificarea acidului butiric (0,149 moli/l) cu n-heptanol (0,149 moli/l), catalizată de lipaza pancreatică (1,0 g/mol substrat) în mediu de solvenți organici (a).

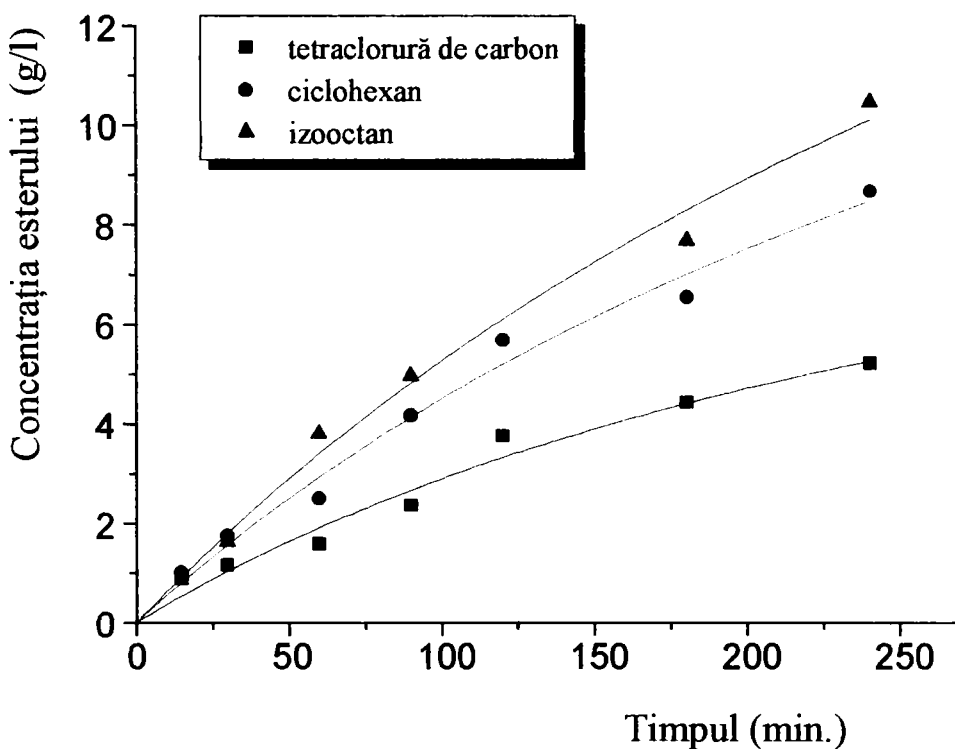


Figura 6.5. Graficul variației concentrației de ester în funcție de timp pentru esterificarea acidului butiric (0,149 moli/l) cu n-heptanol (0,149 moli/l), catalizată de lipaza pancreatică (1,0 g/mol substrat) în mediu de solvenți organici (b).

Și în acest caz au fost calculate vitezele de reacție, care au fost exprimate de data aceasta în $\text{moli}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}(\text{lipază})^{-1}$, pentru a se raporta și la cantitatea de enzimă folosită. Vitezele inițiale de reacție obținute pentru solvenții testați, în condițiile date, sunt prezentate în tabelul 6.6 și în figura 6.6.

Tabelul 6.6. Dependența vitezei inițiale de reacție de natura solventului pentru esterificarea acidului butiric cu 1- heptanolul, catalizată de lipază

Nr. sint.	Solvent organic	Parametru de solubilitate δ $[(\text{cal} / \text{cm}^3)^{0,5}]$ [307]	Parametrii hiperbolei		Viteza inițială	
			P_1	P_2	$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}(\text{lipază})^{-1}$
1.	Acetonă	10,0	-	-	0,0	0,0
2.	1,4-Dioxan	10,0	2,14	396,53	0,0054	0,009
3.	Toluen	8,9	10,71	363,80	0,0294	0,058
4.	CCl_4	8,6	12,63	333,98	0,0378	0,072
5.	Ciclohexan	8,2	22,89	406,86	0,0563	0,105
6.	n-Hexan	7,3	34,62	493,35	0,0702	0,161
7.	Izooctan	6,9	29,32	455,54	0,0644	0,135

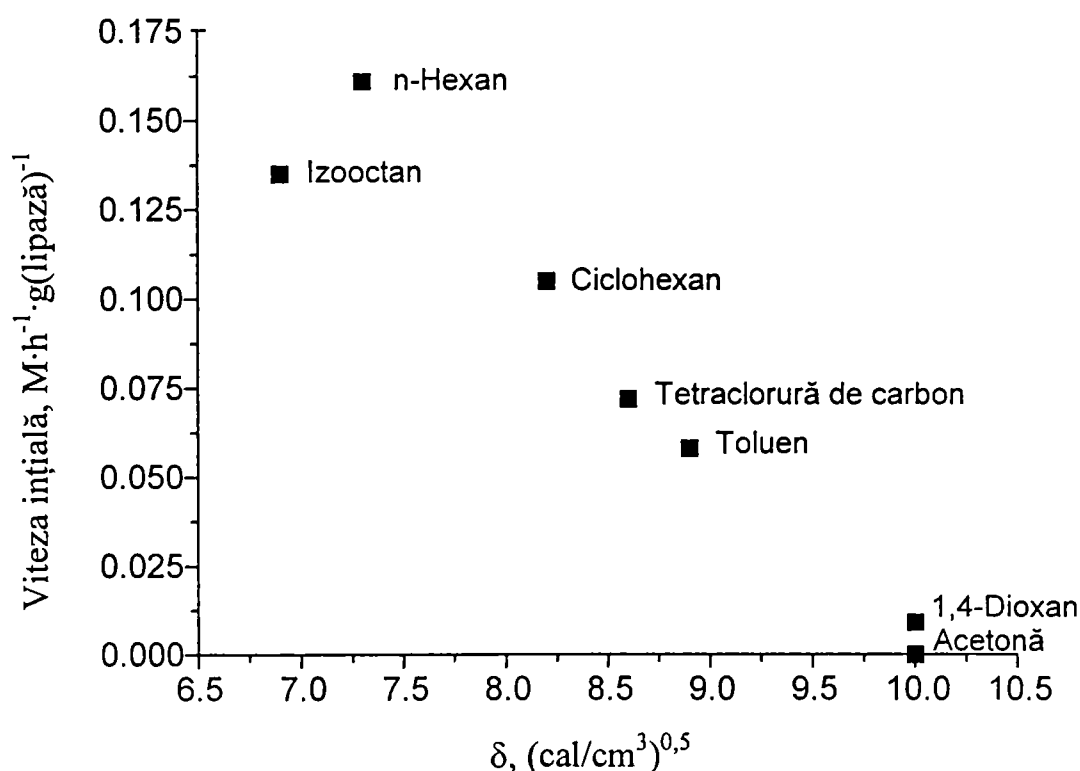


Figura 6.6. Influența naturii solventului organic asupra vitezei inițiale de esterificare

Se observă că reacția nu are loc sau are loc cu viteză foarte mică în solvenți mai polari și miscibili cu apa. Nu s-au putut încerca drept mediu de reacție alți solvenți miscibili cu apa ca alcoolii inferiori, deoarece ar fi reprezentat un substrat concurent pentru reacție. Ținând cont de faptul că în sistem este prezentă doar o cantitate foarte mică de apă, care însă este necesară pentru menținerea conformației catalitice active a enzimei, se poate

presupune că acești solvenți realizează o deshidratare a enzimei, care în acest fel își pierde activitatea catalitică. Este posibil ca în condițiile adăugării unei anumite cantități de apă în sistem, reacția să aibă loc și în acești solvenți.

Activitățile catalitice cele mai mari s-au observat în cazul utilizării unor solvenți nepolari și nemiscibili cu apa: n-hexan și izooctan. Deși valoarea cea mai scăzută a parametrului de solubilitate o are izooctanul, cea mai mare viteză de esterificare s-a observat în cazul utilizării n-hexanului drept mediu de reacție. Explicația poate fi legată de caracterul ramificat al moleculei izooctanului. Se pare că reacția este favorizată de solvenții constituiți din molecule cu catene liniare, ceea ce explică și diferența de activitate care s-a constatat între mediul de n-hexan și cel de ciclohexan.

Alegerea celui mai potrivit mediu de reacție trebuie făcută ținând cont și de alte considerente, cum ar fi temperatura de fierbere a solventului sau solubilitățile materiilor prime și ale produșilor de reacție.

6.3. Influența cantității inițiale de apă din sistemul de reacție

Datele de literatură privind rolul apei în reacțiile catalizate de enzime în solvenți organici sunt destul de contradictorii, însă se pare că există un consens asupra faptului că este necesară o cantitate minimă de apă pentru menținerea conformației catalitice active.

Rolul apei în reacțiile de esterificare catalizate de lipaze este dublu: pe de o parte ca solvent pentru enzimă contribuie la realizarea acestei conformații active, iar pe de altă parte fiind produs al reacției poate influența nefavorabil echilibrul acesteia. Necesitatea elucidării rolului apei a determinat efectuarea unui studiu al influenței concentrației inițiale a apei din sistemul de reacție. Acest rol al apei va fi discutat mai detaliat în capitolul referitor la esterificarea acidului oleic cu glicerina. În acest studiu s-a urmărit numai influența unor concentrații inițiale reduse de apă, introduse pentru a realiza o solvatare mai bună a enzimei, asupra vitezei reacției de esterificare.

Sistemul de reacție ales a fost esterificarea acidului butiric cu 1-pentanolul, utilizând ca solvent izooctanul și drept catalizator lipaza pancreatică obținută în laborator sub formă de pudră acetonică. S-a pornit și în acest caz de la concentrații inițiale echimolare ale reactanților (0,149 mol/l) iar concentrația inițială a lipazei față de substrat a fost în toate cazurile 1,33 g/mol. Solventul a fost anhidricat prin menținere pe site moleculare. Conținutul în apă al reactanților s-a determinat prin metoda Karl Fischer și a fost următoarea:

- acid butiric: 1,1 %
- 1-pentanol: 0,28 %
- lipază: 5,8 %

Temperatura de reacție a fost 37°C. Urmărirea reacției s-a făcut prin cromatografie gaz-lichid, determinându-se concentrația de alcool la diferite intervale de timp. Raportând aceste concentrații de alcool la cea inițială, s-au determinat valorile corespunzătoare ale conversiei alcoolului, așa cum este prezentat în tabelul 6.7. Neavând loc nici o reacție secundară, aceste valori reprezintă în același timp conversiile în ester.

Tabelul 6.7. Esterificarea acidului butiric cu 1-pentanol în izooctan, la concentrații inițiale diferite de apă, catalizată de lipaza pancreatică.

Nr. sint.	Conc. inițială a apei		Timp min.	Raport arii A_{al}/A_{st}	Conc. alcool g/l	Conversia în ester
	% (v/v)	mol/l				
1.	0,074	0,041	30	1,501	14,41	0,099
			60	1,249	12,03	0,248
			120	0,812	7,90	0,506
			150	0,596	5,86	0,634
			180	0,423	4,23	0,735
			210	0,269	2,78	0,826
2.	0,124	0,069	15	1,798	17,20	0,044
			60	1,378	13,24	0,264
			90	1,092	10,54	0,414
			120	0,951	9,21	0,488
			150	0,729	7,12	0,604
			180	0,517	5,12	0,715
3.	0,174	0,096	15	1,562	14,97	0,064
			30	1,394	13,39	0,163
			45	1,183	11,40	0,287
			60	0,976	9,44	0,410
			90	0,659	6,45	0,597
			120	0,502	4,97	0,689
			180	0,173	1,87	0,883
4.	0,273	0,152	15	1,671	15,98	0,105
			30	1,545	14,79	0,262
			45	1,305	12,53	0,398
			60	0,925	8,95	0,538
			90	0,912	8,83	0,702
			120	0,575	5,65	0,817
			150	0,473	4,69	0,860
			180	0,333	3,37	0,893
5.	0,372	0,207	15	1,577	15,08	0,113
			30	1,247	11,98	0,295
			45	1,087	10,47	0,384
			90	0,777	7,55	0,757
			120	0,412	4,12	0,839
			180	0,088	1,06	0,937
6.	0,471	0,262	15	1,630	15,56	0,117
			45	0,737	7,17	0,593
			60	0,575	5,64	0,680
			90	0,355	3,57	0,797
			120	0,277	2,87	0,838
			150	0,193	2,05	0,883
			180	0,095	1,13	0,936

Nr. sint.	Conc. inițială a apei		Timp min.	Raport arii A_{alc}/A_{st}	Conc. alcool g/l	Conversia în ester
	% (v/v)	mol/l				
7.	0,571	0,317	15	1,644	15,68	0,111
			30	1,248	11,96	0,321
			48	0,920	8,98	0,496
			60	0,764	7,41	0,580
			76	0,520	5,12	0,709
			105	0,375	3,76	0,787
			120	0,262	2,70	0,847

Și în aceste cazuri au fost calculate vitezele inițiale de reacție, exprimate în $\text{moli}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}(\text{lipază})^{-1}$. Rezultatele sunt trecute în tabelul 6.8. Coeficienții de corelare neliniară dintre datele experimentale și modelul hiperbolic nu au mai fost atât de buni (valori începând de la 0,95) ca în situația în care s-a urmărit concentrația esterului, datorită erorilor de măsurare a ariilor de alcool.

Pentru a avea o imagine mai completă a activității de esterificare a lipazei în condițiile date, în tabelul 6.8 au fost trecute și conversiile după o oră de reacție .

Tabelul 6.8. Dependența vitezei inițiale de reacție de concentrația inițială a apei din sistem pentru esterificarea acidului butiric cu 1-pentanolul în prezența lipazei (pudră acetonică pancreatică).

Nr. sinteză	Conc. apei în sistem % (vol)	Viteza inițială		Conversia după 1 h
		min^{-1}	$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}(\text{lipază})^{-1}$	
1.	0,074	0,00780	0,348	0,25
2.	0,124	0,00738	0,330	0,26
3.	0,174	0,01205	0,538	0,41
4.	0,273	0,01750	0,782	0,54
5.	0,372	0,01844	0,842	0,56
6.	0,471	0,02173	0,971	0,62
7.	0,571	0,02069	0,925	0,58

Se observă că în domeniul concentrațiilor de apă studiate, reacția de esterificare este favorizată de introducerea unor cantități mici de apă în sistemul de reacție. Comparativ cu situația inițială, în care conținutul de apă al sistemului este de 0,074%, datorită apei existente în materiile prime, viteza de reacție crește de aproximativ 2,5 ori, după care începe să scadă ușor. Așadar enzima prezintă o activitate catalitică însemnată chiar în condițiile în care cantitatea de apă prezentă în sistem este foarte mică.

O altă concluzie importantă este că apa rezultată din reacție, care ar reprezenta 2,68 mg/ml, respectiv 0,27% (v/v) în cazul unei conversii de 100%, nu va influența nefavorabil esterificarea, deoarece acest conținut se încadrează în limita concentrațiilor pentru care s-a făcut studiul. Mai mult decât atât, se poate presupune chiar o ușoară accelerare a reacției față de modelul hiperbolic propus, datorită apei rezultate din reacție. Acest fapt ar explica și coeficienții de corelare neliniară mai scăzuți comparativ cu experimentele anterioare. Pe de altă parte, după 3 ore de reacție conversiile în ester au fost de peste 90% la sintezele

4 ÷ 7, ceea ce duce la concluzia că nu este necesară eliminarea apei de reacție decât dacă se urmărește obținerea unei conversii apropiate de 100%.

6.4. Influența temperaturii

Reacțiile catalizate de enzime au loc în general la temperaturi apropiate de cea ambiantă, creșterea temperaturii peste o anumită valoare determinând inactivarea enzimei prin denaturarea proteinei. Pe de alta parte, există indicații în literatura de specialitate [280], conform cărora stabilitatea termică a enzimei poate crește în mediu de solvenți organici comparativ cu mediile apoase. Ținând cont de faptul că creșterea temperaturii favorizează reacțiile chimice prin creșterea vitezei de reacție, se impune efectuarea unor determinări la diferite temperaturi pentru a stabili o valoare optimă.

Sistemul de reacție ales pentru acest studiu a fost esterificarea acidului butiric cu n-heptanolul, în izooctan. Lipaza pancreatică a provenit de la firma Fluka, iar reactanții s-au luat de asemenea în cantități echimolare (concentrații inițiale de 0,149 moli/l).

Analiza produsului de reacție s-a făcut prin cromatografie gaz-lichid, calculându-se concentrațiile de ester după o oră de reacție pe baza standardizării cu clorbenzen drept compus etalon (concentrația standardului: 8,24 mg/ml).

În acest caz nu s-a făcut urmărirea cinetică a reacției, activitatea de esterificare fiind exprimată prin cantitatea de substrat transformat după o oră de 1 g lipază, în condițiile date.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 6.9.

Tabelul 6.9. Esterificarea acidului butiric (0,149 moli/l) cu n-heptanol (0,149 moli/l) în izooctan, catalizată de lipaza pancreatică, la diferite temperaturi.

Nr. sinteză	Temperatura °C	Conc. ester după 1 h g/l	Activitatea de esterificare mol·l ⁻¹ ·h ⁻¹ ·g lipază ⁻¹
1.	25	2,053	0,073
2.	30	2,577	0,092
3.	35	2,869	0,103
4.	40	3,216	0,115
5.	45	3,678	0,132
6.	50	3,711	0,134

Reprezentarea grafică a dependenței activității de esterificare de temperatură este dată în figura 6.7.

Se observă că această dependență este aproape liniară în limitele de temperatură studiate, dar se reduce mult în intervalul 45-50°C. Creșterea activității de esterificare cu temperatura nu justifică alegerea unei temperaturi de lucru de peste 40°C, deoarece o temperatură prea ridicată ar prezenta pericolul inactivării termice a enzimei la utilizare mai îndelungată.

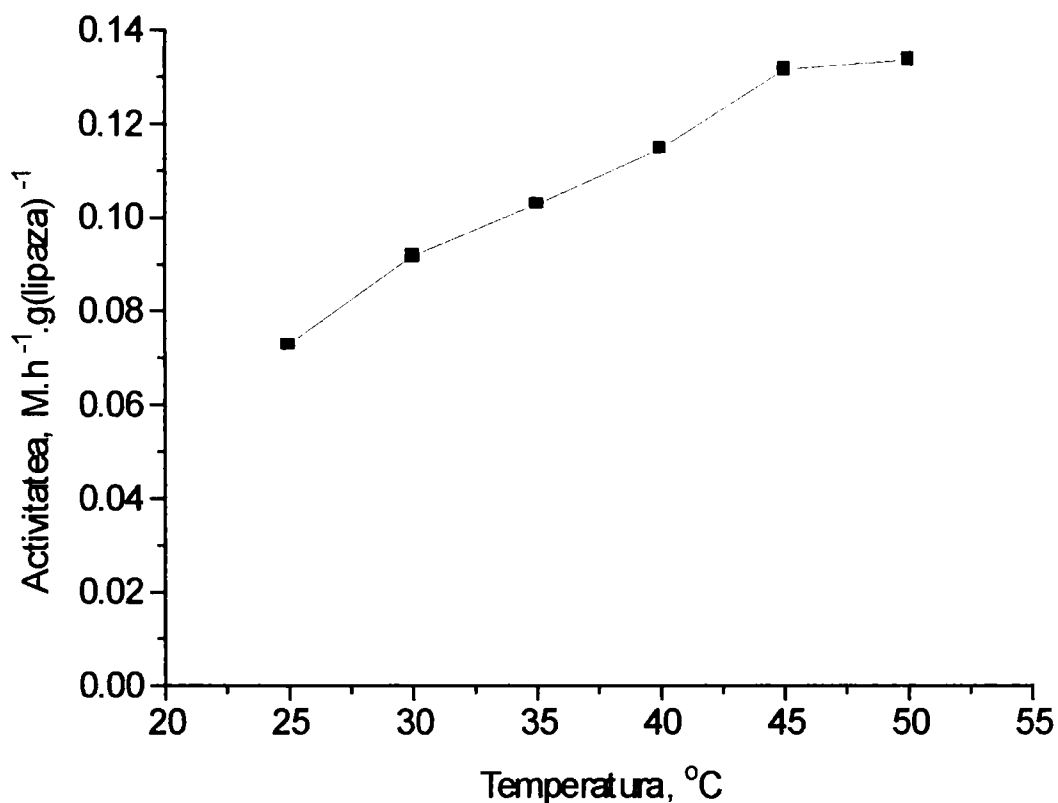


Figura 6.7. Dependența activității de esterificare de temperatură pentru reacția dintre acidul butiric și n-heptanol, catalizată de lipaza pancreatică, în izooctan.

6.5. Influența concentrației inițiale a substratului

În cazul reacțiilor enzimatică concentrația substratului joacă un rol important. Pe de o parte este avantajos să se lucreze la concentrații de substrat cât mai mari, mai ales în eventualitatea unei transpuneri la scară industrială a procesului, însă pe de altă parte se cunoaște faptul că la creșterea concentrației de substrat peste anumite valori pot să apară fenomene de inhibiție.

Influența concentrației inițiale a acidului asupra reacției de esterificare dintre acidul butiric și n-heptanol în izooctan, catalizată de lipaza pancreatică (Fluka) a fost urmărită la 37°C, de asemenea prin determinarea activității de esterificare după o oră de reacție. Analiza s-a făcut prin cromatografie gaz-lichid utilizând clorbenzenul drept standard intern și calculându-se concentrația esterului format. Concentrația de apă din sistemul de reacție a fost de 0,07 %, provenind din apa conținută în reactanți și enzimă.

S-a ales varianta de modificare concomitentă a concentrațiilor inițiale de acid și alcool pentru a menține raportul de 1:1 între reactanți. Concentrația enzimei a fost în intervalul 0,8-1,5 g/mol, în raport cu substratul. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 6.10.

Tabelul 6.10. Esterificarea acidului butiric cu heptanolul în izooctan, catalizată de lipaza pancreatică, la diferite concentrații inițiale de substrat

Nr. sinteză	Concentrații inițiale de substrat		Conc. lipază g/l	Conc. ester după 1 h g/l	Activitatea de esterificare $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}(\text{lipază})^{-1}$
	Acid mol/l	Heptanol mol/l			
1.	0,05	0,05	3,54	0,382	0,027
2.	0,10	0,10	7,07	1,666	0,063
3.	0,15	0,15	7,61	2,869	0,103
4.	0,20	0,20	7,85	6,456	0,219
5.	0,25	0,25	16,54	5,227	0,084

Se poate observa că activitatea de esterificare crește cu creșterea concentrațiilor inițiale de substrat până la 0,2 moli/l, la care se înregistrează activitatea maximă, după care scade destul de semnificativ. Faptul că s-a lucrat cu cantități diferite de lipază nu influențează rezultatele, deoarece nu s-a făcut calcul cinetic ci s-a exprimat doar activitatea de esterificare raportată la 1 g enzimă.

Reacția de esterificare fiind o reacție cu două substraturi este interesant de văzut care dintre acestea determină inhibarea reacției la creșterea concentrației. Pentru aceasta s-a făcut un studiu în care doar concentrația alcoolului a fost modificată, cea a acidului fiind menținută constantă. De această dată s-a studiat reacția dintre acid hexanoic și 1-pentanol, catalizată de lipază pancreatică purificată (prin extracție la pH 8 și precipitare cu acetona), în izooctan, la 37°C. Concentrația enzimei a fost menținută constantă, fiind de 5 g/l în toate determinările. S-au calculat vitezele inițiale de reacție în modul care a fost descris anterior. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 6.11.

Tabelul 6.11. Esterificarea acidului hexanoic cu 1-pentanolul, catalizată de lipaza pancreatică (preparat purificat), în mediu de izooctan, la diferite concentrații inițiale de alcool

Nr. sint.	Conc. inițiale de substrat		Raport molar alcool/acid	Viteza inițială $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}(\text{lipază})^{-1}$
	Acid hexanoic mol/l	1-Pentanol mol/l		
1.	0,076	0,048	0,63	0,086
2.	0,076	0,072	0,95	0,112
3.	0,076	0,100	1,32	0,158
4.	0,076	0,149	1,96	0,212
5.	0,076	0,241	3,17	0,341

Se observă că în acest caz vitezele de esterificare cresc cu creșterea concentrației inițiale de alcool, fără să apară fenomenul de inhibiție până la o concentrație inițială de alcool de 0,25 moli/l, în condițiile în care raportul molar alcool/acid este de peste 3:1. Așadar inhibiția constatată în cazul precedat de datorește acidului. Acest lucru are o însemnătate destul de mare, deoarece ne arată că se poate lucra cu rapoarte molare alcool/acid destul de mari, dacă condițiile tehnologice permit acest lucru, realizându-se o creștere a vitezei de reacție. În plus, la reacțiile de echilibru cum ar fi transesterificarea (și

chiar esterificarea, în cazul anumitor compuși) utilizarea unui exces de alcool face posibilă și deplasarea reacției în sensul obținerii produsului dorit.

6.6. Concluzii

În urma studiilor efectuate asupra activității catalitice a lipazei pancreatice în reacția de esterificare dintre acizi monocarboxilici și alcooli monohidroxicili s-au constatat următoarele aspecte mai importante:

- Lipaza pancreatică își menține activitatea catalitică în mediu de solvenți organici în condițiile prezenței unei cantități reduse de apă, putând fi utilizată pentru obținerea esterilor menționați cu randamente ridicate.

- Vitezele inițiale de reacție se pot calcula printr-o modalitate simplă utilizând modelul hiperbolic, care dă rezultate foarte apropiate de cele obținute cu relația parametrică a modelului cinetic de ordinul doi.

- Activitatea de esterificare crește liniar cu concentrația enzimei în domeniul 15-35 unități enzimatiche/mmoli substrat, fără să apară fenomenul de saturare a substratului cu enzimă.

- Reacția este favorizată în solvenți organici cu polaritate scăzută, în timp ce în solvenți mai polari sau miscibili cu apa ca acetona sau dioxanul nu are loc sau are loc cu viteză foarte mică. Ținând cont de importanța apei din sistem pentru realizarea interfeței de reacție și de miscibilitatea parțială a acestor solvenți cu apa, se poate presupune că ei realizează o deshidratare a enzimei, ceea ce determină pierderea activității catalitice.

- Esterificarea are loc chiar în prezența unor concentrații foarte mici de apă în sistem: 0,05-0,07%, provenind din materiile prime și enzima introduse în reacție. Viteza reacției crește aproximativ de 2,5 ori în prezența unei concentrații inițiale de apă de 0,3-0,5 %. Apa rezultată din reacție nu influențează nefavorabil reacția de esterificare.

- Activitatea de esterificare crește cu temperatura în intervalul 25-50°C de 1,8 ori, însă această creștere nu este atât de importantă încât să impună neapărat efectuarea reacțiilor la temperaturi ridicate.

- Creșterea concentrației inițiale a alcoolului în domeniul 0,05-0,25 moli/l determină creșterea corespunzătoare a vitezei de reacție, în timp ce creșterea concomitentă a concentrației inițiale a alcoolului și a acidului duce la inhibarea reacției la valori de peste 0,2 moli/l. Se poate trage concluzia că acidul este cel care, la concentrații ce depășesc o anumită limită, are efect inhibitor asupra esterificării enzimaticice.

- Atât preparatele brute cât și cele purificate obținute în laborator au dat rezultate bune, manifestând pentru aceeași reacție activități mai mari decât lipaza comercială (Fluka) pe care am avut-o la dispoziție.

- În condițiile de reacție stabilite pentru reacția de esterificare catalizată de lipaza pancreatică în solvenți organici, se pot obține cu randamente ridicate și în condiții energetice avantajoase o serie de esteri ai acizilor monocarboxilici cu alcooli monohidroxicili, dintre care mulți se folosesc ca și compuși aromatizanți în industria alimentară.

7. Determinarea specificității de substrat a lipazei pancreatice în reacții de esterificare prin metoda cinetică a vitezelor inițiale

După stabilirea condițiilor de reacție în care se poate face esterificarea biocatalitică a acizilor monocarboxilici cu alcoolii monohidroxicoli la fel de importantă este determinarea specificității de substrat a lipazei pancreatice în aceste reacții. În general, lipazele sunt considerate enzime cu o specificitate de substrat foarte largă, ceea ce face ca ele să catalizeze transformarea unui număr mare de substraturi în diverse tipuri de reacție. Determinarea acestei specificități este importantă mai ales pentru a evalua eventuala valoare comercială a unei asemenea tehnologii enzimaticice pentru obținerea unui număr cât mai mare de produși.

Așa cum a rezultat și din studiul documentar efectuat, specificitatea lipazelor a fost determinată pentru diferite reacții de hidroliză și esterificare, dar rezultatele diferă mult în funcție de tipul enzimei și sistemul de reacție utilizat. S-a constatat că pentru hidroliza trigliceridelor acidul butiric este cel mai bun substrat în seria acizilor monocarboxilici cu număr par de atomi de carbon în moleculă, în continuare viteza reacției de hidroliză scăzând ușor cu creșterea lungimii lanțului hidrocarbonat. În cazul reacțiilor în solvenți organici, la esterificarea alcoolului izoamilic s-au obținut conversii mari în cazul acidului butiric, mai scăzute în cazul acidului propionic, iar cu acidul acetic reacția în general nu a avut loc, rezultatele depinzând însă destul de mult de proveniența enzimei [300].

7.1. Specificitatea în raport cu acizii monocarboxilici

Reacțiile de esterificare ale 1-pentanolului cu acizi grași pot avea și importanță preparativă, deoarece o serie din acești esteri sunt compuși folosiți ca aromatizanți (acetatul, butiratul, valerianatul, izovalerianatul) [308].

Condițiile în care s-a făcut reacția de esterificare au fost: temperatura 37°C, solvent izooctanul, cantități echimolare de reactanți, concentrația lipazei (preparat brut sub formă de pudră acetonică) 1,34 g/mol substrat, concentrația inițială a apei în sistem 0,07%.

Urmărirea reacțiilor s-a făcut cinetic timp de 4-6 ore, prin luare de probe la intervale determinate de timp. Analiza acestor probe s-a făcut tot prin cromatografie gaz-lichid, utilizând n-decanul ca standard intern și măsurând scăderea concentrației alcoolului, pe baza căreia s-a calculat conversia în diferite momente ale reacției.

Rezultatele determinărilor sunt trecute în tabelul 7.1.

Tabelul 7.1. Esterificarea unor acizi monocarboxilici cu 1-pentanolul la 37°C în izooctan, în prezența lipazei pancreatice

Nr.	Denumirea acidului	Timp min.	Raport arii A_{al}/A_{st}	Conc.alcool g/l	Conversie în ester
1.	Acid acetic (C2)	360	0,0	0,0	0,0
2.	Acid propionic (C3)	360	0,0	0,0	0,0
3.	Acid butiric (C4)	30	1,440	13,82	0,216
		60	1,139	10,99	0,377
		90	0,866	8,41	0,523
		120	0,635	6,23	0,647

Nr.	Denumirea acidului	Timp min	Raport arii A_{alc}/A_{st}	Conc.alcool g/l	Conversie în ester
3.	Acid butiric (C4)	180	0,390	3,93	0,777
		300	0,213	2,25	0,873
		425	0,167	1,82	0,897
4.	Acid valerianic (C5)	15	1,990	19,02	0,154
		30	1,634	15,42	0,304
		60	1,185	11,19	0,490
		90	0,913	8,62	0,607
		120	0,693	6,54	0,698
		180	0,358	3,38	0,838
		240	0,246	2,32	0,887
		300	0,161	1,52	0,923
5.	Acid izovalerianic (I-C5)	15	1,935	18,26	0,029
		30	1,900	17,94	0,034
		60	1,855	17,51	0,067
		90	1,838	17,35	0,086
		120	1,766	16,67	0,110
		183	1,657	15,64	0,165
		240	1,605	15,15	0,191
		300	1,575	14,87	0,206
		480	1,565	14,77	0,211
6.	Acid capronic (C6)	30	1,596	15,29	0,133
		60	1,646	14,06	0,202
		150	1,255	12,21	0,307
		180	1,122	10,84	0,386
		210	1,014	9,81	0,443
		270	0,832	8,08	0,542
		300	0,745	7,27	0,587
7.	Acid caprilic (C8)	30	1,766	16,90	0,041
		60	1,436	13,78	0,218
		120	1,273	12,25	0,305
		180	1,111	10,72	0,392
		240	0,965	9,35	0,463
		300	0,755	7,36	0,582
		360	0,579	5,70	0,677
8.	Acid pelargonic (C9)	30	1,632	15,64	0,113
		60	1,571	15,06	0,146
		120	1,458	13,99	0,206
		180	1,200	11,56	0,344
		380	0,722	7,05	0,600
		420	0,606	5,96	0,662
		480	0,471	4,68	0,734

Nr.	Denumirea acidului	Timp min	Raport arii A_{alc}/A_{st}	Conc.alcool g/l	Conversie în ester
9.	Acid undecanoic (C11)	30	1,742	16,67	0,054
		120	1,389	13,34	0,243
		180	1,220	11,75	0,333
		240	1,123	10,84	0,385
		300	0,934	9,08	0,485
		360	0,850	8,26	0,531
		420	0,730	7,88	0,553
10.	Acid lauric (C12)	15	1,744	16,70	0,046
		30	1,657	15,88	0,093
		60	1,637	15,69	0,103
		90	1,556	14,93	0,147
		120	1,512	14,51	0,171
		150	1,392	13,38	0,235
		180	1,200	11,58	0,343
		480	0,671	6,57	0,624
11.	Acid miristic (C14)	15	1,798	17,21	0,024
		30	1,741	16,68	0,054
		60	1,627	15,60	0,115
		90	1,533	14,71	0,166
		120	1,412	13,57	0,230
		150	1,335	12,84	0,272
		180	1,236	11,91	0,324
		420	0,915	8,88	0,496
12.	Acid palmitic (C16)	30	1,723	16,48	0,116
		60	1,571	15,06	0,146
		90	1,479	14,19	0,195
		120	1,307	12,57	0,287
		150	1,142	11,01	0,375
		180	1,062	10,26	0,418
		210	0,887	8,61	0,512
		240	0,750	7,31	0,585
13.	Acid stearic (C18)	15	1,576	15,10	0,143
		30	1,468	14,08	0,201
		60	1,345	12,93	0,266
		150	1,016	9,82	0,433
		180	0,852	8,26	0,531
		210	0,780	7,59	0,569
		240	0,608	5,96	0,653
14.	Acid oleic (C18:1)	30	1,712	16,38	0,071
		60	1,505	14,44	0,181
		120	1,297	12,48	0,292
		180	1,130	10,90	0,382
		240	0,994	9,61	0,455

Pentru a putea evalua cantitativ specificitatea lipazei față de acizii monocarboxilici studiați, s-au calculat vitezele inițiale de reacție, prin corelare cu modelul hiperbolic optimizat. Rezultatele au fost trecute în tabelul 7.2, în care mai sunt prezentate și vitezele inițiale relative, raportate la acidul butiric, cât și conversiile în ester după trei ore de reacție.

Tabelul 7.2. Viteze inițiale de reacție la esterificarea 1-pentanolului cu acizi monocarboxilici, catalizată de lipază (pudră acetonică pancreatică) în izooctan la 37°C, la un conținut inițial în apă al sistemului de 0,07%.

Nr.	Denumirea acidului	Coef. de regresie neliniară	Viteza inițială			Conversia (după 3 h)
			$\text{min}^{-1} \cdot 10^3$	$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g (lipază)}^{-1}$	relativă	
1.	Acid acetic	-	0,0	0,0	0,0	0,0
2.	Acid propionic	-	0,0	0,0	0,0	0,0
3.	Acid butiric	0,984	12,17	0,544	1,00	77,7
4.	Acid valerianic	0,991	15,93	0,712	1,30	83,8
5.	Ac. izovalerianic	0,985	1,60	0,071	0,13	16,5
6.	Acid capronic	0,951	3,84	0,171	0,31	38,6
7.	Acid caprilic	0,985	3,90	0,174	0,32	39,2
8.	Acid pelargonic	0,983	3,49	0,157	0,29	34,4
9.	Acid undecanoic	0,998	2,81	0,126	0,23	33,3
10.	Acid lauric	0,990	2,45	0,110	0,20	34,3
11.	Acid miristic	0,998	2,47	0,110	0,20	32,4
12.	Acid palmitic	0,990	3,75	0,168	0,31	41,8
13.	Acid stearic	0,980	6,70	0,299	0,55	53,1
14.	Acid oleic	0,997	3,33	0,149	0,27	38,2

Selectivitatea lipazei pancreatice față de substratul de acid carboxilic, exprimată prin vitezele inițiale relative de esterificare ale unor acizi monocarboxilici cu 1-pentanolul, este reprezentată în figura 7.1.

Se observă că lipaza studiată are o specificitate foarte mare pentru acizii butiric și valerianic, după care activitatea ei scade destul de semnificativ (5-6,5 ori) cu creșterea lungimii catenei hidrocarbonate, până la acidul lauric și miristic. Creșterea în continuare a lungimii catenei determină creșterea vitezei de esterificare la acizii palmitic și stearic.

În cazul acizilor cu catenă scurtă până la C₃, acidul acetic și propionic, reacția nu a avut loc. Se poate presupune că acest fapt se datorește absorbției acidului la suprafața catalizatorului enzimatic, ceea ce duce la inactivarea acestuia în condițiile date. Se pare că acest lucru este specific pentru solvenții organici, pentru că de exemplu la hidroliza în mediu apos a unor esteri acetici, cum ar fi triacetina, se obțin randamente ridicate fără a se observa inhibarea enzimei din cauza acidului acetic rezultat.

De asemenea se poate remarca și specificitatea enzimei studiate pentru compuși cu catenă liniară și saturată. Astfel, viteza de reacție în cazul acidului izovalerianic este de 10 ori mai mică decât pentru acidul valerianic, iar pentru acidul oleic de aproximativ de 2 ori mai mică decât pentru acidul stearic.

Ușoarele neconcordanțe dintre valorile conversiilor după 3 ore și cele ale vitezelor de reacție se datoresc faptului că primele constituie valori experimentale (cu erorile de măsurare inerente), iar vitezele inițiale de reacție sunt cele rezultate în urma calculului cinetic după modelul hiperbolic.

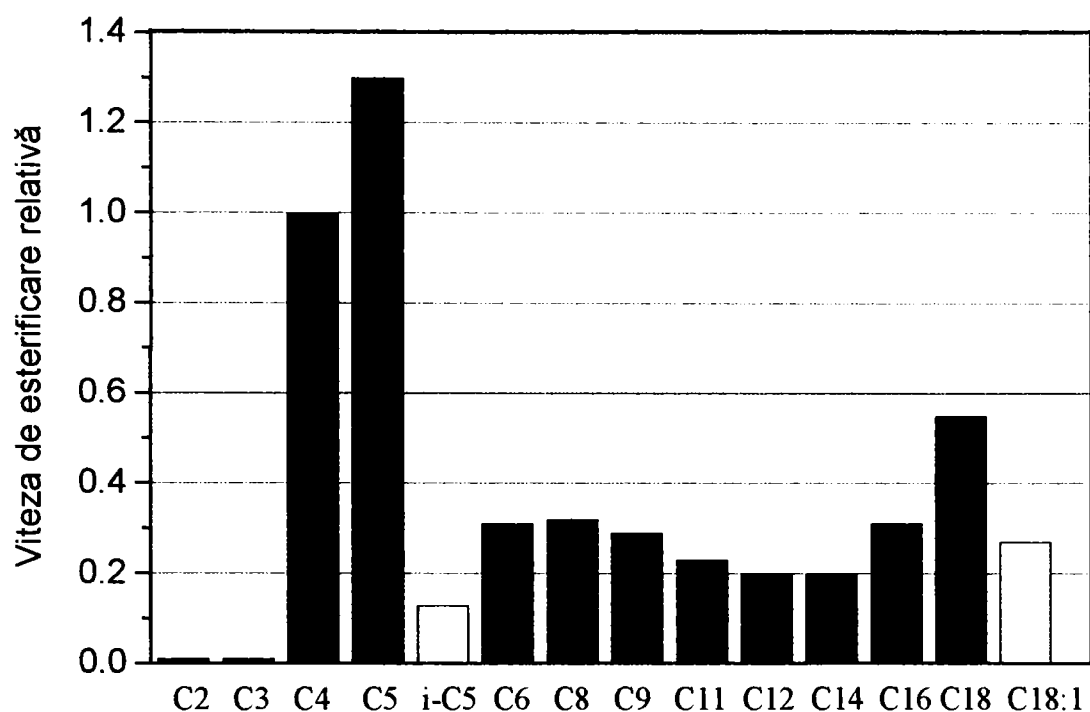


Figura 7.1. Selectivitatea lipazei pancreatice față de lanțul hidrocarbonat al grupării acil, în reacția de esterificare a unor acizi monocarboxilici cu 1-pentanolul.

7.2. Specificitatea în raport cu alcoolii monohidroxilici

A fost studiată reacția de esterificare cu acidul butiric a unor alcooli cu catenă hidrocarbonată de lungime medie, care sunt importanți pentru sinteza unor esteri aromatizanți. În condițiile în care s-a văzut că specificitatea lipazei pentru substratul de acid butiric este mare, s-a lucrat cu lipază Fluka mai puțin activă, pentru a nu înregistra o creștere prea bruscă a conversiei în intervalul studiat, ceea ce ar face ca valorile vitezelor inițiale să fie prea apropiate.

Reacția s-a făcut cu cantități echimolare de reactanți, la 37°C, în izooctan. Concentrația inițială a enzimei în raport cu substratul a fost 1,3 g/ml, iar conținutul inițial de apă al sistemului de 0,07%.

Urmărirea reacției s-a făcut și în acest caz gaz-cromatografic, iar în probele prelevate s-a determinat concentrația alcoolului respectiv, pe baza dreptelor de etalonare ale căror parametri au fost prezentați în tabelul 6.2.

Au fost investigați un număr de 6 alcooli cu catenă medie.

Valorile conversiilor în ester obținute după diferite intervale de timp sunt prezentate în tabelul 7.3.

Tabelul 7.3. Esterificarea acidului butiric cu alcoolii monohidroxilici la 37°C, în izooctan, în prezența lipazei pancreatice (Fluka).

Nr. sint.	Denumirea alcoolului	Timp Min	Raport arii A_{alc}/A_{st}	Conc.alcool g/l	Conversie în ester
1.	1-Butanol ($C_0 = 8,5$ g/l)	30	0,878	7,56	0,110
		60	0,811	7,09	0,165
		90	0,699	6,30	0,259
		120	0,605	5,64	0,336
		180	0,554	5,25	0,382
		240	0,454	4,57	0,462
		300	0,441	4,48	0,472
		360	0,373	4,05	0,523
		420	0,358	3,90	0,541
2.	i-Butanol ($C_0 = 13$ g/l)	30	1,657	12,17	0,064
		60	1,521	11,17	0,141
		120	1,448	10,63	0,182
		150	1,396	10,25	0,211
		180	1,291	9,48	0,271
		240	1,156	8,48	0,347
		3.	1-Pentanol ($C_0 = 17,6$ g/l)	30	1,749
60	1,611			15,43	0,178
90	1,550			14,86	0,218
120	1,508			14,46	0,274
150	1,441			13,83	0,332
180	1,410			13,54	0,350
210	1,302			12,52	0,388
240	1,225			11,79	0,430
4.	1-Hexanol ($C_0 = 16$ g/l)	30	1,778	15,09	0,057
		60	1,665	14,11	0,118
		90	1,618	13,65	0,147
		120	1,374	11,55	0,278
		180	1,270	10,65	0,334
		210	1,169	9,75	0,390
		240	1,037	8,55	0,465
5.	1-Heptanol ($C_0 = 14$ g/l)	30	2,551	12,43	0,112
		60	2,254	11,10	0,207
		90	2,219	10,99	0,218
		180	1,970	9,83	0,298
		210	1,895	9,50	0,321
		240	1,724	8,73	0,376
		600	1,031	5,64	0,597

Nr. sint.	Denumirea alcoolului	Timp Min	Raport arii A_{alc}/A_{st}	Conc.alcool g/l	Conversie în ester
6.	1-Octanol ($C_0 = 21,5$ g/l)	30	2,903	20,55	0,045
		60	2,768	19,55	0,091
		90	2,682	19,93	0,119
		150	2,463	17,35	0,193
		180	2,396	16,86	0,216
		240	2,368	16,64	0,225
		270	2,323	16,33	0,240

Și în acest caz au fost calculate vitezele inițiale de reacție, atât cele absolute cât și cele relative, pentru a putea aprecia mai ușor specificitatea lipazei față de alcoolii studiați. Rezultatele sunt redată în tabelul 7.4 și în figura 7.2

Tabelul 7.4. Viteze inițiale de reacție la esterificarea acidului butiric cu alcooli monohidroxicilici în izooctan la 37°C, catalizată de lipaza pancreatică (Fluka), la un conținut inițial de apă al sistemului de 0,07%

Nr. sint.	Denumirea alcoolului	Coef. de regresie neliniară	Viteza inițială			Conversia (după 3 h) %
			$\text{min}^{-1} \cdot 10^3$	$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}(\text{lipază})^{-1}$	relativă	
1.	1-Butanol	0,995	4,19	0,144	1,00	38,2
2.	i-Butanol	0,978	1,98	0,104	0,72	27,1
3.	1-Pentanol	0,986	2,37	0,142	0,99	35,0
4.	1-Hexanol	0,993	2,88	0,135	0,94	33,4
5.	1-Heptanol	0,973	2,97	0,107	0,74	29,8
6.	1-Octanol	0,990	1,99	0,098	0,68	21,6

Se observă și în acest caz specificitatea enzimei pentru catena cu 4 atomi de carbon, urmată de o ușoară scădere cu creșterea lungimii lanțului hidrocarbonat. Spre deosebire însă de acizii carboxilici, aici valorile obținute pentru vitezele de reacție sunt mult mai apropiate, ceea ce arată faptul că specificitatea lipazei pancreatice se manifestă în mai mare măsură în raport cu natura acidului folosit la esterificare. Se poate constata de asemenea că nu mai apar diferențe mari între alcoolii cu catenă normală și ramificată, deci specificitatea este apropiată pentru alcoolii primari și secundari.

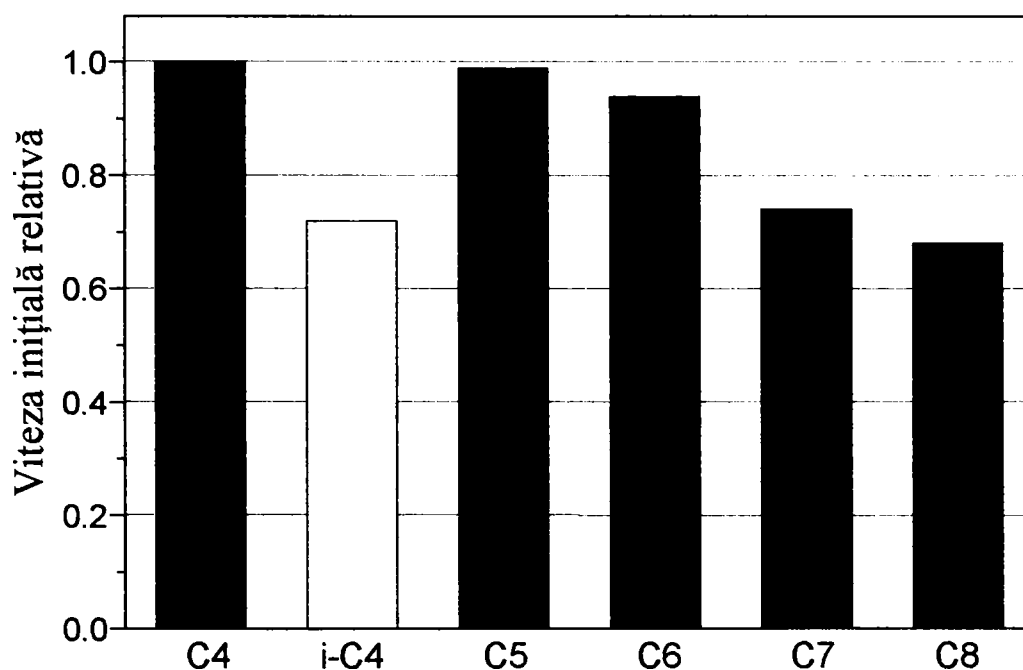


Figura 7.2. Selectivitatea lipazei pancreatice față de lanțul hidrocarbonat al alcoolului, în reacția de esterificare a acidului butiric cu alcooli monohidroxicili

7.3. Concluzii

Specificitatea de substrat determinată prin metoda cinetică a vitezelor inițiale a fost cea mai mare în raport cu acizii carboxilici cu catenă hidrocarbonată scurtă (C_4-C_5), fiind mai redusă în raport cu acizii cu catenă medie C_6-C_{12} (15-20 % din valoarea maximă), pentru a crește din nou în cazul acizilor cu catenă lungă $C_{16}-C_{18}$ (în jur de 50 % din valoarea maximă). Spre deosebire de acizii monocarboxilici, în cazul alcoolilor monohidroxicili specificitatea de substrat determinată prin metoda cinetică este mai redusă, vitezele inițiale fiind puțin dependente de lungimea catenei hidrocarbonate în intervalul C_4-C_8 .

8. Sinteze enzimatică de esteri ai unor alcooli di- și trihidroxilici

8.1. Studiul esterificării glicerinei cu acidul oleic în sistem bifazic [322, 323]

Sinteza esterilor glicerinei a fost studiată prin esterificare directă cu acid oleic. Utilizarea acidului oleic are la bază următoarele considerente:

- specificitatea de substrat a lipazelor față de acidul oleic este bună, așa cum a rezultat din studiul efectuat anterior.

- acidul oleic este lichid la temperaturi între 30-40°C, ceea ce permite realizarea unor emulsii de tip ulei-apă, care nu se pot obține cu acizii grași saturați cu catenă lungă decât la temperaturi peste punctul lor de topire, la care însă lipaza pancreatică se poate denatura termic.

- mono- și dioleații de glicerină reprezintă produse valoroase utilizate drept emulgatori și sinteza lor prin esterificare directă în cataliză enzimatică ar putea fi o posibilitate cu șanse de aplicare.

Întrucât glicerina și acidul oleic sunt nemiscibile, sistemul de reacție folosit a fost bifazic. Se cunoaște că lipazele acționează, atât în sensul hidrolizei cât și în sensul esterificării, în medii eterogene, la suprafața de contact a două faze nemiscibile, cel mai bine la interfața unor emulsii de tip ulei-apă. Utilizarea unor solvenți organici în acest caz nu rezolvă problema omogenității sistemului, întrucât glicerina este insolubilă în solvenții organici nepolari în care activitatea de esterificare a lipazelor este considerabilă, așa cum s-a arătat. O variantă posibilă este utilizarea unor miceli inverse, când solventul este de natură organică, dar rezultatele raportate în literatură pentru obținerea mono- și diesterilor glicerinei prin esterificare directă în asemenea sisteme nu sunt concludente [202]. Din această cauză reacțiile au fost efectuate în emulsii apoase, apa având avantajul de a solubiliza și enzima, însă dezavantajul că influențează nefavorabil echilibrul reacției și limitează conversiile maxime care se pot obține. O posibilitate ar fi eliminarea totală a apei și efectuarea reacției în sistem bifazic glicerină-apă, lipaza fiind dizolvată sau suspendată în glicerină. Asemenea încercări au fost efectuate, așa cum a rezultat și din studiul de literatură, însă cu lipază microbiană immobilizată (Lipozyme) și au dus la obținerea trioleatului de glicerină, produs care nu constituie subiectul acestui studiu [284]. Concentrația apei în sistem rămâne oricum unul din parametrii esențiali ce necesită a fi optimizați.

Emulgatorii care pot fi utilizați pentru realizarea unor sisteme disperse fine cât mai stabile pot fi de proveniențe foarte diferite: naturali, de origine vegetală ca guma arabică sau animală ca albumina din ser de bovină, sintetici de natură anionică (2-etilhexil-sulfosuccinat de sodiu) sau neionică. În studiile noastre am utilizat cu predilecție emulgatori neionici industriali din seria nonilfenolilor etoxilați.

Lipaza folosită a fost lipază pancreatică provenită de la firma ICN Pharmaceuticals (SUA), având o activitate de 0,3 unități/mg, determinată la 37°C utilizând drept substrat trioleina emulsionată. Fiind o lipază 1,3-specifică, ea ar trebui să ducă la obținerea numai a mono- și diesterului, însă în practică rezultă și mici cantități de triester, datorită izomerizării 1-monooleatului în 2-monooleat și respectiv a 1,3-dioleatului în 2,3-trioleat de glicerină. S-a lucrat în general cu exces de glicerină, raportul glicerină/acid oleic fiind de asemenea unul din parametrii studiați.

Reactivii folosiți au fost de proveniență comercială, fiind utilizați în condiții de puritate analitică (p.a.) asigurate de firma producătoare, astfel: glicerină anhidră (Chimopar S.A.), albumină din ser de bovină (Reanal, Ungaria), nonilfenoli etoxilați Dowfax (Dow Chemical Co., SUA), acid oleic (Merck, Germania), trioleină (Loba Feinchemie, Austria).

Reacția de esterificare a fost efectuată într-un reactor de sticlă cu capacitatea de 300 cm³, prevăzut cu agitare mecanică și introdus într-o baie de apă termostată. S-a utilizat o

turație ridicată, de 600 rotații/minut, pentru a realiza o emulsionare cât mai bună a substratului.

În reactor s-au introdus cantitățile stabilite de glicerină și acid oleic. Emulgatorul s-a dizolvat în 5 ml apă distilată și s-a introdus de asemenea în reactor, după pornirea agitării. S-a lăsat 15 minute sub agitare pentru emulsionare și termostatare la temperatura de reacție (37°C).

Lipaza a fost cântărită și suspendată într-un volum calculat de apă, corespunzător diferenței până la volumul total de apă preconizat a se introduce în sistem, ținând cont și de apa introdusă cu emulgatorul. Lipaza pancreatică nu a fost complet solubilă în apă, nefiind un preparat cu grad înalt de purificare. Momentul introducerii suspensiei de lipază în sistemul de reacție a fost considerat momentul zero al reacției.

Desfășurarea reacției a fost urmărită prin scăderea acidității masei de reacție. În acest scop au fost prelevate probe de 1-2 ml cu o pipetă, la intervale de timp determinate, în general din oră în oră. Aceste probe au fost cântărite și dizolvate în alcool etilic. S-a determinat conținutul de acid din probă, prin titrare potențiomtrică cu soluție de NaOH 0,1 M. Deoarece singura specie acidă prezentă în amestecul de reacție este acidul oleic, scăderea acidității reprezintă o măsură a evoluției reacției de esterificare și permite, prin raportare la aciditatea inițială, calculul conversiei de acid oleic în diferite momente ale reacției, conform relației:

$$c = \frac{A_0 - A_t}{A_0}$$

unde A_0 reprezintă aciditatea inițială a amestecului de reacție în moli acid oleic/g, iar A_t reprezintă aciditatea amestecului de reacție la timpul t , în moli acid oleic/g

Timpul de reacție a fost în general 72 de ore, în condițiile în care s-a urmărit numai determinarea vitezei inițiale. Pentru determinarea conversiei de echilibru și stabilirea modelului cinetic unele sinteze au fost urmărite până la 250 de ore. La terminarea reacției, în condițiile stabilirii echilibrului, faza organică a fost extrasă cu eter etilic de trei ori. După separarea fazelor și reunirea extractelor eterice, acestea au fost evaporate pe baia de apă pentru îndepărtarea eterului și apoi la 70°C sub vid pentru îndepărtarea apei, obținându-se produsul de reacție ce conține și acidul oleic nereacționat. Acest produs a fost analizat prin cromatografie și spectrofotometrie în infraroșu.

Un exemplu de rețetă de lucru, utilizată pentru sistemul de reacție pe baza căruia s-au calculat și parametrii cinetici prezentați în capitolul 5.2.3, este următorul:

- 30,3 g acid oleic (0,107 moli)
- 90,18 g glicerină (0,99 moli)
- lipază pancreatică 1,990 g, suspensie în 15 ml apă distilată
- albumină serică la bovină, 4 ml soluție 0,14% în apă distilată.

Reacția a fost urmărită timp de 250 de ore pentru a ajunge la conversia de echilibru. Analiza produsului final de reacție s-a efectuat prin cromatografie de lichide de înaltă performanță prin permeație pe gel și spectrofotometrie în infraroșu.

Analiza HPGPC s-a efectuat cu ajutorul a două coloane de permeație pe gel legate în serie: Ultrahydrogel 500 de 10 μm și Ultrahydrogel 250 de 6 μm , ambele cu dimensiunile de 7,8 x 300 mm (Waters Millipore). S-a utilizat un cromatograf Waters Millipore 510, echipat cu un detector de indice de refracție LKB 2142, iar ca eluent tetrahidrofuran cu debitul de 1 ml/min. Ordinea de eluție a fost: trioleat de glicerină, 1,3-dioleat de glicerină, 1-monooleat de glicerină și acid oleic. Dintre acești compuși, doar pentru trioleatul de glicerină (Loba Feinchemie) și pentru acidul oleic (Merck) am dispus de standarde, așadar calculul cantitativ al acestora s-a făcut pe baza fracțiunilor din aria totală (bazat pe faptul

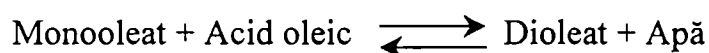
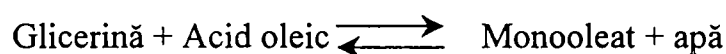
că indicii de refracție sunt apropiați, 1,46419 pentru dioleină și 1,46384 pentru monooleină la 25°C [312], deci și factorii de răspuns ai detectorului trebuie să aibă valori apropiate). Compoziția produsului, determinată în aceste condiții, a fost:

- Monooleat de glicerină: 31,2 %
- Dioleat de glicerină: 27,5 %
- Trioleat de glicerină: 3,8 %
- Acid oleic: 37,5 %

Prin spectrofotometrie în infraroșu au fost identificate toate benzile caracteristice monooleatului și dioleatului de glicerină, fără a se putea face însă estimări asupra raportului dintre ele.

8.1.1. Calculul vitezelor inițiale

Din reacție rezultă monooleat și dioleat de glicerină, conform reacțiilor:



Cinetica acestor reacții se poate modela cu ajutorul relației (5.17) care permite calculul vitezelor inițiale și a constantelor de viteză, așa cum s-a arătat în capitolul 5.2.3. O altă posibilitate este calculul vitezei inițiale utilizând modelul hiperbolic. Aceste metode de calcul duc la rezultate în bună concordanță cu cele experimentale și reprezintă o modelare acceptabilă a procesului, însă au dezavantajul că pentru utilizarea lor este necesară atingerea unor conversii apropiate de cea de echilibru și în cazul nostru viteza de reacție fiind mică, timpul necesar pentru aceasta este foarte îndelungat.

O altă problemă este că utilizarea acestor modele ținând cont numai de punctele experimentale din primele 8-10 ore de reacție duce la erori mari, în cazurile în care reacția, din diverse motive, nu poate ajunge la conversii apropiate de cele de echilibru, de 62-63%. În aceste condiții, am căutat o variantă mai simplă de determinare a vitezei inițiale de reacție, pentru a putea determina influența diferiților parametri asupra procesului de esterificare enzimatică a glicerinei. Această determinare s-a bazat pe observația că creșterea conversiei în timp în primele ore ale reacției este aproximativ liniară și panta acestei drepte dă o valoare a vitezei inițiale destul de apropiată de cea a tangentei la curba cinetică reală. În cazul sistemului de reacție pentru care a fost dată rețeta de lucru, valorile conversiilor acidului oleic, calculate pe baza acidității probelor prelevate din amestecul de reacție, au fost prezentate în capitolul 5.2.3 de calcul cinetic (tabelul 5.3). Reprezentarea liniară pentru primele 7 puncte din tabelul 5.3 este prezentată în figura 8.1.

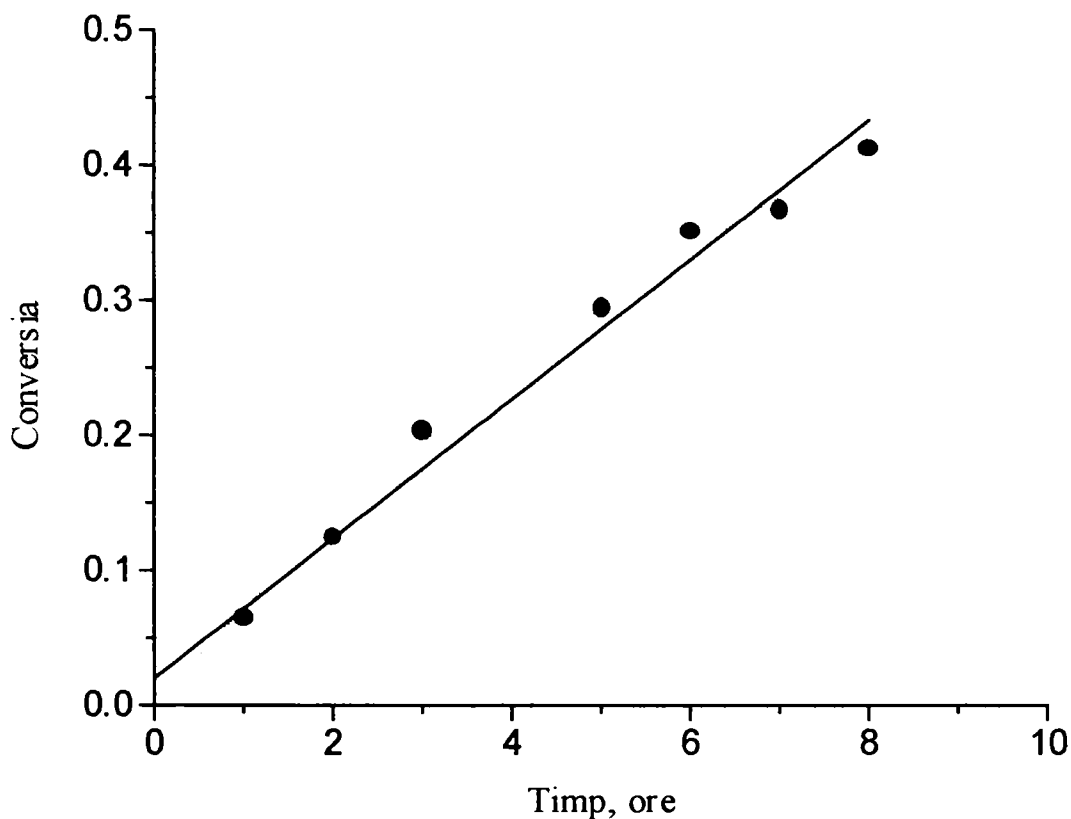


Figura 8.1. Determinarea vitezei inițiale prin corelarea liniară a valorilor conversiilor de acid oleic din primele 8 ore de reacție (linia punctată reprezintă curba de corelare conform ecuației 5.17)

Ecuația acestei drepte, determinată prin corelare liniară, este:

$$y = 0,021 + 0,0517 x \quad , \text{ unde } y \text{ reprezintă conversia iar } x \text{ timpul}$$

Coeficientul de corelare liniară este $r = 0,991$

Așadar valoarea vitezei inițiale de reacție va fi:

$v_i = 0,0517 \text{ h}^{-1}$, sau exprimat ca număr de moli de acid oleic transformați într-un litru de amestec de reacție de 1 g enzimă într-o oră:

$$v_i = 0,022 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g lipază}^{-1}$$

Această valoare este cu aproape 50 % mai mică decât cea calculată din derivata ecuației (5.17), însă am considerat că valorile absolute au în acest caz mai puțină importanță, deoarece ne-a interesat caracterizarea dependenței vitezei de reacție de diverși parametri și alura acestei dependențe este aceeași, indiferent de metoda folosită pentru calculul vitezei inițiale. De fapt, acest studiu nu urmărește investigarea cineticii propriu-zise a reacției și utilizarea vitezei inițiale s-a făcut doar pentru a avea o măsură cantitativă mai exactă a activității enzimei. Așa cum s-a arătat, utilizarea vitezei inițiale în acest scop este mai precisă decât evaluarea activității pe baza cantității de substrat transformate după un anumit timp, întrucât se bazează pe evoluția reacției într-un interval de timp ales și având ca bază de calcul mai multe puncte. Deoarece pe de altă parte valorile vitezei inițiale

determinate au fost niște valori globale bazate pe conversia acidului oleic și fără a lua în considerare faptul că în realitate acest acid reacționează cu două molecule diferite (glicerină și monooleat de glicerină), aceste viteze vor reprezenta de fapt viteze inițiale aparente de reacție.

8.1.2. Studiul parametrilor care influențează reacția de esterificare a glicerinei cu acid oleic

Dintre parametrii care influențează reacția au fost studiați natura și concentrația emulgatorului, raportul molar al reactanților și concentrația apei în sistemul de reacție.

Condițiile de reacție au fost la toate determinările aceleași: temperatură de 37°C, agitare la turație de 600 rotații/minut, iar concentrația de enzimă, raportată la substratul limitativ (acidul oleic) a fost de asemenea menținută constantă.

8.1.2.1. Dependența vitezei inițiale aparente de esterificare de natura emulgatorului

Au fost testați o serie de emulgatori din categoria nonilfenolilor etoxilați, cu diferite grade de etoxilare. Pentru comparație s-a utilizat albumina serică de bovină, ale cărei proprietăți emulgatoare sunt binecunoscute.

Valorile determinate pentru vitezele inițiale de reacție sunt prezentate în tabelul 8.1. Esterificările au fost făcute cu un raport molar glicerină/acid oleic de 6/1, concentrația emulgatorului față de acidul oleic fiind 0,05%. Cantitatea de lipază utilizată drept catalizator a fost în toate cazurile 1,25 g (ceea ce corespunde la aproximativ 2200 unități enzimatică pentru un mol de acid), iar concentrația apei în sistem a fost în jur de 11,5% (ceea ce corespunde la un raport molar apă/acid oleic de 5,3/1). Pentru comparație a fost efectuată și o sinteză fără emulgator.

Tabelul 8.1. Dependența vitezei inițiale de esterificare a acidului oleic (1,2 moli/l) cu glicerina (7,2 moli/l), în prezența lipazei pancreatice (10,4 g/l) de natura emulgatorului utilizat

Nr. sinteză	Tipul emulgatorului	Viteza inițială aparentă de reacție	
		h ⁻¹	mmoli·l ⁻¹ ·h ⁻¹ ·g lipază ⁻¹
1.	-	0,0155	14,5
2.	Albumină	0,0232	21,9
3.	Dowfax 9N 4	0,0252	23,8
4.	Dowfax 9N 6	0,0215	20,3
5.	Dowfax 9N 10	0,0208	19,6
6.	Dowfax 9N 15	0,0183	17,3

Din datele tabelului 8.1 se pot trage următoarele concluzii:

- reacția de esterificare dintre glicerină și acid oleic catalizată de lipază are loc cu o viteză destul de mare și în absența emulgatorului, dispersia corespunzătoare a mediului de reacție fiind asigurată probabil de proprietățile emulgatoare ale acidului oleic;
- în prezența emulgatorilor testați, viteza inițială de reacție a crescut cu 20-60%;
- nu se înregistrează deosebiri semnificative între emulgatorul natural (albumina din ser de bovină) și cei sintetici industriali (nonilfenolii etoxilați);

- viteza inițială de reacție scade cu creșterea gradului de etoxilare, deci cu creșterea lungimii catenei polioxietilenice, însă această scădere nu este semnificativă. Din acest motiv, pentru a studia efectul concentrației de emulgator asupra reacției de esterificare am ales Dowfax 9N 10, care este cel mai uzual dintre emulgatorii industriali de acest tip.

8.1.2.2. Dependența vitezei inițiale aparente de esterificare de concentrația emulgatorului

S-a studiat efectul introducerii în sistemul de reacție a unor concentrații crescânde de emulgator Dowfax 9N 10 asupra vitezei inițiale aparente de esterificare. Așa cum se poate constata din datele tabelului 8.2 și din figura 8.2, cele mai bune rezultate s-au obținut pentru concentrații de emulgator între 0,05-0,15 % (procente de masă, raportat la acidul oleic), când s-a înregistrat o creștere a vitezei de reacție cu aproape 40 %. La creșterea acestei concentrații peste 0,5 % efectul favorabil dispare, viteza inițială aparentă fiind aceeași ca în absența emulgatorului.

Tabelul 8.2. Dependența vitezei inițiale de esterificare a acidului oleic (1,2 moli/l) cu glicerina (7,2 moli/l), în prezența lipazei pancreatice (10,4 g/l) de concentrația emulgatorului.

Nr. sinteză	Concentrație emulgator Dowfax 9N 10, % *	Viteza inițială aparentă de reacție	
		h^{-1}	$mmoli \cdot l^{-1} \cdot h^{-1} \cdot g \text{ lipază}^{-1}$
1.	-	0,0155	14,5
2.	0,031	0,0188	17,9
3.	0,056	0,0208	19,6
4.	0,120	0,0210	19,8
5.	0,234	0,0179	16,9
6.	0,326	0,0156	14,6

*masă, raportat la acidul oleic

Această influență a concentrației de emulgator este probabil legată de fenomenele care au loc la interfața ulei-apă. Este posibil ca o concentrație prea mare de emulgator să împiedice de la un moment dat accesul sau orientarea corespunzătoare a enzimei la această interfață și astfel să contrabalanseze efectul favorabil produs de creșterea acestei interfețe datorită acțiunii de emulsifiere.

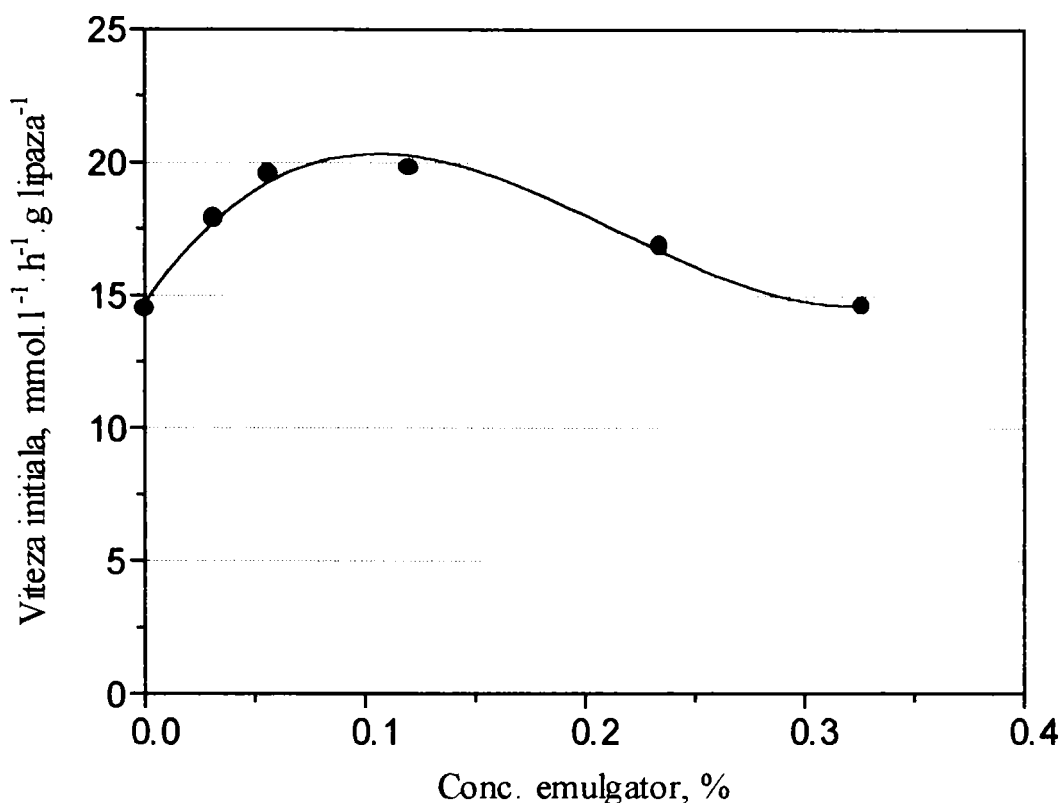


Figura 8.2. Graficul dependenței vitezei inițiale aparente de esterificare de concentrația emulgatorului Dowfax 9N 10.

8.1.2.3. Dependența vitezei inițiale aparente de esterificare de raportul molar al reactanților

Reacția de esterificare este favorizată din punct de vedere termodinamic de utilizarea unui exces al unuia dintre reactanți, cu condiția ca să nu apară fenomenul de inhibiție de substrat. Dintre reactanții acestui sistem este de preferat utilizarea unui exces de glicerină, deoarece cantitatea rămasă nereacționată se poate separa ușor la terminarea reacției prin extracția produșilor cu eter etilic în care glicerina nu este solubilă.

Pentru acest studiu, raportul molar glicerină-acid oleic a fost modificat de la 1:1 până la 9:1 în condițiile în care masa totală a amestecului de reacție a fost menținută la aceeași valoare (aproximativ 140 g). Aceasta a însemnat că au fost modificate în mod corespunzător cantitățile de apă și lipază, pentru a menține constante rapoartele față de reactantul limitativ, acidul oleic. Drept emulgator s-a utilizat și în acest caz Dowfax 9N 10, în concentrație de 0,05 % față de acidul oleic.

Viteza inițială aparentă de reacție crește cu creșterea raportului molar dintre glicerină și acidul oleic până la o limită, așa cum arată rezultatele prezentate în tabelul 8.3 și figura 8.3 .

Tabelul 8.3. Dependența vitezei inițiale de esterificare a acidului oleic cu glicerina de raportul molar al reactanților, în prezența lipazei pancreatice (2200 unități/mol acid oleic), la raport molar apă/acid oleic 5,3:1.

Nr. sinteză	Raport molar Glicerină/acid oleic	Viteza inițială aparentă de reacție	
		h^{-1}	$mmol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1} \cdot g \text{ lipază}^{-1}$
1.	1,01:1	0,0063	3,3
2.	2,03:1	0,0156	7,9
3.	2,96:1	0,0287	16,9
4.	5,99:1	0,0208	19,6
5.	9,05:1	0,0125	12,9

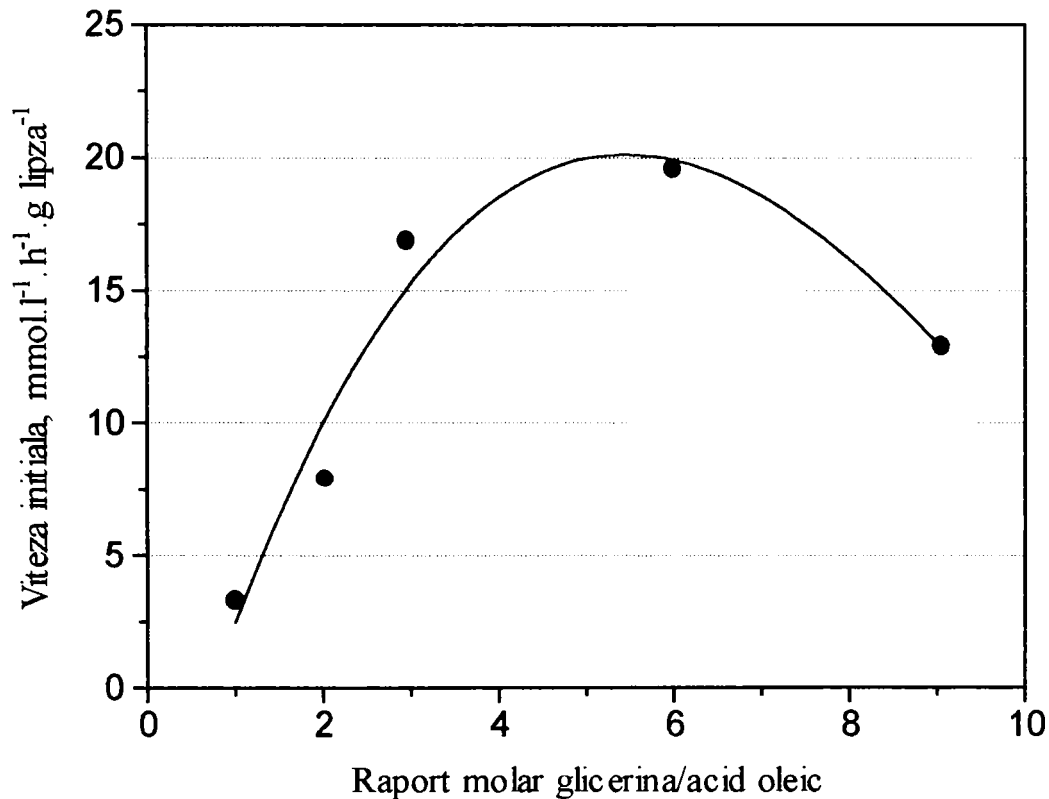


Figura 8.3. Graficul dependenței vitezei de esterificare de raportul molar al reactanților

Ținând cont de faptul că lipaza pancreatică este o enzimă 1,3-selectivă, raportul molar stoechiometric ar fi de 2:1, pentru obținerea diesterului. Se poate constata că cele mai bune rezultate s-au obținut la un raport 6:1, ceea ce înseamnă un exces de glicerină de trei ori mai mare. Explicația este legată de influența favorabilă a acestui exces asupra echilibrului termodinamic al reacției. Concentrații prea mari de glicerină au însă un efect inhibitor asupra enzimei.

8.1.2.4. Dependența vitezei inițiale aparente de esterificare de raportul molar apă/acid oleic

Prezența apei în sistemul de reacție are mai multe rațiuni. În primul rând, așa cum s-a arătat, ea este necesară pentru solvatarea enzimei și realizarea conformației catalitice active a acesteia. În al doilea rând, în absența apei vâscozitatea sistemului este prea ridicată și pot apărea efecte nefavorabile asupra reacției, datorate unui transfer de masă necorespunzător. Deoarece alături de aceste efecte favorabile apare inevitabil și cel de deplasare a echilibrului reacției în direcția hidrolizei, rezultă că este necesară determinarea conținutului de apă optim. Pentru acest studiu, raportul molar glicerină: acid oleic a fost menținut la valoarea optimă determinată anterior, ca emulgator s-a utilizat Dowfax 9N 10 în concentrație 0,05 % față de acidul oleic, iar cantitatea de enzimă introdusă raportată la acidul oleic a fost menținută constantă. Valorile obținute pentru viteza inițială aparentă de esterificare în condițiile modificării conținutului de apă al sistemului de reacție sunt prezentate în tabelul 8.4.

Tabelul 8.4. Dependența vitezei inițiale de esterificare a acidului oleic (1,2 mol/l) cu glicerina (7,2 mol/l în prezența lipazei pancreatice (2200 unități/mol acid oleic) de raportul molar apă/acid oleic.

Nr. sinteză	Raport molar Apă/acid oleic	Viteza inițială aparentă de reacție		Conversie* %
		h^{-1}	$mmol \cdot l^{-1} \cdot h^{-1} \cdot g \text{ lipază}^{-1}$	
1.	0,78:1	0,0	0,0	-
2.	2,29:1	0,0	0,0	-
3.	3,87:1	0,0178	17,3	55,9
4.	5,30:1	0,0208	19,6	62,2
5.	6,95:1	0,0228	21,2	53,4
6.	7,35:1	0,0211	19,3	49,1
7.	9,14:1	0,0125	11,5	41,4

*conversia acidului oleic, calculată după 120 h de reacție

Reacția nu are loc în absența unei concentrații minime de apă în sistem. Această concentrație este relativ mică, reprezentând 7,6 % din masa totală a amestecului de reacție în cazul unui raport molar apă/acid oleic de 3,87:1. Valorile maxime ale vitezei inițiale aparente de esterificare se obțin pentru rapoarte molare cuprinse în intervalul 5÷7, ceea ce corespunde unui conținut de apă inițial între 10-14 %. În tabelul 8.4 au fost trecute și valorile conversiilor acidului oleic după 5 zile de reacție. Se poate observa că aceste conversii cresc în primă instanță odată cu creșterea conținutului de apă, probabil datorită vitezei mai mari de reacție corelate cu un transfer de masă mai bun, facilitat de vâscozitatea mai mică a sistemului de reacție și solvatarea parțială a produsului primar de reacție, monoesterul, în faza apoasă polară. Acest lucru face ca să se ajungă la conversii apropiate de cea de echilibru în timpul în care s-a făcut urmărirea reacției. În continuare se observă scăderea acestei conversii, datorită scăderii activității enzimei.

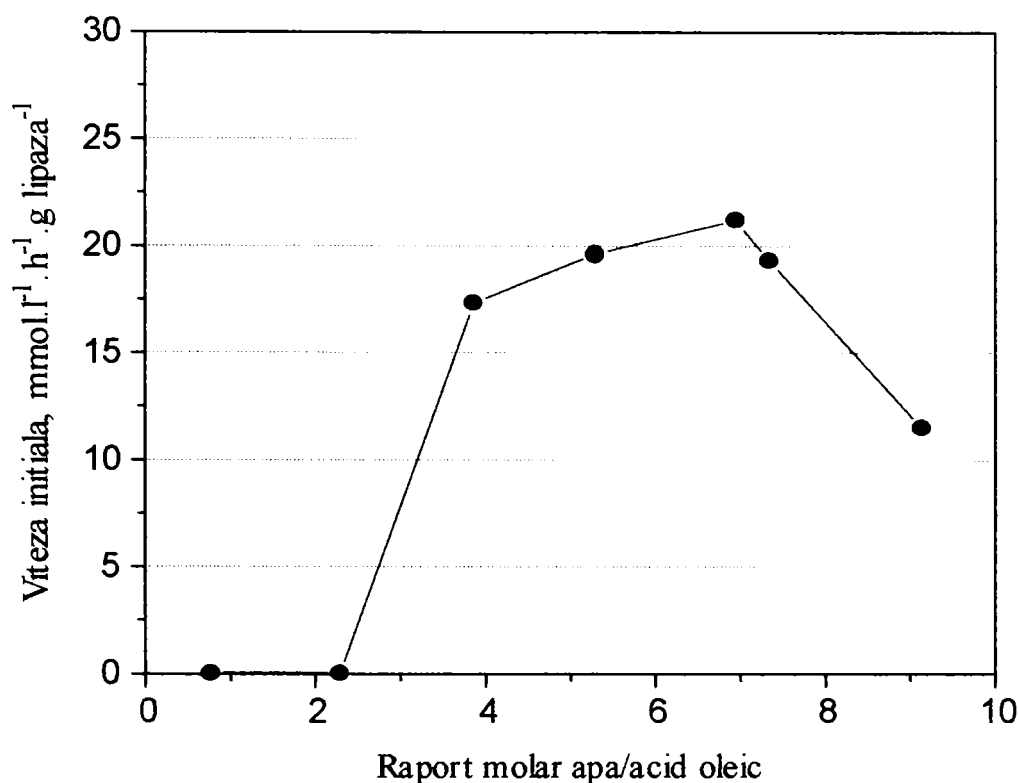


Figura 8.4. Graficul dependenței vitezei de esterificare de raportul molar apă/acid oleic

8.1.2.5. Discuții și concluzii

În ultimii ani, obținerea gliceridelor parțiale prin reacții catalizate de enzime a fost foarte mult investigată, în trei variante posibile: hidroliză, esterificare și transesterificare (gliceroliză). În ce privește obținerea oleaților de glicerină prin reacții de esterificare, conversiile și selectivitățile obținute au fost foarte diferite, în funcție de natura lipazei, sistemul de reacție și alți parametri. Astfel, cu lipază din *Mucor miehei* s-a obținut un conținut de monogliceridă de maxim 32 % la o conversie de 80 %, iar cu lipază din *Rhizopus arrhizus* s-a obținut un randament în monogliceridă între 17,9-44,1 % [313].

Cunoașterea echilibrelor de reacție este importantă mai ales în cazul sistemelor în care rezultă mai mulți produși. Pentru sistemul de reacție dat, se pot scrie următoarele expresii ale constantelor de echilibru pentru formarea monoestrului, diesterului și triesterului, cu mențiunea că formarea triesterului în acest caz nu are loc conform acestui echilibru, fiind împiedicată de lipsa de specificitate a lipazei pentru poziția 2 a glicerinei:

$$K_M = \frac{a_M \cdot a_{H_2O}}{a_G \cdot a_A}$$

$$K_D = \frac{a_D \cdot a_{H_2O}}{a_M \cdot a_A}$$

$$K_T = \frac{a_T \cdot a_{H_2O}}{a_D \cdot a_A}$$

unde indicii M, D, T, G și A semnifică activitățile termodinamice ale monoesterului, diesterului, triesterului, glicerinei și acidului oleic în faza organică.

Constantele de echilbru pentru formarea monoesterului și diesterului și deci compoziția produsului la atingerea echilibrului de reacție depind de coeficienții de activitate ai componentelor. Așa cum se cunoaște, activitatea unei componente i se poate exprima prin produsul:

$$a_i = x_i \cdot \gamma_i$$

unde x_i reprezintă fracția molară a componentei, iar γ_i coeficientul de activitate. Înlocuind în expresia constantei de echilibru vom obține, de exemplu pentru monoester:

$$K_M = \frac{x_M}{x_G \cdot x_A} \cdot a_{H_2O} \cdot \frac{\gamma_M}{\gamma_G \cdot \gamma_A}$$

Dacă se ține seama de faptul sistemul de reacție este bifazic, toate componentele fiind distribuite în ambele faze în conformitate cu coeficienții lor de repartiție, rezultă că și expresia constantei de echilibru va trebui să fie funcție de coeficienții de activitate în cele două faze. O asemenea relație a fost dedusă de Straathof ș.a. [314] pentru constanta aparentă de echilibru în sisteme de reacție nediluate (cum sunt majoritatea sistemelor reale) bifazice. Această relație poate fi scrisă pentru constanta aparentă bifazică de echilibru a monooleatului în forma următoare:

$$K_M^{ap} = \frac{[M]}{[G] \cdot [A]} \cdot a_{H_2O} \cdot \frac{\left(\frac{1}{(\gamma_M)_a} + \frac{\alpha}{(\gamma_M)_o} \right) \cdot (1 + \alpha)}{\left(\frac{1}{(\gamma_G)_a} + \frac{\alpha}{(\gamma_G)_o} \right) \cdot \left(\frac{1}{(\gamma_A)_a} + \frac{\alpha}{(\gamma_A)_o} \right)}$$

unde [M], [G] și [A] reprezintă concentrațiile molare ale monooleatului, glicerinei și acidului oleic la echilibru, indicii a și o de la coeficienții de activitate γ semnifică valorile acestora în faza apoasă respectiv organică, iar α este raportul volumelor fazelor organică și apoasă.

Această ecuație ne arată că există mai multe posibilități pentru creșterea valorii constantei de echilibru și deci a conținutului în monoester al produsului: utilizarea în exces al unuia din reactanți, reducerea activității termodinamice a apei sau modificarea coeficienților de activitate în cele două faze. Valorile acestor coeficienți de activitate reflectă interacțiunile moleculare dintre componentele sistemului și depind de compoziția sistemului de reacție.

Excesul de glicerină influențează favorabil atât viteza de reacție cât și conținutul de monogliceridă din produs la echilibru. Ținând cont de durata destul de mare a reacției, pot avea loc și reacții de gliceroliză a dioleatului și trioleatului prezente în amestecul de reacție, cu formare de mono- și respectiv dioleat. Aceste reacții sunt de asemenea catalizate de lipază. Influența favorabilă a excesului de glicerină asupra conversiei în reacția de

esterificare a acidului oleic cu glicerina catalizată de lipază este confirmată și de datele altor cercetători, pentru lipaze de origine microbiană. De asemenea, s-a demonstrat că la utilizarea unor rapoarte molare mai mici, produsul obținut conține o fracțiune mai mare de diester [315].

Evident că deplasarea echilibrului în direcția esterificării prin reducerea conținutului de apă ar fi benefică pentru obținerea unor conversii de echilibru mai mari. Din păcate, această deplasare a echilibrului este mai complicată decât pare la prima vedere, deoarece conținutul scăzut de apă nu este o condiție suficientă pentru a obține produsul de sinteză cu randament mare. Pentru a înțelege această influență a apei este mai convenabil să se utilizeze activitatea termodinamică și nu concentrația. În sisteme bifazice, toate componentele sunt repartizate între cele două faze și la echilibru activitățile termodinamice pentru fiecare componentă în faza organică sunt egale cu cele în faza apoasă. În soluții apoase diluate, activitatea apei este foarte apropiată de 1. Din ecuația constantei de echilibru se poate observa ușor că pentru a realiza o creștere a randamentului în produsul respectiv la echilibru, în condițiile în care concentrațiile inițiale ale materiilor prime sunt stabilite la o anumită valoare, este necesar ca activitatea apei să fie mult mai mică decât 1. Acest lucru nu se poate realiza însă prin simpla reducere a conținutului de apă din sistem ci doar prin reducerea concentrației apei în faza organică sub valoarea de saturație, deoarece se cunoaște că orice lichid organic saturat cu apă are valoarea activității apei egală cu 1, chiar dacă concentrația efectivă apei este mai mică decât 0,01 % [316]. Deci un conținut scăzut de apă în sistem nu înseamnă neapărat și o valoare subunitară a activității termodinamice a apei. În literatura de specialitate sunt propuse metode pentru reducerea activității apei, cum ar fi îndepărtarea progresivă apei din sistem sub vid sau adăugarea de site moleculare în amestecul de reacție [313]. Aceste metode nu sunt aplicabile însă în cazul sistemului nostru deoarece, așa cum au arătat rezultatele experimentale, reacția nu are loc în absența unei concentrații minime de apă.

Acest studiu a urmărit determinarea condițiilor optime de sinteză pentru esterificarea acidului oleic cu glicerina, catalizată de lipaza pancreatică, în sistem bifazic emulsionat. Pentru exprimarea cantitativă a activității de esterificare s-au determinat vitezele inițiale aparente de reacție. S-a urmărit nu atât obținerea unui produs foarte bogat în monoester, cât a unei compoziții care să se încadreze în limitele stabilite pentru emulgatorii pe bază de gliceride.

Mono- și digliceridele acizilor grași sunt utilizați pe scară largă drept emulgatori în industria alimentară, cosmetică și farmaceutică. Amestecurile ce conțin între 40-48 % monogliceride, 30-40 % digliceride, 5-10 % trigliceride, 0,2-9 % acizi grași liberi și 4-8 % glicerină sunt cunoscute sub denumirea tehnică de monogliceride. În ce privește utilizarea ca aditiv alimentar (codul E.E.C. este E471), normele impuse de Organizația Mondială a Sănătății sunt [317]:

- conținut în mono- și digliceride de cel puțin 70 % (greutate);
- conținutul în monogliceride nu poate fi mai scăzut de 30 % (greutate);
- conținutul în acizi grași, glicerină și trigliceride nu poate depăși 3, 7 și respectiv 10 %.

Pentru unele aplicații, de exemplu în patiserie, este necesară utilizarea monogliceridelor în formă mai pură (90-97 %), ceea ce se face prin distilarea moleculară a amestecurilor menționate [318].

Așa cum a arătat analiza produsului de reacție, acesta este constituit din fracțiuni apropiate de monoester și diester și doar puțin triester, format ca urmare a izomerizării unei mici cantități de 1,3-dioleat în 1,2-dioleat, acesta putând fi esterificat mai departe la trioleat.

Pe baza ecuației constantei de echilibru a monogliceridei în sistem bifazic rezultă că, în condițiile în care ceilalți parametri ai procesului sunt stabiliți, raportul dintre monooleat și dioleat ar putea fi reglat prin modificarea compoziției sistemului de reacție, care să determine modificarea coeficienților de activitate. Acest lucru ar fi posibil prin introducerea unui solvent organic în sistem. Probabil că un solvent cu polaritate mai mare ar favoriza obținerea preferențială a monoesterului, pentru că acesta având polaritatea cea mai mare dintre produși ar fi solvatat cel mai bine. O asemenea favorizare este însă și ea limitată, deoarece s-a constatat că la concentrații mari de monoester, acesta devine un substrat pentru lipază mai bun decât glicerina [319].

Obținerea unei fracțiuni cât mai mari de monoester în cadrul produsului nu a constituit scopul primordial al acestei cercetări, ci doar încadrarea compoziției produsului în limitele stabilite pentru emulgatorii alimentari, ceea ce s-a realizat fără probleme, dacă facem abstracție de acidul oleic nereacționat. Îndepărtarea acestuia se poate face fără probleme deosebite prin extracție alcalină [320]. Este posibilă evident și separarea monooleatului și dioleatului (dacă este cazul) din produs prin distilare moleculară, așa cum se face în cazul produșilor obținuți prin sinteză chimică. O alternativă interesantă și simplă a fost sugerată recent de Edmundo ș.a. [321]. Ei au constatat că prin trecerea unui amestec de monooleat de glicerină, dioleat de glicerină și acid oleic peste o coloană umplută cu silicagel uscat, monooleatul a fost reținut în totalitate, în timp ce ceilalți compuși nu au fost reținuți.

Concluziile acestor cercetări sunt:

- Prezența emulgatorilor determină creșterea activității catalitice a enzimei cu până la 36 %, deși reacția are loc în condiții relativ bune și în absența emulgatorului, datorită proprietăților de emulsifiere ale componentelor sistemului de reacție.

- Nu apar diferențe semnificative între emulgatorii din diferite clase, ceea ce face posibilă utilizarea unor emulgatori industriali din clasa nonilfenolilor etoxilați. Concentrația optimă de emulgator (determinată pentru Dowfax 9N 10) s-a situat în domeniul 0,05-0,15 %.

- Raportul molar al reactanților are o influență semnificativă asupra reacției, în sensul că este necesar un raport molar glicerină/acid oleic de cel puțin 3:1 pentru ca reacția să aibă loc cu viteză semnificativă. În cazul nostru raportul molar optim este de 6:1, dar trebuie menționat că activitatea enzimei la raportul de 3:1 este doar cu 15 % mai mică.

- Prezența apei în acest sistem de reacție este neapărat necesară, în sensul că esterificarea nu are loc decât în prezența unei concentrații minime de apă, estimată la aproximativ 5 % din masa totală a amestecului de reacție. Activitatea maximă a enzimei se înregistrează la un raport molar apă/acid oleic între 5÷6 (corespunzând unui conținut inițial de apă de aproximativ 10-12 % masă) și este corelată cu o conversie la echilibru a substratului limitativ de peste 60 %. Poziția echilibrului termodinamic nu este influențată de concentrația apei în sistem la acest ordin de mărime, aceasta având totuși un rol important prin efectul asupra vitezei de reacție și a transferului de masă.

- În condițiile în care activitatea enzimei în acest sistem de reacție este maximă: concentrație de emulgator de 0,05 % față de acidul oleic, raport molar glicerină/acid oleic de 6:1 și conținut inițial de apă al sistemului între 10-12 %, se ajunge la o conversie de peste 60 % după 100 de ore de reacție. Ținând cont de faptul că viteza de reacție scade mult în apropierea echilibrului, din punct de vedere preparativ este de preferat oprirea reacției după 10 ore (când conversia substratului limitativ ajunge la aproape 50%) și recircularea materiilor prime nereacționate.

8.2 Acilarea enzimatică a diolilor prin reacții de transesterificare [324]

Diolii reprezintă intermediari valoroși pentru sinteza a numeroși compuși de importanță practică. În multe din aplicațiile lor este necesară protejarea grupei -OH primare. Prin metodele clasice cunoscute, acest lucru se realizează prin utilizarea unor reactivi specifici sau prin crearea unor condiții particulare de reacție, ceea ce face destul de dificilă obținerea unor monoesteri ai diolilor pe cale chimică. Metodele clasice de acilare cu acizi carboxilici, cloruri acide sau anhidride determină în general obținerea unui amestec de mono- și diesteri. În aceste condiții utilizarea regioselectivității reacțiilor catalizate de lipaze pentru obținerea selectivă a derivaților monoacilați ai diolilor poate fi o posibilitate interesantă.

Deoarece vitezele reacțiilor de esterificare directă ai alcoolilor polihidroxicici sunt destul de mici în medii bifazice și sunt influențate nefavorabil de prezența apei, așa cum s-a văzut în cazul glicerinei, pentru investigarea obținerii compușilor menționați s-a ales reacția de transesterificare. Esterii acetici sunt accesibili în cantități mari și la un preț redus și au avantajul de a fi solvenți foarte buni care pot îndeplini în același timp și rol de mediu de reacție. În acest mod se realizează un mediu omogen în care doar enzima reprezintă o fază distinctă, fără a fi necesară utilizarea unui solvent organic, iar excesul de acetat de alchil favorizează și deplasarea echilibrului în direcția obținerii derivaților acetilați ai diolilor respectivi. Acest exces poate fi ușor îndepărtat prin distilare la terminarea reacției.

Aceste cercetări au fost orientate pe două direcții:

- studiul acilării unor dioli având numai grupe hidroxil primare și determinarea unor parametri cinetici ai acestor reacții;
- studiul acilării regioselective a unor dioli având o grupă hidroxil primară și una secundară.

Reacțiile au fost efectuate într-un reactor termostatat cu capacitatea de 50 ml, prevăzut cu agitare magnetică, la temperatura de 37°C. Amestecul de reacție a fost constituit din 38 ml acetat de alchil și 0,02 moli diol. În sistemul inițial au fost introduși și 0,5 ml n-hexadecan, care a avut rol de standard intern pentru analiza cromatografică. Reactivii utilizați au fost de puritate analitică, fără a fi supuși unor operații de purificare suplimentară, după cum urmează: acetat de metil, acetat de etil și acetat de n-butil de la Chimopar S.A., acetat de n-propil, n-hexadecan (Merck), 1,3-propandiol, 1,2-propandiol, 2-etil-1,3-hexandiol (Fluka), 1,3-butandiol, 2,3-butandiol, 1,4-butandiol (Riedel de Haen), 1,5-pentandiol, 1,6-hexandiol, 2,5-hexandiol, 2,2-dimetil-1,3-propandiol (neopentilglicol), (Merck). Lipaza pancreatică folosită a fost obținută în laborator prin precipitare cu acetonă, în modul descris anterior.

Urmărirea evoluției reacției s-a făcut timp de 48 h, prin prelevare de probe la intervale determinate, probe ce au fost apoi analizate prin cromatografie gaz-lichid. S-a utilizat o coloană de 2m x 4 mm din oțel inoxidabil umplută cu metilfenilsilicon OV-17 cu concentrația 5 %, deșus pe Chromosorb W-AW DMCS de 80-100 mesh. Condițiile de analiză cromatografică au fost: temperatura coloanei liniar crescătoare între 80-250°C cu viteza de 12°C/minut, gaz purtător azot, cu debitul de 15 ml/minut. După terminarea reacției, lipaza a fost separată prin filtrarea enzimei insolubile în mediul de reacție, după care produsul s-a izolat prin evaporarea sau distilarea excesului de acetat de alchil.

Figura 8.5 redă un exemplu de asemenea cromatogramă, obținută pentru reacția de transesterificare dintre 1,5-pentandiol și acetat de etil, după 24 h de reacție. Identificarea picurilor diolului și n-hexadecanului s-a făcut pe baza timpilor de retenție, folosind ca etaloane componentele pure. Pentru produșii de reacție s-a presupus că eluarea pe această coloană cu polaritate medie are loc în ordinea creșterii masei moleculare și a temperaturii de fierbere, deci primul va elua monoesterul.

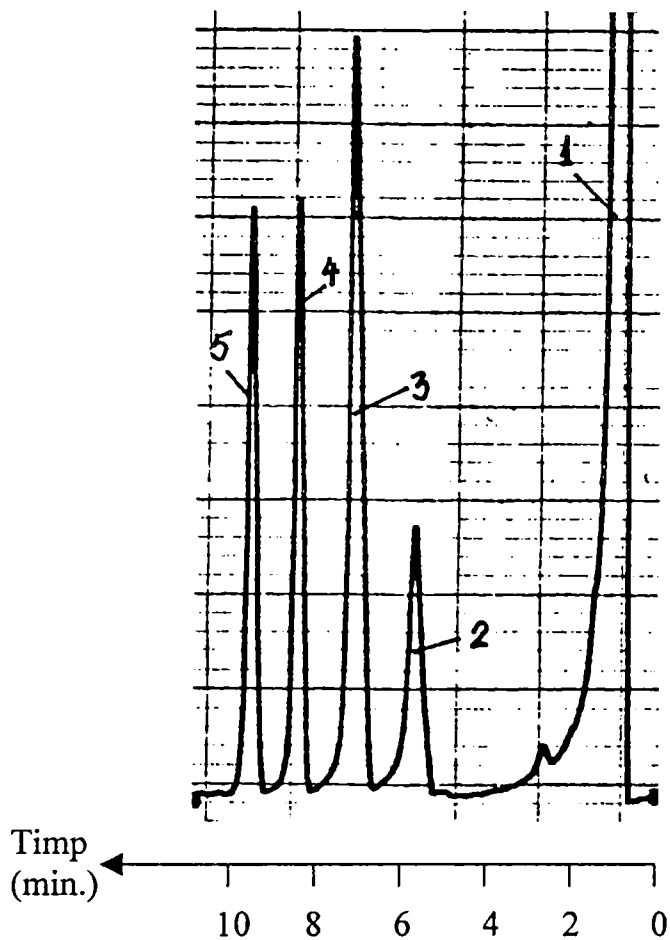
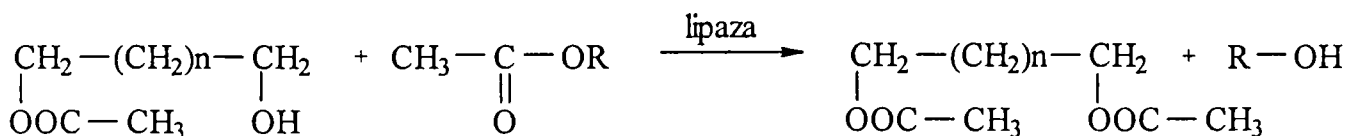
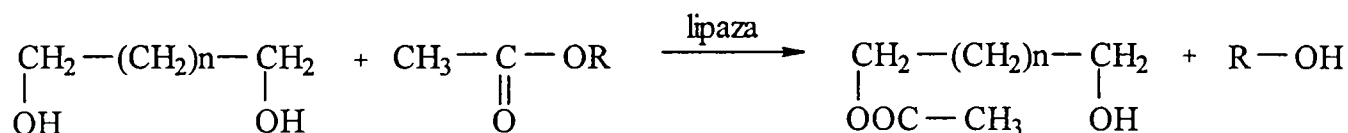


Figura 8.5. Cromatograma gaz-lichid a amestecului de reacție de la acilarea 1,5-pentandiolului cu acetat de etil, în prezența lipazei pancreatice, după 24 h. (1- acetat de etil; 2- 1,5-pentandiol; 3- monoacetat de 1,5-pentandiol; 4- diacetat de 1,5-pentandiol; 5- n-hexadecan)

8.2.1. Acilarea enzimatică a unor dioli cu două grupări hidroxil primare

Au fost studiați diolii cu catene liniare, de la 1,3-propandiol la 1,6-hexandiol. Reacția care are loc poate fi scrisă în formă generală astfel:



$n = 1 \dots 4$

R = alchil

Pe baza scăderii concentrației diolului, determinată prin analiza cromatografică, s-au calculat conversiile totale ale diolilor în diferite momente ale reacției, iar pe baza rapoartelor ariilor picurilor de monoester și diester, randamentele de formare ale acestor produși.

8.2.1.1. Relațiile de calcul și modelul cinetic

Rapoartele dintre aria picului diolului și aria picului standardului sunt proporționale cu rapoartele dintre concentrațiile corespunzătoare, în orice moment t al reacției, prin intermediul unei constante k (considerând că dreapta de etalonare trece prin origine):

$$\left(\frac{A_d}{A_{st}}\right)_t = k \cdot \left(\frac{C_d}{C_{st}}\right)_t \quad (8.1)$$

de unde rezultă concentrația diolului în momentul t al reacției:

$$(C_d)_t = \left(\frac{A_d}{A_{st}}\right)_t \cdot \frac{(C_{st})_t}{k} \quad (8.2)$$

În mod similar, concentrația inițială a diolului este:

$$(C_d)_0 = \left(\frac{A_d}{A_{st}}\right)_0 \cdot \frac{(C_{st})_0}{k} \quad (8.3)$$

Conversia diolului la timpul t este:

$$X = \frac{(C_d)_0 - (C_d)_t}{(C_d)_0} = 1 - \frac{(C_d)_t}{(C_d)_0} \quad (8.4)$$

Înlocuind în această relație și ținând cont de faptul că concentrația standardului rămâne nemodificată, obținem:

$$X = 1 - \frac{\left(\frac{A_d}{A_{st}}\right)_t}{\left(\frac{A_d}{A_{st}}\right)_0} \quad (8.5)$$

Neavând substanțe etalon pentru derivații mono și diacilați ai diolilor, calculul concentrațiilor de monoester și diester din amestecul de reacție s-a făcut pe baza raționamentului următor:

- monoesterul și diesterul unui anumit diol sunt compuși asemănători din punct de vedere al răspunsului detectorului de ionizare în flacără, așadar raportul ariilor lor este egal cu raportul concentrațiilor (considerând răspunsul detectorului liniar în ambele cazuri);

$$\frac{C_{ME}}{C_{DE}} = \frac{A_{ME}}{A_{DE}} \quad (8.6)$$

- în reacție nu se formează nici un alt produs în afară de monoester și diester, deci numărul de moli de diol transformat este egal cu suma numărului de moli de monoester și diester format, în orice moment al reacției:

$$(C_d)_0 - (C_d)_t = C_{ME} + C_{DE} \quad (\text{moli/l}) \quad (8.7)$$

- concentrația molară de mono- și diester din amestecul de reacție la un anumit timp se va putea calcula astfel:

$$C_{ME} = \frac{A_{ME}}{A_{DE}} \cdot C_{DE} \quad (\text{moli/l}) \quad (8.8)$$

$$X \cdot (C_d)_0 = \frac{A_{ME}}{A_{DE}} \cdot C_{DE} + C_{DE} = C_{DE} \left(1 + \frac{A_{ME}}{A_{DE}} \right)$$

$$C_{DE} = \frac{X \cdot (C_d)_0}{1 + \frac{A_{ME}}{A_{DE}}} \quad (\text{moli/l}) \quad (8.9)$$

$$C_{ME} = \frac{X \cdot (C_d)_0}{1 + \frac{A_{DE}}{A_{ME}}} \quad (\text{moli/l}) \quad (8.10)$$

unde: C_{ME} și C_{DE} reprezintă concentrațiile de monoester și diester în moli/l, C_d reprezintă concentrația inițială a diolului în moli/l, iar A_{ME} și A_{DE} reprezintă ariile picurilor de monoester și diester în momentul t al reacției.

Cunoscând concentrația molară a fiecărui component al sistemului, se poate realiza urmărirea cinetică a evoluției acestor reacții. În figura 8.6 este prezentat un astfel de exemplu, pentru transesterificarea 1,4-butandiolului cu acetat de etil. Datele pe baza cărora a fost construită figura 8.6 sunt redate în tabelul 8.5.

Tabelul 8.5. Acilarea 1,4-butandiolului cu acetat de etil, la 37°C, în cataliza lipazei pancreatice

Timp h	Conversie diol	Concentrație diol moli/l	Conc. monoester moli/l	Conc. diester moli/l
0	-	0,496	-	-
1	0,109	0,443	0,048	0,005
2	0,203	0,395	0,091	0,010
4	0,317	0,353	0,105	0,038
5	0,398	0,299	0,142	0,055
6	0,495	0,251	0,174	0,071
7	0,536	0,231	0,182	0,083
8	0,564	0,217	0,184	0,095
22	0,757	0,122	0,187	0,187
24	0,784	0,108	0,195	0,193
31	0,853	0,074	0,203	0,219
48	0,920	0,043	0,183	0,270

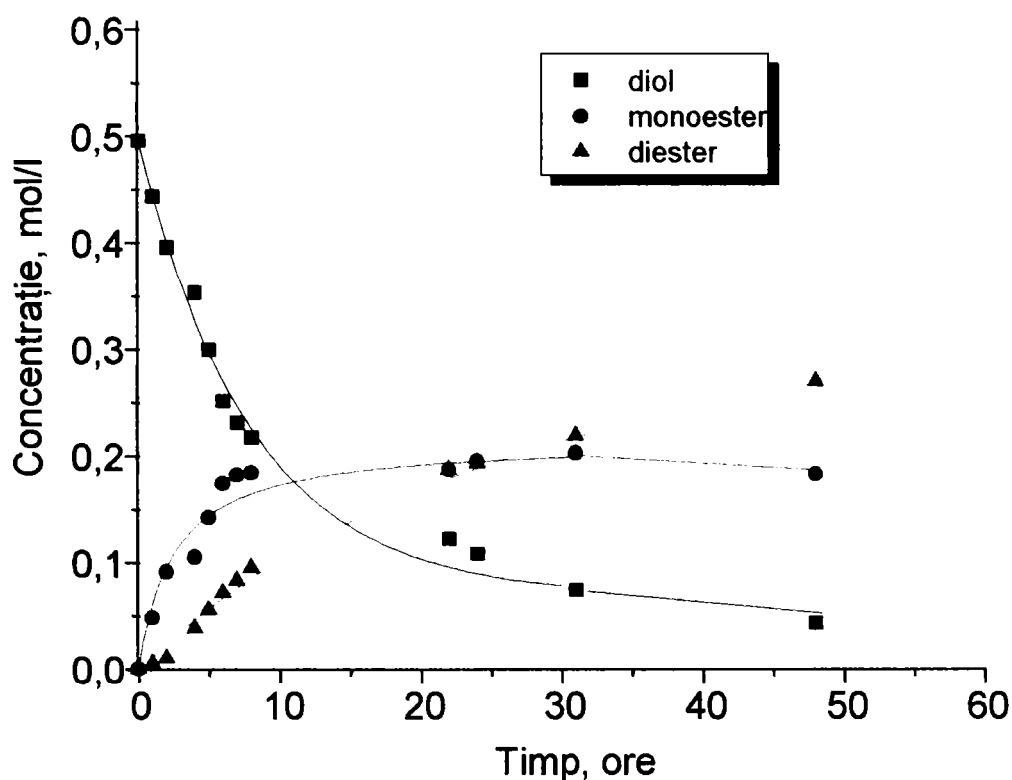


Figura 8.6. Evoluția în timp a reacției de acilare a 1,4-butandiolului cu acetat de etil, catalizată de lipaza pancreatică

Se poate remarca faptul că se înregistrează o conversie de peste 90 % a diolului. În prima fază a reacției are loc în mod preferențial formarea monoesterului. Concentrația monoesterului se stabilizează apoi la o valoare în jur de 0,19 moli/l, iar după un timp scade, deoarece în ultima fază a reacției formarea diesterului are loc preponderent pe seama monoesterului obținut în prima etapă. Se poate afirma deci că lipaza nu manifestă selectivitate față de diol comparativ cu monoesterul, ambii fiind substraturi la fel de bune. Astfel se explică faptul că o perioadă lungă de timp concentrația de monoester din sistem rămâne practic constantă.

Valorile conversiilor diolilor calculate la diferite momente ale reacțiilor au constituit punctul de plecare pentru calculele cinetice. Aceste calcule au urmărit determinarea unor parametri cinetici specifici, pe baza modelului cinetic al reacțiilor de transesterificare ale diolilor. Modelul se bazează pe relația parametrică (5.17) pentru determinarea conversiei în funcție de timp, așa cum s-a discutat anterior. După cum s-a precizat, acest model nu ține cont de existența a mai multe substraturi și reacții consecutive, tratând procesul la nivel global. În cazul acestei reacții însă avem o situație diferită de cea de la esterificarea glicerinei, în sensul că reactantul limitativ este compusul hidroxilic și prin determinarea conversiei diolului în funcție de timp se măsoară de fapt numai conversia în monoester. În aceste condiții și parametrii cinetici determinați vor caracteriza numai prima dintre cele două reacții care au loc, cea de obținere a monoesterului. Totuși putem considera că aceste date sunt utile pentru cunoașterea procesului și evaluarea influenței naturii agentului de acilare și a lungimii catenei hidrocarbonate a diolului, mai ales dacă ținem cont de faptul că viteza inițială determinată este de fapt cea de formare a monoesterului.

În figura 8.7 este prezentat un model de asemenea calcul cinetic, pentru aceeași reacție dintre 1,4-butandiol și acetat de etil. Datele de conversie ale diolului au fost preluate din tabelul 8.5.

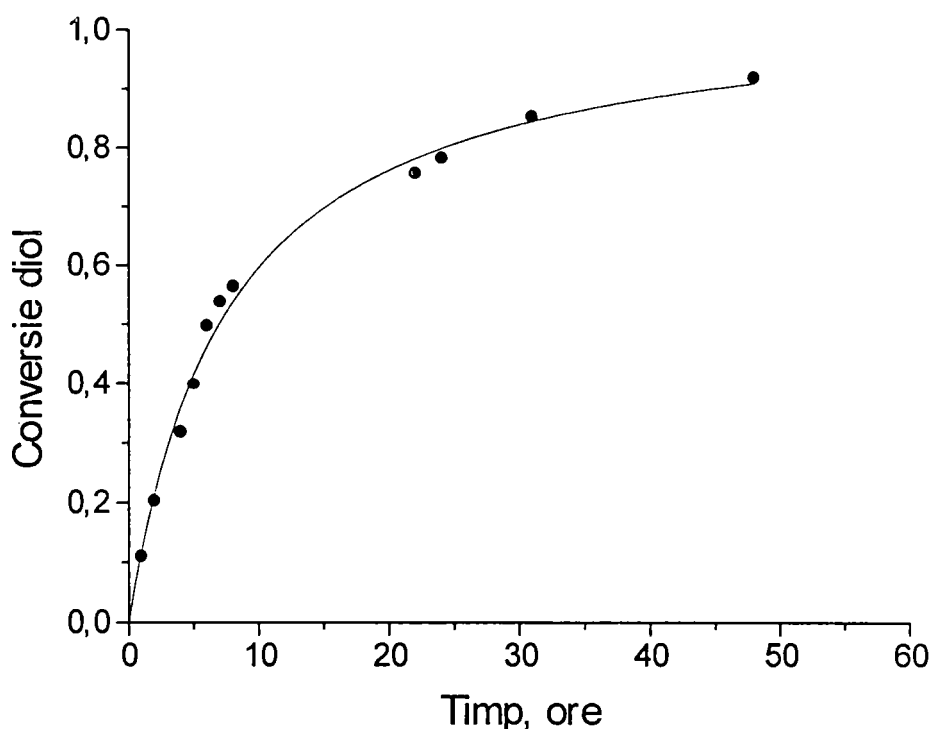


Figura 8.7. Modelarea cinetică a reacției dintre 1,4-butandiol și acetat de etil, catalizată de lipaza pancreatică (curba reprezintă corelarea conform ecuației 5.17)

Datele inițiale pentru acest calcul cinetic au fost:

- concentrația inițială a diolului: 0,496 moli/l;
- concentrația inițială a acetatului de etil: 9,66 moli/l.

Rezultatele corelării cu modelul cinetic sunt:

- viteza inițială de reacție: $0,055 \text{ h}^{-1}$;
- constanta de viteză a reacției de formare a monoesterului: $11,8 \times 10^{-3} \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

8.2.1.2. Influența lungimii catenei hidrocarbonate a diolului și agentului de acilare asupra randamentului și vitezei de reacție

Reacțiile catalizate de lipază sunt influențate, așa cum s-a arătat, pe lângă natura grupărilor reactante și de structura și conformația restului moleculei, care are rol în orientarea și fixarea enzimei într-o poziție cât mai favorabilă pentru formarea complexului enzimă-substrat. În cazul reacțiilor de acilare a diolilor mecanismul catalitic implică în prima etapă formarea intermediarului acil-enzimă pe seama esterului utilizat drept agent de acilare, urmată de reacția cu compusul hidroxilic (diol sau monoester). Este de presupus că atât natura grupării alchil a agentului de acilare, cât și lungimea catenei hidrocarbonate a diolului pot avea influență asupra desfășurării reacției. Pentru acest studiu au fost testați

acetații alcoolilor inferiori, care sunt esteri fabricați la scară industrială și accesibili la un preț moderat. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 8.6.

Tabelul 8.6. Acilarea biocatalitică a unor dioli cu grupări hidroxil primare în prezența lipazei pancreatice

Diol	Ester	Conversia după 48 h	Viteza inițială h ⁻¹	k ₁ l·mol ⁻¹ ·h ⁻¹
1,3-Propandiol	Acetat de metil	0,42	0,036	0,0061
	Acetat de etil	0,84	0,058	0,0120
	Acetat de n-propil	0,89	0,061	0,0139
	Acetat de n-butil	0,95	0,122	0,0330
1,4-Butandiol	Acetat de metil	0,53	0,044	0,0074
	Acetat de etil	0,92	0,055	0,0118
	Acetat de n-propil	0,89	0,063	0,0133
	Acetat de n-butil	0,99	0,126	0,0338
1,5-Pentandiol	Acetat de metil	0,63	0,049	0,0083
	Acetat de etil	0,87	0,055	0,0120
	Acetat de n-propil	0,88	0,056	0,0136
	Acetat de n-butil	0,95	0,123	0,0339
1,6-Hexandiol	Acetat de metil	0,72	0,062	0,0108
	Acetat de etil	0,94	0,064	0,0128
	Acetat de n-propil	0,93	0,060	0,0134
	Acetat de n-butil	0,99	0,120	0,0344

Pe baza rezultatelor acestui tabel a fost construit graficul din figura 8.8. Se poate constata că după 48 de ore s-au obținut conversii ridicate, de peste 85%, exceptând reacțiile în care drept agent de acilare a fost folosit acetatul de metil. Vitezele de reacție nu depind de lungimea catenei hidrocarbonate a diolului decât în cazul reacțiilor cu acetatul de metil, care prezintă și efectul inhibitor cel mai pronunțat asupra enzimei, în schimb sunt influențate de natura agentului de acilare. Acest lucru este normal dacă se ține cont de mecanismul procesului, care implică, așa cum s-a arătat, formarea intermediarului acil-enzimă prin fixarea esterului la centrul activ al enzimei. Reacția are loc cu viteză mai mare odată cu creșterea lungimii restului alchil al moleculei agentului de acilare și este, comparativ, mai mare dacă acesta este format dintr-un număr par de atomi de carbon. Cele mai bune rezultate s-au obținut în reacțiile de transesterificare cu acetat de n-butil, produsul de reacție fiind, în toate cazurile, un amestec de monoacetat și diacetat al diolului respectiv. Deoarece valorificarea în scopuri sintetice a acestor reacții ar fi posibilă mai ales pentru obținerea de monoestere ai diolilor, în continuare a fost urmărită obținerea de asemenea derivați prin utilizarea drept materii prime a unor 1,3-dioli având o grupare hidroxil legată de un atom de carbon secundar.

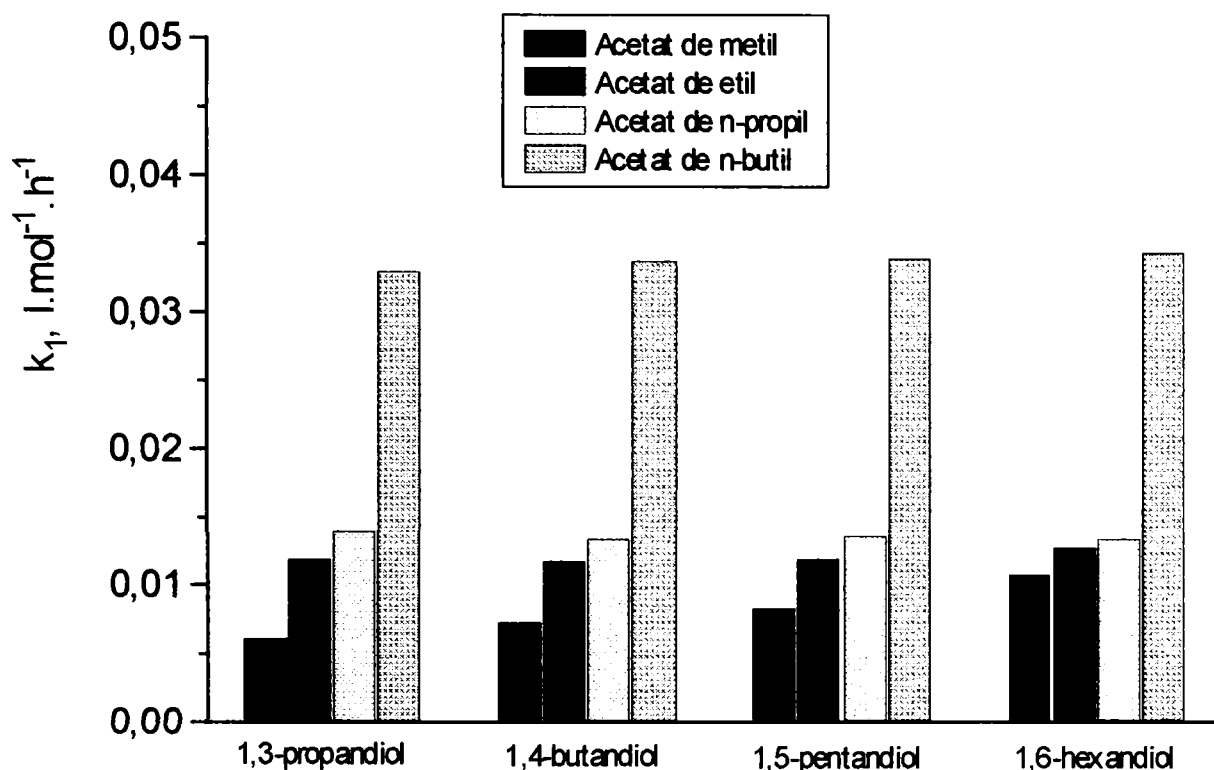


Figura 8.8. Constante de viteză pentru formarea derivaților monoacetilați ai unor dioli în reacții de transesterificare catalizate de lipaza pancreatică

8.2.2. Acilarea enzimatică regioselectivă a unor dioli având o grupă hidroxil primară și una secundară

Se cunoaște faptul că selectivitatea lipazelor față de alcooli este diferită în funcție de faptul dacă gruparea hidroxilică este legată de un atom de carbon primar, secundar sau terțiar, scăzând în această ordine. Ar fi deci de așteptat ca și în cazul diolilor, reactivitatea grupărilor hidroxil primare să fie diferită de a celor secundare în reacții catalizate de lipaze. Au fost studiate reacțiile de acilare a unor dioli ce posedă asemenea grupări: 1,3-butandiol și 2-etil-1,3-hexandiol, prin transesterificare cu acetati de alchil în prezența lipazelor. Agenții de acilare au fost aceiași ca la precedentul experiment. Pentru a compara activitatea catalitică a lipazei obținute în laborator cu cea a unor enzime comerciale, au fost încercate și lipazele din *Candida cylindracea* (Sigma) și cea imobilizată din *Mucor miehei* (Lipozyme, Novo Industri).

Esterul a îndeplinit și rol de solvent pentru componentele mediului de reacție, cu excepția enzimei. Reacțiile au fost efectuate la temperatura de 37°C, durata reacțiilor depinzând de conversia substratului, dar fiind în majoritatea cazurilor 48 de ore. După terminarea reacției, lipaza a fost separată prin filtrarea masei de reacție, după care produsul s-a izolat prin evaporarea sau distilarea restului de acetat de alchil.

Evoluția reacțiilor de transesterificare a fost urmărită în timp prin analiză cromatografică, așa cum s-a arătat. Pe baza scăderii concentrației diolilor s-au calculat

conversiile totale ale diolilor, iar pe baza rapoartelor ariilor picurilor de monoester și diester, randamentele de formare ale acestor produși.

Reacțiile au decurs regioselectiv, această selectivitate având la bază discriminarea cinetică, deoarece în majoritatea reacțiilor la sfârșit se formează și derivatul diacilat în cantități mici. Pentru exemplificare am ales reacția dintre acetat de n-butil și 1,3-butandiol. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 8.7, iar variația concentrațiilor componentelor în timp se poate urmări în graficul din figura 8.9.

Tabelul 8.7. Acilarea 1,3-butandiolului cu acetat de n-butil, la 37°C, în cataliza lipazei pancreatice

Timp h	Conversie diol	Concentrație diol moli/l	Conc. monoester moli/l	Conc. diester moli/l
0	-	0,496	-	-
0,5	0,137	0,428	0,068	-
1	0,272	0,361	0,135	-
2	0,383	0,306	0,190	-
3	0,525	0,236	0,260	-
4	0,574	0,211	0,285	-
5	0,676	0,161	0,335	-
6	0,702	0,148	0,348	-
8	0,765	0,117	0,371	0,008
24	0,885	0,057	0,410	0,029
48	0,889	0,053	0,392	0,051

Se poate observa că în primele 8 ore de reacție raportul monoester:diester format este mare, de aproximativ 98:2, iar după 24 de ore de reacție, în condițiile obținerii unei conversii de aproape 90 %, acest raport este de 93:7. Evident că în condițiile în care se urmărește obținerea monoesterului reacția trebuie oprită după 24 de ore, deoarece în continuare are loc doar formare de diester pe seama monoesterului. Din rezultatele prezentate în tabelul 8.7 se poate remarca și viteza mare de reacție obținută prin utilizarea acetatului de n-butil drept agent de acilare, conversia depășind 50% după 3 ore. Se confirmă deci concluziile de la acilarea diolilor cu ambele grupări hidroxil primare. Determinările cinetice arată (tabelul 8.8), așa cum era de așteptat, că există aceeași tendință de creștere a vitezelor de reacție odată cu creșterea lungimii lanțului alchil din molecula agentului de acilare. La acilarea 1,3-butandiolului comparativ cu 1,4-butandiolul (tabelul 8.6) se constată o ușoară scădere a acestor viteze dacă agentul de acilare este acetatul de metil sau etil, ceea ce se datorește probabil efectului grupării OH din poziția 3. În același timp, acilarea 1,2-propandiolului nu a fost posibilă cu acetat de metil. Această influență nefavorabilă a prezenței unor substituenți în molecula diolului în vecinătatea grupării reactive este confirmată de scăderea vitezei de reacție în cazul acilării 2-etil-1,3-hexandiolului, unde vitezele de reacție sunt considerabil mai scăzute comparativ cu 1,6-hexandiolul. În cazul neopentilglicolului, care are doi substituenți metil în poziția 2, reacția de acilare nu a avut loc. În aceste situații putem presupune că accesul reactantului la intermediarul acil-enzimă este împiedicat și cea de-a doua etapă a reacției devine determinantă de viteză.

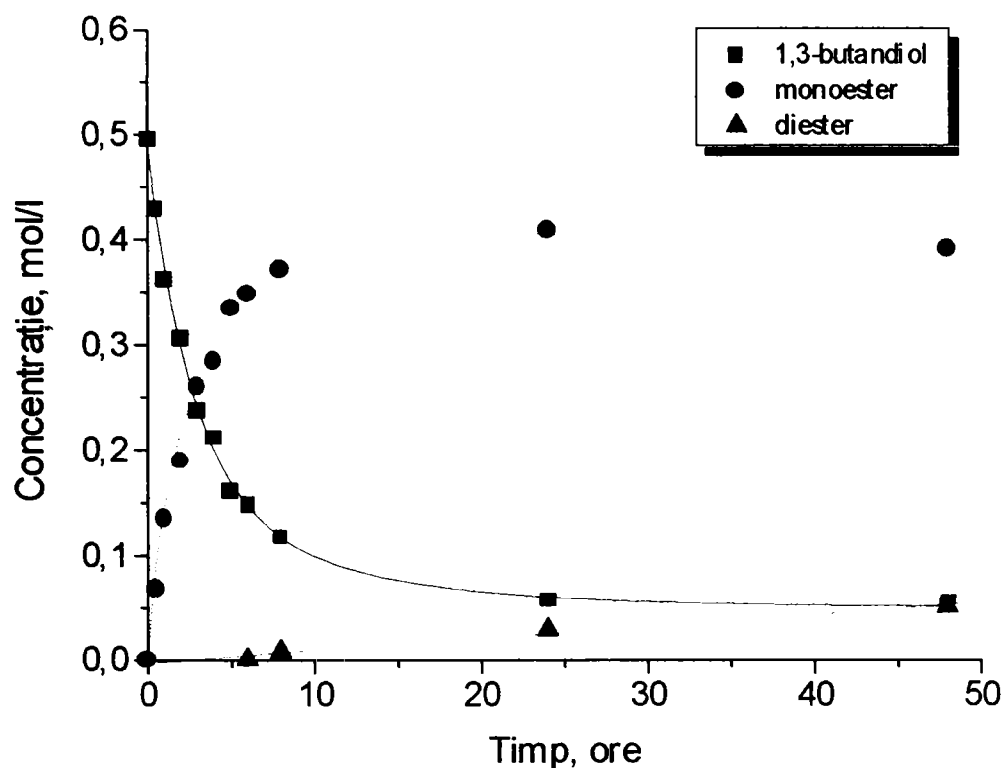


Figura 8.9. Evoluția în timp a reacției de acilare a 1,3-butandiolului cu acetat de n-butil, catalizată de lipaza pancreatică

Tabelul 8.8. Acilarea biocatalitică a unor dioli cu grupări hidroxil primare și secundare în prezența lipazei pancreatice

Diol	Ester	Conversia după 48 h	Viteza inițială h ⁻¹	k ₁ l·mol ⁻¹ ·h ⁻¹
1,2-Propandiol	Acetat de metil	-	-	-
1,3-Butandiol	Acetat de metil	0,466	0,030	0,0050
	Acetat de etil	0,803	0,043	0,0089
	Acetat de n-propil	0,764	0,056	0,0137
	Acetat de n-butil	0,889	0,124	0,0330
2-Etil-1,3-hexandiol	Acetat de etil	0,538	0,031	0,0066
	Acetat de n-propil	0,398	0,022	0,0053
	Acetat de n-butil	0,587	0,043	0,0094
2,2-Dimetil-1,3-propandiol	Acetat de etil	-	-	-

Așa cum s-a menționat, au fost încercate și alte tipuri de lipaze, de origine microbiană, pentru obținerea derivatilor monoacetilați ai diolilor posedând o grupă hidroxil primară și una secundară. O sinteză a rezultatelor experimentale este prezentată în tabelul 8.9, în care s-a luat în considerare randamentul în produși de reacție la întreruperea sintezei. Pentru cele mai multe sinteze acest moment înseamnă 48 de ore de reacție.

Tabelul 8.9. Randamentele în monoester și diester pentru reacțiile de acetilare ale 1,3-butandiolului, catalizate de lipaze, la 37°C.

Tipul esterului	Tipul lipazei	Randament în monoester (%)	Randament în diester (%)
acetat de metil	pancreatică	46,6	-
acetat de etil	pancreatică	76,6	3,7
acetat de n-propil	pancreatică	73,3	3,1
acetat de n-butil*	pancreatică	82,7	5,8
acetat de n-butil	Lipozyme	67,2	-
acetat de n-butil	<i>Candida cylindracea</i>	52,7	2,2

*după 24 de ore de reacție

După cum se poate cu ușurință remarca din tabelul de mai sus, acetilarea diolului a fost regioselectivă pentru toate lipazele studiate, cu o mențiune particulară pentru preparatul Lipozyme. Diferențierea între derivatul monoacilat și cel diacilat se face pe cale cinetică, viteza de formare a monoesterului fiind mult mai mare, motiv pentru care cantități detectabile de diester apar numai în faza finală a reacției. În cele mai multe cazuri, s-au obținut randamente ridicate după 48 h de reacție. Cel mai mare randament în monoester s-a realizat în cazul folosirii lipazei pancreatice drept catalizator și a acetatului de n-butil drept agent de acilare. Se mai poate remarca și aici specificitatea lipazei pentru catenele liniare conținând 4 atomi de carbon, care a fost observată și la alte reacții. Viteza de reacție ridicată a determinat însă obținerea și a diesterului într-un raport mai mare, comparativ cu ceilalți agenți de acilare. În cazul catalizei cu Lipozyme conversia este mai scăzută, însă regioselectivitatea este foarte bună, obținându-se practic numai monoester.

Regioselectivitatea lipazei pentru grupările hidroxilice primare ale diolilor a fost confirmată de faptul că nu s-a reușit acilarea unor dioli având ambele grupări hidroxil legate de atomi de carbon secundari: 2,3-butandiol și 2,5-hexandiol.

8.2.3. Concluzii

A fost realizat un model experimental și unul cinetic pentru studiul reacțiilor de acilare enzimatică ale alcoolilor dihidroxilici conținând grupări funcționale hidroxilice primare și secundare. S-a constatat că reacția are loc regioselectiv în prezența enzimei, această selectivitate fiind rodul unei discriminări cinetice între grupările hidroxilice primare și secundare ale substratului. Lipaza pancreatică obținută în laborator s-a dovedit a fi un catalizator foarte eficient pentru aceste reacții, iar agentul de acilare cu cele mai bune rezultate a fost acetatul de n-butil. Rezultatele obținute deschid calea obținerii pe cale enzimatică a unor derivați monoacilați ai dioliilor și ai altor alcooli polhidroxilici.

Concluzii generale

1. Lipazele reprezintă biocatalizatori de mare perspectivă pentru o serie de procese de sinteză organică, ele combinând avantajele activității față de un mare număr de substraturi cu cele ale unor selectivități ridicate. Un alt mare avantaj al lipazelor este acela că acționează atât asupra substraturilor solubile cât și a celor insolubile, fixarea enzimei la interfață fiind însoțită chiar de creșterea activității. Această remarcabilă diversitate funcțională este corelată în bună măsură cu proveniența enzimei, dar și cu modalitatea în care a fost obținut preparatul enzimatic. Obținerea și caracterizarea unor biocatalizatori cu activitate lipazică, de origine microbiană și animală, a fost impusă pe de o parte de necesitatea de a dispune de preparate adecvate scopurilor urmărite, iar pe de alta de intenția de a accede la asemenea biocatalizatori la un preț cât mai scăzut. Este binecunoscut faptul că unul din principalele obstacole în calea aplicării biotransformărilor la nivel industrial îl constituie costul ridicat al enzimelor.

2. Biosinteza lipazelor a fost studiată atât pe medii solide cât și în condiții submerse pe mediu lichid, utilizând o tulpină de *Aspergillus niger* IC. Au fost optimizate compozițiile mediilor de cultură pentru a obține activitate lipazică maximă. S-a constatat că valorile maxime ale activităților specifice sunt aproximativ aceleași (1,2 U/mg proteină) în cazul ambelor tipuri de culturi. Cultura pe mediu solid a dus la obținerea unei cantități de proteină considerabil mai mari. De asemenea, activitatea lipazică raportată la 1 ml extract brut precum și activitatea totală au fost mai mari decât în cazul culturii submerse. În același timp, productivitatea, definită prin raportul dintre activitatea totală și masa sursei de carbon din mediu, a fost de două ori mai mare în cazul culturii pe mediu lichid. Neexistând diferențe spectaculoase între rezultatele pe medii lichide și solide, s-a preferat alegerea variantei culturii submerse pentru a beneficia de binecunoscutele avantaje ale acestor tipuri de culturi: omogenitatea mediului, transfer de căldură mai eficient, prelucrarea mai ușoară a biomasei rezultate în urma culturii, evitarea pericolului infectării cu spori la prelucrarea mediului. Din culturi de *Aspergillus niger* pe mediu lichid cu compoziție optimizată conținând fosfat monopotasnic, azotat de amoniu, sulfat de magneziu, sulfat feros, zaharoză și ulei de măsline s-a obținut un extract brut cu conținut de proteină de 0,34 mg/ml și activitate de 0,4 unități/ml. Aceste valori sunt comparabile cu cele raportate pentru asemenea tipuri de culturi în cazul altor microorganisme producătoare de lipază.

3. Purificarea extractelor din culturi de *Aspergillus niger* s-a efectuat prin precipitare cu sulfat de amoniu și gel-filtrare. Cele mai bune rezultate s-au realizat prin trecerea extractului pe o coloană cu gel Sephadex G-75 și reunirea fracțiunilor eluate care aveau activitate lipazică, situație în care s-a obținut un factor de purificare de 6,4 ori comparativ cu enzima brută și un randament foarte bun de regăsire a activității enzimatice totale (97 %). Obținerea enzimelor din culturi microbiene la scară de laborator ridică totuși o serie de probleme legate de manipularea unor volume mari de soluții, realizarea condițiilor sterile, eliminarea pericolului de infecție.

4. S-a experimentat obținerea unor preparate active de lipază prin extracție din pancreas de porc, un subprodus ieftin și accesibil în cantități mari. Preparatul brut s-a obținut prin deshidratarea și delipidizarea pancreasului proaspăt cu acetonă și eter etilic, cu un randament cuprins între 7-10 % față de pancreas. Activitățile specifice s-au situat între 1,1-2,0 unități/mg proteină, depinzând atât de materia primă cât și de perioada și condițiile de stocare a acesteia până la prelucrare, fiind comparabile și chiar mai mari decât ale unor enzime comerciale oferite de firme cu renume.

5. Purificarea preparatului pancreatic brut s-a realizat prin cromatografie de excluziune sterică preparativă pe gel Sephadex G-100 și prin precipitare cu solvenți organici. Extracția enzimei din preparatul brut a avut loc cel mai bine la pH 8,0 realizată cu

soluție tampon Tris/HCl și la o tărie ionică de 0,1 M NaCl. La purificarea prin cromatografie pe gel urmată de precipitare cu acetonă până la un conținut de acetonă de 60 % s-au obținut randamente bune (de până la 60 %) de regăsire a activității lipazice și un factor de purificare față de produsul solid brut de 4,5. Din considerente practice s-a adoptat totuși o variantă mai simplă, precipitarea direct cu acetonă a extractelor apoase. S-a realizat un factor de purificare mai mic, cuprins între 2 și 3, însă randamentul de regăsire a activității enzimatic totale a fost mare, de aproape 80 %. Cantitatea de preparat lipazic purificat obținută în urma acestei proceduri a fost de aproximativ 30 % (masă) față de preparatul brut, iar activitatea preparatului de 2 unități/mg. Acest preparat solid s-a dovedit a fi activ, solubil în apă și stabil. Depozitat la o temperatură între 0-5°C, și-a menținut peste 70 % din activitatea inițială cel puțin 2 ani de zile.

6. S-a demonstrat influența pe care o are pH-ul soluției de extracție din care se face precipitarea cu acetonă asupra activității preparatelor pancreatice purificate solide. Cea mai mare activitate s-a înregistrat în cazul în care acest pH a avut valoarea 9, dar diferența de activitate față de preparatul obținut la pH 8 a fost mică, în timp ce în cazul preparatului precipitat la pH 7 s-a observat o dezactivare însemnată. Această dependență de pH se datorește modificării unor interacțiuni electrostatice în zona centrului activ al enzimei. Enzima precipitată cu solvenți organici conservă în bună parte conformația catalitic activă dobândită în soluția apoasă. Specificitatea de substrat a lipazei în reacția de hidroliză a trigliceridelor nu a depins de pH-ul soluției din care a avut loc precipitarea cu acetonă. Această specificitate a fost maximă față de trigliceridele cu resturi acil cu catenă scurtă (C₄). Se poate afirma că structura sterică a centrului activ este aceeași, indiferent de metoda de purificare folosită și că această lungime de catenă este cea mai favorabilă formării intermediarului enzimă-substrat. Diferențele de activitate apar datorită conformației diferite a unei alte părți a moleculei enzimei, care în varianta defavorabilă poate împiedica accesul substratului la centrul activ.

7. Cea mai importantă proprietate a preparatelor enzimatic pancreatice purificate a fost activitatea catalitică în reacții de esterificare și transesterificare în solvenți organici. Reacțiile model alese au fost esterificarea 1-pentanolului cu acid hexanoic, respectiv transesterificarea tributiratului de glicerină cu 1-pentanol, în mediu de n-hexan. Activitatea de esterificare cea mai mare s-a înregistrat în cazul preparatului obținut prin precipitare la pH 8 și acest preparat a permis obținerea unei conversii de peste 90 % după o oră de reacție. Chiar dacă activitatea în mediu organic este mai mică decât cea în mediu apos, se poate afirma că prin metoda elaborată s-a reușit conservarea în bună parte a conformației catalitice active a lipazei. Această enzimă poate fi așadar utilizată în scopuri preparative pentru sinteza esterilor acizilor carboxilici.

8. A fost elaborat un model cinetic al reacțiilor de esterificare și transesterificare reversibile de ordinul II, în medii bifazice apă-solvent organic sau organice cu conținut redus de apă. Acest model permite calcularea unor parametri cinetici specifici: constanta de viteză a reacției directe și inverse, constanta de echilibru, viteza inițială de reacție, pe baza estimării valorilor optime a doi parametri: conversia de echilibru și timpul necesar atingerii a 50 % din conversia de echilibru. Valorile acestor parametri rezultă pe baza unui calcul de optimizare a ecuației parametrice cu datele experimentale. Pentru aceasta a fost elaborat un program original de calcul, care utilizează pentru optimizare metoda Simplex.

Modelul a fost verificat pentru mai multe reacții de esterificare și transesterificare catalizate de lipaze. S-au obținut în toate cazurile corelări foarte bune între model și punctele experimentale. În cazul reacțiilor în care unul dintre substraturi este un polioliol, trebuie făcută precizarea că modelul, întrucât se bazează pe valorile conversiei globale a substratului limitativ, nu poate face diferență între reactivitatea diferitelor grupări hidroxilice și se obțin parametri cinetici aparenti, corespunzători reacției globale.

Veridicitatea modelului este cu atât mai bună cu cât numărul punctelor experimentale este mai mare și necesită urmărirea reacției până la valori cât mai apropiate de echilibru.

9. Atât preparatele pancreatice brute cât și cele purificate obținute în laborator au dat rezultate bune la realizarea unor biotransformări în medii organice, având activități mai mari decât lipaza comercială de aceeași proveniență pe care am avut-o la dispoziție (de la Fluka).

10. A fost studiată activitatea catalitică a lipazei pancreatice în reacția de esterificare dintre acizi monocarboxilici și alcoolii monohidroxic. S-a constatat că enzima își menține activitatea catalitică în mediu de solvenți organici în condițiile prezenței unei cantități reduse de apă, putând fi utilizată pentru obținerea esterilor menționați cu randamente ridicate. Au fost optimizați parametrii care influențează desfășurarea acestor reacții.

Activitatea de esterificare crește liniar cu concentrația enzimei în domeniul 15-35 unități enzimatiche/mmoli substrat, fără să apară fenomenul de saturare a substratului cu enzimă. Reacția a fost favorizată în solvenți organici cu polaritate scăzută, în timp ce în solvenți mai polari sau miscibili cu apa ca acetona sau dioxanul nu a avut loc sau viteza de reacție a fost foarte mică. Ținând cont de importanța apei din sistem pentru realizarea interfeței de reacție și de miscibilitatea parțială a acestor solvenți cu apa, se poate presupune că ei realizează o deshidratare a enzimei, ceea ce determină pierderea activității catalitice.

Elucidarea rolului apei reprezintă unul din cele mai importante aspecte ale acestor sisteme. S-a demonstrat că esterificarea are loc chiar în prezența unor concentrații foarte mici de apă în sistem: 0,05-0,07%, cantități ce pot proveni din materiile prime și enzima introduse în reacție, dacă acestea nu au fost anhidrifcate în mod deliberat. Viteza reacției crește aproximativ de 2,5 ori în prezența unei concentrații inițiale de apă de 0,3-0,5 % (vol.). O consecință importantă este că apa rezultată din reacție nu influențează nefavorabil reacția de esterificare.

Temperatura joacă un rol important în reacțiile enzimatiche. Activitatea de esterificare a lipazei studiate crește cu temperatura în intervalul 25-50°C de 1,8 ori, însă această creștere nu este atât de importantă pentru a impune neapărat efectuarea reacțiilor la temperaturi ridicate, la care stabilitatea operațională a enzimei este mai scăzută din cauza inactivării termice. Temperatura optimă pentru desfășurarea acestor reacții este în jur de 40°C.

Utilizarea unei concentrații inițiale cât mai mari a substratului este importantă din punct de vedere preparativ, dar este limitată de posibilitatea apariției unor efecte de inhibiție datorate substratului sau produsului. Creșterea concentrației inițiale a alcoolului în domeniul 0,05-0,25 moli/l determină creșterea corespunzătoare a vitezei de reacție, în timp ce creșterea concomitentă a concentrației inițiale a alcoolului și a acidului duce la inhibarea reacției la valori de peste 0,2 moli/l. Se poate trage concluzia că efectul inhibitor asupra esterificării enzimatiche apare ca urmare a creșterii concentrației acidului carboxilic peste o anumită limită.

11. Pe baza studiilor de raze X publicate în literatura de specialitate se cunoaște faptul că lipazele posedă doi centri de legare, diferiți de centrul activ, unul pentru restul de acid și celălalt pentru restul de alcool. Specificitatea de substrat depinde de conformația și flexibilitatea acestora, respectiv de natura aminoacizilor implicați și interacțiunile dintre aceștia, deci va fi diferită pentru fiecare tip de enzimă. Specificitatea lipazei pancreatice a fost determinată pentru reacțiile de esterificare menționate prin metoda cinetică a vitezelor inițiale. Ea fost cea mai mare în raport cu acizii carboxilici cu catenă hidrocarbonată scurtă (C₄-C₅), fiind mai redusă în raport cu acizii cu catenă medie C₆-C₁₂ (15-20 % din valoarea maximă), pentru a crește din nou în cazul acizilor cu catenă lungă C₁₆-C₁₈ (în jur de 50 %

din valoarea maximă). Spre deosebire de acizii monocarboxilici, în cazul alcoolilor monohidroxicilor specificitatea de substrat determinată prin metoda cinetică mai este redusă, vitezele inițiale fiind puțin dependente de lungimea catenei alcoolului în intervalul C₄-C₈. Explicația constă în faptul că etapa determinantă de viteză este formarea intermediarului acil-enzimă, în care este implicat numai acidul.

12. În condițiile de reacție optime stabilite pentru reacția de esterificare catalizată de lipaza pancreatică în solvenți organici, se pot obține cu randamente ridicate și în condiții energetice avantajoase o serie de esteri ai acizilor monocarboxilici cu alcooli monohidroxicilor, cu posibile utilizări ca și compuși aromatizanți în industria alimentară.

13. Obținerea esterilor alcoolilor di- și polihidroxicilor reprezintă o altă posibilitate de valorificare a potențialului biocatalitic al lipazelor. Esterii glicerinei cu acidul oleic pot fi sintetizați în prezența lipazei pancreatice în sistem bifazic emulsionat, până la conversii de echilibru de 60-65 %. Reacția este influențată de natura și concentrația emulgatorului, raportul molar al reactanților și concentrația apei în sistem.

Prezența emulgatorilor determină creșterea activității catalitice a enzimei cu până la 36 %, deși reacția are loc în condiții relativ bune și în absența emulgatorului, datorită proprietăților emulsifiante ale componentelor sistemului de reacție. Nu apar diferențe semnificative între emulgatorii din diferite clase, ceea ce face posibilă utilizarea unor emulgatori industriali din clasa nonilfenolilor etoxilați.

Raportul molar al reactanților are o influență semnificativă asupra reacției, în sensul că este necesar un raport molar glicerină/acid oleic de cel puțin 3:1 pentru ca reacția să aibă loc cu viteză semnificativă. Raportul molar optim pentru sistemul de reacție studiat a fost de 6:1, dar trebuie menționat că activitatea enzimei la raportul de 3:1 este doar cu 15 % mai mică, așadar se poate lucra la un raport apropiat de cel stoechiometric.

Prezența apei este neapărat necesară, deoarece esterificarea nu are loc decât în prezența unei concentrații minime de apă, estimată la aproximativ 5 % din masa totală a amestecului de reacție. Activitatea maximă a enzimei se înregistrează la un raport molar apă/acid oleic între 5÷6 (corespunzând unui conținut inițial de apă de aproximativ 10-12 % masă) și este corelată cu o conversie la echilibru a substratului limitativ de peste 60 %. Poziția echilibrului termodinamic nu este influențată de concentrația apei în sistem la acest ordin de mărime, aceasta având totuși un rol important prin efectul asupra vitezei de reacție și a transferului de masă.

În condițiile optime determinate în care activitatea enzimei fost maximă: concentrație de emulgator de 0,05 % față de acidul oleic, raport molar glicerină/acid oleic de 6:1 și conținut inițial de apă al sistemului între 10-12 %, s-a obținut o conversie a acidului oleic de peste 60 %, după aproximativ 100 de ore de reacție. Ținând cont de faptul că viteza de reacție scade mult în apropierea echilibrului, din punct de vedere preparativ este recomandabilă oprirea reacției după 10 ore, când conversia substratului limitativ ajunge la aproape 50% și recircularea materiilor prime nereacționate.

14. Acilarea diolilor se poate face regioselectiv în prezența lipazelor, selectivitatea bazându-se pe discriminarea cinetică între grupele hidroxil primare și secundare. Acetații alcoolilor alifatici inferiori s-au dovedit a fi agenți de acilare eficienți pentru obținerea unor conversii de peste 90 %. Modelul cinetic al reacțiilor catalizate de lipaze a permis și în acest caz obținerea unor informații esențiale cu privire la desfășurarea acestor reacții. A fost confirmată specificitatea lipazei pentru catena C₄, de data aceasta intermediarul acil-enzimă fiind format cu participarea acetatului de alchil. Lipaza pancreatică obținută în laborator s-a dovedit a fi un biocatalizator foarte eficient pentru aceste reacții. Rezultatele obținute permit obținerea chiar la nivel preparativ a unor derivați monoacilați ai dioliilor și ai altor alcooli polihidroxicilor, ca etapă intermediară în sinteze în care este necesară protejarea unei grupări hidroxilice primare.

15. Pornindu-se de la posibilitățile existente într-un laborator care nu beneficiază de dotări specifice de microbiologie și biochimie, s-a reușit obținerea unui biocatalizator cu activitate lipazică cel puțin comparabilă cu preparatele comerciale de aceeași proveniență. Acesta a avut stabilitate în timp și stabilitate operațională remarcabilă și s-a dovedit a fi catalizator eficient într-o serie de reacții de esterificare și transesterificare cu perspective aplicative. Astfel au fost sintetizați o serie de esteri de alcooli mono- și polihidroxicilici, stabilindu-se condițiile optime pentru aceste sinteze. Elaborarea unui model cinetic general pentru reacții enzimatiche reversibile de ordinul doi a făcut posibilă urmărirea desfășurării acestor procese în timp și calcularea unor parametri specifici, cu ajutorul cărora se poate exprima cantitativ specificitatea catalitică a lipazei în reacțiile studiate.

BIBLIOGRAFIE

1. K.M. Shahani (1975) în *Enzymes in Food Processing* (editor G.R. Reed), 2nd Ed., Academic Press, New York, 1975, 181-217.
2. H. Brockerhoff (1974) în *Advances in Chemistry Series, No.136, Food Related Enzymes*, American Chemical Society, New York, 131-145.
3. G.M. Frost, D.A. Moss (1987) în *Biotechnology, Volume 7a, Enzyme Technology* (editor J.F. Kennedy), Verlag Chemie, Weinheim, 65-212.
4. M. Iwai, Y. Tsujisaka (1974). *Agr. Biol. Chem.* **38**(6), 1241-1247.
5. R. Bloquel, L. Veillet-Poncet (1984). *Microbiologie-Aliments-Nutrition* **2**, 179-185.
6. Y. Ota, K. Gomi, S. Kato, T. Sugiura, Y. Minoda (1982). *Agr.Biol.Chem.* **46**(12), 2885-2993.
7. T. Nakashima, H. Fukuda, Y. Nojima, S. Nagai (1989). *J.Ferment.Bioeng.* **68**(1), 19-24.
8. G. Rivera Munoz, J.R. Tinoco-Valencia, S. Sanchez, A. Farres (1991). *Biotechnol. Lett.* **13**(4), 227-280.
9. H. Sztajer, I. Maliszewska (1984). *Biotechnol.Lett.* **11**(12), 895-898.
10. T.F. Zubenko, I.G. Sultanova, M.Z. Zakirov (1978). *Mikrobiologiya* **47**(4), 672-674.
11. C. Breuil, D.J. Kushner (1975). *Can.J.Microbiol.* **21**(4), 423-433.
12. H. Chander, H. Klostermeyer (1982). *Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.* **C3**, 427-431.
13. N. Kosaric, J.E. Zajic, G. Aboue, T. Jack, D. Gerson (1979). *Biotechnol.Bioeng.* **21**, 1133-1149.
14. N. Pal, S. Das, A.K. Kundu (1978). *J.Ferment.Technol.* **56**(6), 593-598.
15. Y. Kokusho, H. Machida, S. Iwasaki (1982). *Agr.Biol.Chem.* **46**(5), 1159-1164.
16. Y. Kokusho, H. Machida, S. Iwasaki (1982). *Agr. Biol. Chem.* **46**(7), 1743-1750.
17. M.L.F. Giuseppin (1984). *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **20**, 161-165.
18. D. Haferburg, H.P. Kleber (1982). *Acta Biotechnologica* **2**(4), 337-342.
19. B. Hüge-Jensen, F. Andreasen, T. Christensen, M. Christensen, L. Thim, E. Boel (1989). *Lipids* **24**(9), 781-789.
20. W. Brümmer, G. Gunzer (1987). în *Biotechnology, Volume 7a, Enzyme Technology* (editor J.F. Kennedy), Verlag Chemie, Weinheim, 213-278.
21. M. Höfelmann, J. Hartmann, A. Zink, P. Schreier (1985). *J.Food Sci.*, **50**(6), 1721-1725.
22. K. Aisaka, O. Terada (1981). *J.Biochem.* **89**(3), 817-822.
23. A. Sugihara, Y. Schimada, Y. Tominaga (1990). *J.Biochem.* **107**(3), 426-430.
24. Y. Shimada, A. Sugihara, T. Iizumi, Y. Tominaga (1990). *J.Biochem.* **107**(5), 703-707.
25. M.W. Baillargeon (1990). *Lipids* **25**(12), 841-848.
26. S. Okumura, M. Iwai, Y. Tsujisaka (1980). *J.Biochem.* **87**(1), 205-211.
27. M.C. Brahim-Horn, M.L. Guglielmino, L. Elling, L.G. Sparrow (1990). *Biochim Biophys.Acta* **1042**, 51-54.
28. M.C. Brahim-Horn, M.L. Guglielmino, L.G. Sparrow (1989). *J.Biotechnol.* **12**, 299-306.
29. J.F. Shaw, C.H. Chang, Y.J. Wang (1989). *Biotechnol.Lett.* **11**(11), 779-784.
30. S.Y. Lee, B.H. Lee (1989). *Biotechnol.Appl.Biochem.* **11**, 552-563 (1989).
31. R.E. Andersson (1980). *Biotechnol.Lett.* **2**(5), 247-252.
32. C. Breuil, D.J. Kushner (1975). *Can.J.Microbiol.* **21**, 434-441.
33. T. Muraoka, T. Ando, H. Okuda (1982). *J.Biochem.* **92** (6), 1933-1939.

34. J. DeMoraes, R.C. Chandan (1982). *J.Food Sci.* **47**, 1579-1583.
35. R. Verger (1984) în *Lipases* (editor B. Borgstroem), Elsevier, Amsterdam, 84-148.
36. H.L. Brockmann (1981) în *Methods in Enzymology, Vol.71*. Academic Press, New York, 1981, 619-627.
37. L. Bezakova, P. Kovacs (1981). *Biochem. Chim. Bohemoslav.* **10**(3), 149-155.
38. K.P. Müller (1977). Brevet german nr. 2.716.719 (1977).
39. M. Bier (1955) în *Methods in Enzymology, Vol.1*, Academic Press, New York, 627-642.
40. C. Erlanson-Albertsson, H.E. Akerlund (1982). *FEBS Lett.* **144**(1), 38-42.
41. G. Müller (1984). *Z.ges inn. Med.* **39**(14), 321-325.
42. Worthington Co. (1975). *The Worthington Manual*, 212-215.
43. R. Verger, G.H. De Haas, L. Sarda, P. Desnuelle (1969). *Biochim.Biophys.Acta* **188** 272-282.
44. J. De Caro, M. Boudouard, J. Bonicel, A. Guidoni, P. Desnuelle, M. Roverly (1981). *Biochim.Biophys.Acta* **671**, 129-138.
45. F. Benkouka, A. Guidoni, J. De Caro, J. Bonicel, P. Desnuelle, M. Roverly (1982). *Eu.J.Biochem.* **128**, 331-341.
46. J. De Caro, A. Guidoni, J. Bonicel, M. Roverly (1989). *Biochimie* **71**, 1211-1219.
47. F.K. Winkler, A. D'Arcy, W. Hunziker (1990). *Nature* **343**(6260), 771-774.
48. D. Blow (1991). *Nature*, **351**(6326), 444-445.
49. A.M. Brzozowski, U. Derewenda, Z.S. Derewenda, G.G. Dodson, D.M. Lawson, J.P. Turkenberg, F. Bjorkling, B. Huge-Jensen, S.A. Patkar, L.Thim (1991). *Nature* **351**(6326), 492-497.
50. Y. Tsujisaka, M. Iwai, Y. Tominaga (1973). *Agr. Biol. Chem.* **37**(6), 1457-1464.
51. G. Adoga, M. Matthey (1979). *FEMS Microbiol.Lett.* **6**, 61-63.
52. S. Tyski, W. Hryniewicz, J. Jeljaszewicz (1983). *Biochim.Biophys.Acta* **749**, 312-317.
53. W. Kugimiya, Y. Otani, Y. Hashimoto, Y. Takagi (1986). *Biochem.Biophys.Res. Commun.* **141**, 185-190.
54. C.W. Lee, J.J. Iandolo (1984). *J. Bacteriol.* **166**, 385-391.
55. S. Datta, C. Luo, W. Li, P. van Tuinen, D.H. Ledbetter, M.A. Brown, S. Chen, S. Liu, L. Chan (1988). *J.Biol.Chem.* **263**, 1107-1110.
56. E. Boel, B. Huge-Jensen, M. Christensen, L. Thim, N.P. Fiil (1988). *Lipids* **23**, 701-706.
57. Y. Hata, Y. Matsuura, N. Tanaka, M. Kakudo, A. Sugihara, M. Iwai, Y. Tsujisaka (1979). *J.Biochem.* **86**, 1821-1827.
58. F.X. Malcata, H.R. Reyes, H.S. Garcia, C.G. Hill, C.H. Amudson (1992). *Enzyme Microb.Technol.* **14**, 426-446.
59. M. Semeriva, C. Dufour, P. Desnuelle (1971). *Biochemistry* **10**, 2143-2149.
60. C. Chapus, M. Semeriva (1976). *Biochemistry* **15**, 4988-4991.
61. R.E. Purdy, P.E. Kolattukudy (1975). *Biochemistry* **14**, 2832-2840.
62. W.E. Momsen, H.L. Brockman (1976). *J.Biol.Chem.* **248**, 580-587.
63. J.W. Lagocki, J.H. Law, F.J. Kezdy (1973). *J.Biol.Chem.* **248**, 580-587.
64. M.L. Maylie, F. Charles, L. Sarda, P. Desnuelle (1969). *Biochim.Biophys.Acta* **178**, 196-198.
65. V.K. Antonov, L.M. Ginodman, T.V. Rotanova, N.N. Nutsubidze (1978). *Bioorg. Khim.* **4**, 276-277.
66. E. Antonian (1988). *Lipids* **23**, 1101-1106.
67. W. Köller, P.E. Kolattukudy (1982). *Biochemistry*, **21**, 3083-3090.

68. M. Isobe, M. Sugiura (1977). *Chem.Pharm.Bull.* **25**, 1980-1986.
69. J.S. Twu, A.S. Garfinkel, M.C. Schotz (1984). *Biochim.Biophys.Acta* **792**, 330-337.
70. P.E. Fielding, V.G. Shore, C.J. Fielding (1974). *Biochemistry* **13**, 4318-4323.
71. R.G. Jensen, D.R. Galuzzo, V.J. Bush (1990). *Biocatalysis* **3**, 307-316.
72. M. Sugiura, M. Isobe (1975). *Chem.Pharm.Bull.* **23**, 1226-1230.
73. M. Sugiura, T. Oikawa, K. Hirano, T. Inukai (1977). *Biochim.Biophys.Acta* **488**, 353-358.
74. G. Benzonana, S. Esposito (1971). *Biochim.Biophys.Acta* **231**, 15-22.
75. S. Okumura, M. Iwai, S. Tsujisaka (1976). *Agr. Biol. Chem.* **40**, 665-660.
76. Y. Tsujisaka, S. Okumura, M. Iwai (1977). *Biochim.Biophys.Acta* **489**, 415-422.
77. H. Janssen, M.C. Oerlemans, W.C. Hulsmann (1977). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **77**, 861-867.
78. G. Benzonana (1974). *Lipids* **9**, 166-172.
79. P.E. Sonnet (1988). *J.Am. Oil Chem.Soc.* **65**, 900-904.
80. G.J. Moskowitz, R. Cassaigne, I.R. West, T. Shen, L.I. Feldman (1977). *J.Agric. Food Chem.* **25**, 1146-1150.
81. G. Langrand, N. Rondot, C. Triantaphylides, J. Baratti (1990). *J.Biotechnol.Lett.* **12**, 581-586.
82. B.H. Jensen, D.R. Galuzzo, R.G. Jensen (1987). *Lipids* **22**, 559-565.
83. K.D. Mukherjee (1990). *Biocatalysis*, **3**, 277-293
84. E. Schoffers, A. Golebiowski, C.R. Johnson (1996). *Tetrahedron* **52**(11), 3769-3826.
85. D.V. Roberts (1977). *Enzyme Kinetics*, Cambridge University Press, Cambridge.
86. P.C. Engel (1981). *Enzyme Kinetics. The Steady-State Approach*, 2nd Ed., Chapman and Hall, London.
87. D. Piszkiwicz (1977). *Kinetics of Chemical and Enzyme-Catalyzed Reactions*, Oxford University Press, New York, 79-148.
88. M.L. Bender, L.J. Brubacher (1973). *Catalysis and Enzyme Action*, McGraw-Hill, New York, 15-36.
89. A. Cornish-Bowden (1984) in *Comprehensive Biotechnology, Vol.1, Section 2: Chemical and Biological Fundamentals* (editor M.Moo Young), Pergamon Press, New York, 521-538.
90. A. Zaks, A.M. Klibanov (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3192-3196.
91. P.J. Halling (1989). *Biochem.Soc. Trans.* **17**, 1142-1145.
92. H.L. Brockman, J.H. Law, F.J. Kezdy (1973). *J.Biol.Chem.* **248** (14), 4965-4970.
93. R. Verger (1980) in *Methods in Enzymology. Vol. 64 (Enzyme Kinetics and Mechanism, Part B)*, Academic Press, New York, 340-392.
94. H. Brockerhoff (1974). *Bioorg.Chem.* **3**, 176-183.
95. S. Mukataka, T. Kobayashi, J. Takahishi (1985). *J.Ferment.Technol.* **63**(5), 461-466.
96. V. Kery, J. Trancikova, S. Schmidt (1989). *Collect.Czech.Chem.Commun.* **54**, 2809-2813.
97. Y. Kosugi, H. Suzuki (1983). *J.Ferment.Technol.* **61** (3), 287-294.
98. Y. Miyake, M. Ohkubo, M. Teramoto (1991). *Biotechnol.Bioeng.* **38**, 30-36.
99. P.D.I. Fletcher, B.H. Robinson (1985). *J.Chem.Soc.Faraday Trans.I.* **81**, 2667-2679.
100. D. Han, J.S. Rhee, S.B. Lee, *Biotechnol.Bioeng.* **30**, 381-388 (1987).
101. H. Deleuze, G. Langrand, H. Millet, J. Baratti, G. Buono, C. Triantaphylides (1987). *Biochim.Biophys. Acta* **911**, 117-120.
102. G.Langrand, J.Baratti, G.Buono, C.Triantaphylides (1988). *Biocatalysis* **1**, 231-248.

103. J. Baratti, M.S. Rangheard, G. Langrand, C. Triantaphylides (1988) în "Proceedings of the World Conference on Biotechnology for the Fats and Oils Industry" (editor T.H.Applewhite), American Oil Chemist's Society, Champaign IL, 164-167.
104. M.S. Rangheard, G. Langrand, C. Triantaphylides J. Baratti (1989). *Biochim.Biophys Acta* **1004**, 20-28 (1989).
105. D.A. Miller, J.M. Prausnits, H.W. Blanch (1991). *Enzyme Microb.Technol.* **3**, 98-103.
106. T.N.B. Kaimal, M. Saroja (1989). *Biochim.Biophys. Acta.* **999**, 331-334.
107. M. Semeriva, P. Desnuelle (1979). *Adv.Enzymol.* **48**, 319-370.
108. A. Louvrier, G.J. Drtina, A.M. Klibanov (1996). *Biotechnol.Bioeng.* **50**, 1-5.
109. M.S. Rangheard, G. Langrand, C. Triantaphylides J. Baratti (1992). *Enzyme Microb Technol.* **14**, 966-973.
110. G. Benzonana, P. Desnuelle (1965). *Biochim.Biophys. Acta* **105**, 121-136.
111. H.W. Anthonsen, A. Baptista, F. Drablos, P. Martel, S.B. Petersen, M. Sebastiao, L. Vaz (1995) în *Biotechnology Annual Review* (editor M.R. El-Gewely), 315-371.
112. S.G. Neidleman (1990) în *Biocatalysis* (editor D. Abramowicz), Van Nostrand Reinhold, New York, 1-24.
113. K. Faber (1995). *Biotransformations in Organic Chemistry*, 2nd Ed., Springer-Verlag, Heidelberg.
114. J. Tramper, H.C. van der Plas, P. Linko (editori) (1985). *Biocatalysis in Organic Synthesis*, Elsevier, Amsterdam.
115. C. Laane, J. Tramper, M.D. Lilly (editori) (1987). *Biocatalysis in Organic Media*, Elsevier, Amsterdam.
116. J. Tramper, M.H. Vermue, H.H. Beeffink, U. von Stockar (editori) (1992). *Biocatalysis in Non-Conventional Media (Progress in Biotechnology, Vol. 8)*, Elsevier, Amsterdam.
117. H.G. Davies, R.H. Green, D.R. Kelly, S.M. Roberts (1989). *Biotransformations in Preparative Organic Chemistry*, Academic Press, London.
118. G. Zarnea, G. Mencinicopschi, S. Brăgărea (1980). *Bioingineria preparatelor enzimatică microbiene*, Ed.Tehnică, București.
119. K. Kieslich (1984) în *Biotransformations în Biotechnology, Vol. 6a* (editori H.J. Rehm, G. Reed) Verlag Chemie, Weinheim.
120. R. Azerad (1995). *Bull.Soc.Chim.Fr.* **132**, 17-51.
121. R.A. Sheldon (1993). *Chirotechnology: Industrial Synthesis of Optically Active Compounds*, Marcel Dekker, New York, 205-270.
122. F. Peter, G. Preda, C. Csunderlik (1995) în *A 21-a Sesiune de Comunicări Științifice, Călimănești-Căciulata, 25-27 octombrie 1995, Vol. 1*, Centrul de Cercetări OLTCHIM, Râmnicu-Vâlcea, 34-51.
123. M. Mahmoudian, B.S. Baines, M.J. Dawson, G.C. Lawrence (1992). *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 911-916.
124. H. Yanase, T. Arishima, K. Kita, J. Nagai, S. Mizuno, Y. Takuma, K. Endo, N. Kato (1993). *Biosci.Biotech.Biochem.* **57**(8), 1334-1337.
125. S.W. Tsai, H.J. Wei (1994). *Enzyme Microb.Technol.* **16**, 328-333.
126. S.W. Tsai, H.J. Wei (1994). *Biotechnol.Bioeng.* **43**, 64-68.
127. C. Cantarelli (1984). *Industria Alimentari*, 845-852.
128. A. Kilara, K.M. Shahani (1979). *CRC Crit.Rew.Food Sci. Nutr.*, 161-198.
129. F.X. Malcata, C.G. Hill, C.H. Amudson (1991). *Biotechnol.Bioeng.* **38**, 853-868.
130. F.X. Malcata, H.S. Garcia, C.G. Hill, C.H. Amudson (1992). *Biotechnol.Bioeng.* **39**, 647-657.

131. F.X. Malcata, C.G. Hill, C.H. Amudson (1992). *Biotechnol.Bioeng.* **39**, 984-1001.
132. F.X. Malcata, C.G. Hill, C.H. Amudsen (1992). *Biotechnol.Bioeng.* **39**, 1002-1012.
133. F.X. Malcata, C.G. Hill, C.H. Amudsen (1992). *Biotechnol.Bioeng.* **39**, 1097-1111.
134. P. Chalier, J. Crouzet (1992). *Biotechnol. Lett.* **14**(4), 275-280.
135. M Zarevucka, M. Rejzek, L. Streinz, D. Saman, Z. Wimmer (1995) în *Bioflavour '95*, Ed. INRA Paris (Les Colloques n°75), 345-349.
136. M Zarevucka, M. Rejzek, Z Wimmer, J. Zima, Q.Y. Zhao, M.D. Legoy (1995). *Biotechnol.Lett.* **17**(12), 1317-1320.
137. F. Monot (1994). *Revue de l'Institut Français de Pétrole* **49**(2), 187-208.
138. A.L. Margolin, J.Y. Crenne, A.M. Klibanov (1987). *Tetrahedron Lett.* **28**, 1607-1610.
139. J.S. Dordick (1992). *Trends Biotechnol.* **10**, 287-293.
140. S. Okumura, M. Iwai, Y. Tominaga (1984). *Agric.Biol.Chem.* **48**, 2805-2808.
141. J. S. Wallace, C.J. Morrow (1989). *J.Polym.Sci. Part A: Polym.Chem.* **27**, 2553-2567.
142. A.L. Margolin, P.A. Fitzpatrick, P. Dubin, A.M. Klibanov (1991). *J.Am.Chem.Soc.* **113**, 4693-4694.
143. A.L. Margolin, A.M. Klibanov (1987). *J.Am.Chem.Soc.* **109**, 3802-3804.
144. J.R. Matos, J. Blair-West, C.H. Wong (1987). *Biotechnol.Lett.* **9**, 233-236.
145. T. Yamane, T. Funada, S. Ishida (1982). *J.Ferment.Technol.* **60**(6), 517-523.
146. G. Bell, J.R. Todd (1981). *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 1703-1719.
147. Y. Kimura, A.Tanaka, K. Sonomoto, T. Nihira, S. Fukui (1983). *Eur.J.Appl.Microbiol.Biotechnol.* **17**, 107-112.
148. Y. Kosugi, H. Suzuki (1992). *Biotechnol.Bioeng.* **40**, 369-374.
149. P.M. Bailie, S.E. McNerlan,, E. Robinson, W.R. Murphy (1995). *Trans IChemE*, **73**, Part C, 71-76.
150. D. Yang, J.S. Rhee (1992). *Biotechnol.Bioeng.* **40**, 748-752.
151. F. Taylor, C.C. Panzer, J.C. Craig, D.J. O'Brien (1986). *Biotechnol.Bioeng.* **28**, 1318-1322.
152. F. Taylor, M.J. Kurantz, J.C. Craig (1992). *J.Am. Oil Chem.Soc.* **69**(6), 591-594.
153. M de Renobales, I. Agud, J.M. Lascary, J.C. Mugica, L.C. Landeta, R. Solozabal (1992). *Biotechnol.Lett.* **14**(8), 683-688.
154. F. Peter, V. Popoviciu (1989) în *Lucrările celui de-al IX-lea Congres Național de Farmacie, 28-30 sept.1989 București*, Uniunea Societăților de Stiințe Medicale, București, 237.
155. F. Peter, V. Popoviciu, M. Anderca, G. Bandur (1996). *Revista de Medicină și Farmacie* (Tg. Mureș) **42** (Supl. II), 69-70.
156. F.J. Plou, M. Baradiaran, M.V. Calvo, A. Ballesteros, R. Pastor (1996). *Enzyme Microb.Technol.* **18**, 66-71.
157. Y. Kosugi, H. Suzuki, T. Funada (1988). *Biotechnol Bioeng.* **31**, 349-356.
158. H. Uzawa, Y. Nishida, H. Ohru, H. Meguro (1990). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **168**, 506-511.
159. H. Uzawa, H. Ohru, H. Meguro, T. Mase, A. Ichida (1993). *Biochim.Biophys.Acta* **1169**, 165-168.
160. M.P. Schneider (1995) în: *Biocatalysis in Organic Synthesis*, Milano, 13-17 martie 1995 (nepublicat).
161. B. Cambou, A.M. Klibanov (1984). *Biotechnol.Bioeng.* **26**, 1449-1454.
162. Rhône-Poulenc Ind. (1979). *Brevet francez nr. 2.454.465*.
163. S. Iriuchajima, N. Kojima (1982). *Agric.Biol.Chem.* **46**(5), 1153-1157.
164. W.E. Ladner, G.M. Whitesides (1984). *J.Am.Chem.Soc.* **106**, 7250-7251.

165. T.V. Hansen, V. Waagen, V. Partali, H.W. Antonsen, T. Anthonsen (1995). *Tetrahedron: Asymmetry* **6**, 499-504.
166. E. Foelsche., A. Hickel, H. Hönig, P. Seuffer-Wasserthal (1990). *J.Org.Chem.* **55**, 1749-1753.
167. H. Hönig, P. Seuffer-Wasserthal (1990). *Synthesis* **12**, 1137-1139.
168. P. Kalaritis, R.W. Regenye, J.J.Partridge, D.L.Coffen (1990). *J.Org.Chem.* **55**, 812-815.
169. T.Itoh, K.Kuroda, M.Tomosada, Y.Takagi (1991). *J.Org.Chem.* **56**, (2), 797-804.
170. N.Klempier, K.Faber, H.Griengl (1989). *Synthesis* **12**, 933-934.
171. T.Miyazawa, T.Takitani, S.Ueji, T.Yamada, S.Kuwata (1988). *J.Chem.Soc.Chem. Commun.* 1214-1215.
172. G. Guibé-Jampel, G. Rousseau, J. Salaün (1987). *J. Chem.Soc.Commun.* 1080-1081.
173. E. Holmberg, E. Dahlen, T. Norin, K. Huld (1991). *Biocatalysis* **4**, 305-312.
174. D.L. Hughes, J.J. Bergan, J.S. Amato, M. Bhupathy, J.L. Leazer, J.M. McNamara, D.R. Sidler, P.J. Reider, E.J.J. Grabowski (1991). *J.Org.Chem.* **55**, 6252-6259.
175. S.H. Wu, Z.W. Guo, C.J. Sih (1990). *J.Am.Chem.Soc.* **112** (5), 1990-1995.
176. S. Tsujisaka, S. Okumura, M. Iwai (1977). *Biochim.Biophys.Acta* **489**, 415-422.
177. A.R. Macrae (1989). *Biochem.Soc.Trans.* **17**, 1146-1148.
178. M.T. Reetz, A. Zonta, J. Simpelkamp (1996). *Biotechnol.Bioeng.* **49**, 527-534.
179. K. Kawakami, S. Yoshida (1996). *J.Ferment.Bioeng.* **82**(3), 239-245.
180. K. Kawakami, S. Yoshida (1994). *Biotechnol.Tech.* **8**(6), 441-446.
181. K. Kawakami, S. Yoshida (1995). *Biotechnol.Tech.* **9**(10), 701-704.
182. K. Kawakami, S. Yoshida (1996). *Biotechnol.Tech.* **10**(7), 491-494.
183. R.H. Valivety, P.J. Halling, A.R. Macrae (1992). *FEBS Letters* **301**(3), 258-260.
184. T. Dumont, D. Barth, C. Corbier, G. Branlant, M. Perrut (1992). *Biotechnol.Bioeng.* **39**, 329-333.
185. Y. Ikushima, N. Saito, K. Hatakeda, O. Sato (1996). *Chem.Eng.Sci.* **51**(11), 2817-2822.
186. Y. Ikushima, N. Saito, M. Arai (1996). *J.Chem.Eng.Jpn.* **29**(3), 551-553.
187. V. Raț, A. Andrei, F. Peter, G. Raț, A. Grozav, G. Balea (1995). *Supercritical fluids. II. Enzymatic reactions in supercritical fluids*, Seria Monografii de Chimie, Nr. 7, Universitatea de Vest Timișoara, 9-14.
188. A. Marty, W. Chulalaksananukul, R.M. Willemot, J.S. Condoret (1992). *Biotechnol. Bioeng.* **39**, 273-280.
189. U. Bornschauer, A. Capewell, V. Wendel, T. Scheper (1996). *J.Biotechnol.* **46**, 139-143.
190. A. Capewell, V. Wendel, U. Bornschauer, H.H.Meyer, T. Scheper (1996). *Enzyme Microb. Technol.* **19**, 181-186.
191. A. Chrisocoou, K. Schaber (1996). *Chem.Eng.Process.* **35**, 271-282.
192. E. Cernia, C. Palocci, F. Gasparrini, D. Misiti, N. Fagnano (1994). *J.Mol.Catal.* **89**, L11-L18.
193. G. Glowacz, M. Barislowich, M. Linke, P. Richter, C. Fuchs, J.T. Mörsel (1996). *Chem.Phys.Lipids* **79**, 101-106.
194. S.A. Khan, P.J. Halling, G. Bell (1990). *Enzyme Microb. Technol.* **12**, 453-458.
195. R.H. Valivety, P.J. Halling, A.D. Peilow, A.R. Macrae (1992). *Biochim.Biophys.Acta* **1122**, 143-146.
196. S.W. May (1992). *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 80-84.
197. S. Ferreira-Dias, M.M.R. de Fonseca (1995). *Bioprocess Engineering* **12**, 327-337.

198. L. Kvittingen, B. Sjursnes, T. Anthonsen, P.J. Halling (1992). *Tetrahedron* **48**(13), 2793-2802.
199. B. Sjursnes, L. Kvittingen, T. Antonsen (1992) în *Biocatalysis in Non-Conventional Media, Progress in Biotechnology, Vol. 8*, (editor J. Tramper ș.a.), Elsevier, Amsterdam, 451-457.
200. B.W. Werdelmann, R.D. Schmid (1982). *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **84**(11), 436-443.
201. F.D. Gunstone (1989). *Biochem.Soc.Trans.*, **17**, 1141-1145.
202. A. Nagao, M. Kito (1990). *Biocatalysis*, **3**, 295-305.
203. M. Pina, J. Graille (1983). *Gattefosse Report* **76**, 34-36.
204. M.M. Hoq, T. Yamane, S. Shimizu, T. Funada, S.Ishida (1984). *J.Am.Oil Chem.Soc.* **61**, 776-781.
205. A. Gupte, R. Nagarajan, A. Kilara (1995) în *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence* (editor G. Charalambous), Elsevier, Amsterdam, 1-74.
206. S. Morita, H. Narita, T. Matoba, M.Kito (1984). *J.Am.Oil Chem.Soc.* **61**(10), 1571-1574.
207. D.G. Hayes, E. Gulari (1991). *Biotechnol.Bioeng.* **38**, 507-517.
208. O. Papendorf, B. Steffen, S. Lang, F. Wagner (1995). *Chimica Oggi/Chemistry Today*, 17-20.
209. G. Langrand, C. Triantaphylides, J. Baratti (1988). *Biotechnol.Lett.* **10**(8), 549-554.
210. S. Okumura, M. Iwai, Y. Tsujisaka (1979). *Biochim.Biophys.Acta* **575**, 156-165.
211. G. Lazar (1985). *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **87**(10), 394-400.
212. I. Ikeda, I. Sato, K. Suzuki (1991). *Sen-i Gakkaishi* **47**(4), 198-202.
213. F. Fontayn, G. Lognay, M. Marlier (1995). *Med.Fac.Landbouww.Univ.Gent* **60/4a**, 1969-1975.
214. L. Gubicza, A. Szakács-Schmidt (1995). *Med.Fac.Landbouww.Univ.Gent* **60/4a**, 1977-1982.
215. S. Bloomer, P. Adlercreutz, B. Mattiasson (1992). *Enzyme Microb.Technol.* **14**, 546-551.
216. S. Bloomer, P. Adlercreutz, B. Mattiasson (1992). *J.Am. Oil Chem.Soc.* **69**(10), 966-973.
217. G. Carta, J.L. Gainer, A.H. Benton (1991). *Biotechnol.Bioeng.* **37**, 1004-1009.
218. G. Carta, J.L. Gainer, M.E. Gibson (1992). *Enzyme Microb.Technol.* **14**, 904-909.
219. F. Borzeix, F. Monot, J.P. Vandecasteele (1992). *Enzyme Microb.Technol.* **14**, 791-796.
220. H. Stamatis, A. Xenakis, M. Provelengioui, F.N. Kolisis (1993). *Biotechnol.Bioeng.* **42**, 103-110.
221. H. Stamatis, A. Xenakis, H. Sztajer, U. Menge, F.N. Kolisis (1992) în *Biocatalysis in Non-Conventional Media, Progress in Biotechnology, Vol. 8*, (editor J. Tramper ș.a.), Elsevier, Amsterdam, 733-738.
222. H. Stamatis, A. Xenakis, U. Menge, F.N. Kolisis (1993). *Biotechnol.Bioeng.* **42**, 931-937.
223. S. Backlund, F. Eriksson, L.T. Kanerva, M. Rantala (1995). *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces* **4**, 121-127.
224. K.H. Mukherjee (1995). *Ol.Corps Gras Lipides* **2**(5), 365-368.
225. D.F. Horrobin (1992). *Prog.Lipid Res.* **31**, 163-194.
226. M.J. Hills, I. Kiewitt, K.D. Mukherjee (1990). *Biochim.Biophys.Acta* **1042**, 237-240.
227. M.J. Hills, I. Kiewitt, K.D. Mukherjee (1990), *J.Am. Oil Chem.Soc.* **67**, 561-564.

228. P. Langholz, P. Andersen, T. Forskov, W. Schmitsdorf (1989). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **66**, 1120-1123.
229. M.J. Hills, I. Kiewitt, K.D. Mukherjee (1989), *Biotechnol. Lett.* **11**, 629-632.
230. M.S.K. Syed Rahmatullah, V.K.S. Shukla, K.D. Mukherjee (1994). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**, 563-567.
231. K.D. Mukherjee, I. Kiewitt (1991). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 579-584.
232. M. Cygler, P. Grochulski, J.D. Schrag (1995). *Can. J. Microbiol.* **41**(suppl. 1), 289-296.
233. H. Noritomi, Ö. Almarsson, G.L. Barletta, A.M. Klibanov (1996). *Biotechnol. Bioeng.* **51**, 95-99.
234. D. Gerlach, D. Lutz, B. Meg, P. Schreyer (1989). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **189**, 141-143.
235. G. Kirchner, M.P. Scollar, A.M. Klibanov (1985). *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7072-7076.
236. J. Ceynova, I. Sionkowska (1993). *Acta Biotechnol.* **13**(2), 177-183.
237. J. Bodnar, L. Gubicza, L.P. Szabo (1990). *J. Mol. Catal.* **61**, 353-361.
238. L. Gubicza (1992) in *Biocatalysis in Non-Conventional Media, Progress in Biotechnology, Vol. 8*, (editor J. Tramper s.a.), Elsevier, Amsterdam, 497-503.
239. I. Gubicza, I. Kelemen-Horváth (1993). *J. Mol. Catal.* **84**, L27-L32.
240. L. Gubicza, A. Szakács-Schmidt (1994). *Biocatalysis*, **9**, 131-143.
241. L. Gubicza, A. Szakács-Schmidt (1995). *Biotechnol. Tech.* **9**(9), 687-690.
242. H.S. Wu, C.C. Akoh, R.S. Phillips (1996). *Enzyme Microb. Technol.* **18**, 536-539.
243. M. Therisod, A.M. Klibanov (1986). *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 5638-5640.
244. M. Therisod, A.M. Klibanov (1987). *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3977-3981.
245. J. Chopineau, F.D. McCafferty, M. Therisod, A.M. Klibanov (1988). *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 536-546.
246. G.B. Oguntimein, H. Erdmann, R.D. Schmidt (1993). *Biotechnol. Lett.* **15**(2), 175-180.
247. M. Wouнденberg-van Oosterom, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon (1996). *Biotechnol. Bioeng.* **49**, 328-33.
248. O.J. Park, H.G. Park, J.W. Yang (1996). *Biotechnol. Lett.* **18**(4), 473-478.
249. I. Ikeda, A.M. Klibanov (1993). *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 788-791.
250. A.T.J.W. de Goede, M. van Oosterom, M.P.J. van Deuzen, R.A. Sheldon, H. van Bekkum, F. van Rantwijk (1994). *Biocatalysis* **9**, 145-155.
251. D.B. Sarney, E.N. Vulfson (1994). *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* **59/4b**, 2321-2330.
252. E.N. Vulfson (1991) in *Surfactants in Lipid Chemistry: Recent Synthetic, Physical, and Biodegradative Studies* (editor J.H.P. Tyman), Royal Society of Chemistry, London, 16-37.
253. G. Fregrapane, D.B. Sarney, E.N. Vulfson (1991). *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 796-800.
254. G. Fregrapane, D.B. Sarney, S.G. Greenberg, D.J. Knight, E.N. Vulfson (1992) in *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (editor J. Tramper s.a.), Elsevier, Amsterdam, 563-568.
255. G. Fregrapane, D.B. Sarney, S.G. Greenberg, D.J. Knight, E.N. Vulfson (1994). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**(1), 87-91.
256. G. Fregrapane, D.B. Sarney, E.N. Vulfson (1994). *Biocatalysis* **11**, 9-18.
257. D.B. Sarney, H. Kapeller, G. Fregrapane, E.N. Vulfson (1994). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**(7), 711-714.

258. K. Adelhorst, F. Björkling, S.E. Godtfredsen, O. Kirk (1990). *Synthesis* No.2, 112-115.
259. D.C. Palmer, F. Terradas (1994). *Tetrahedron Lett.* **35**(11),1673-1676.
260. M.A. Cruces, C. Otero, M. Bernabe, M. Martin-Lomas, A. Ballesteros (1992) în *Enzyme Engineering XI, Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 672*, New York, 436-443.
261. C.C. Akoh (1994). *J.Am.Oil Chem.Soc.* **71**(3), 319-323.
262. P. Adlercreutz (1994) în *Biotechnol.Gen.Eng. Reviews* Vol. 12 (editor M.P. Tombs), Intercept Ltd., Andover, Hampshire, 231-254.
263. C.C. Akoh (1996) în *Food Lipids and Health* (editori R.E. Mc Donald, D.B. Min), Marcel Dekker, NewYork, 117-138.
264. A.R. Macrae (1985) în *Biocatalysts in Organic Syntheses* (editor J. Tramper ş.a.), Elsevier, Amsterdam,195-208.
265. S. Ghoshray, D.K. Battacharya (1992). *J.Am. Oil Chem.Soc.* **69**(1), 85-89.
266. G.P. MCNeill, S. Shimizu, T. Yamane (1990). *J.Am. Oil Chem.Soc.* **67**(11), 779-783.
267. G.P. MCNeill, S. Shimizu, T. Yamane (1991). *J.Am. Oil Chem.Soc.* **68**(1), 1-5.
268. G.P. MCNeill, T. Yamane (1991). *J.Am. Oil Chem.Soc.* **68**(1), 6-10.
269. R. Roşu, Y. Uozaki, Y. Iwasaki, T. Yamane (1997). *J.Am. Oil Chem.Soc.* **74**(4), 445-450.
270. C. Ratledge (1989). *Biochem Soc.Trans.* **17**, 1139-1141.
271. T. Nielsen (1985). *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **87**(1), 15-19.
272. A.R. Macrae (1983). *J.Am.Oil Chem.Soc.* **60**(2), 291-294.
273. C.N. Chong, Y.M. Hoh, C.W. Wang (1992) *J.Am. Oil Chem.Soc.* **69**(2), 137-140.
274. P. Forssell, R. Kervinen, M. Lappi, P. Linko, T. Suortti, K. Poutanen (1992). *J.Am. Oil Chem.Soc.* **69**(2), 126-129.
275. K.H. Huang, C.C. Akoh (1996). *J.Am.Oil Chem.Soc.* **73**(2),245-250.
276. D.B. Sarney, G. Fregrapane, E.N. Vulfson (1994). *J.Am.Oil Chem.Soc.* **71**(1), 93-96.
277. I. Svensson, P. Adlercreutz, B. Mattiasson (1990). *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **33**, 255-258.
278. I. Svensson, P. Adlercreutz, B. Mattiasson (1992). *J.Am.Oil Chem.Soc.* **69**, 896-991.
279. I. Svensson, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, I. Miesiz, K. Larsson (1993). *Chem.Phys. Lipids* **66**, 195-197.
280. A. Zaks, A.M. Klibanov (1984). *Science* **224**, 1249-1251.
281. M.Moo Young (editor) (1984). *Comprehensive Biotechnolgy, Vol.3*, Pergamon Press, New York, 830-835.
282. T. Tosa, T. Shibatani (1995). *Ann. New York Acad.Sci.* **750**, 364-375.
283. T. Shibatani (1996). în *Immobilized Cells: Basics and Applications* (editori R.H. Wijfels, R.M. Buitelaar, C. Bucke, J. Tramper), Elsevier, Amsterdam, 585-591.
284. R. Lortie, M. Trani, F. Ergon (1992). în *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (editor J. Tramper ş.a.), Elsevier, Amsterdam, 519-524.
285. G. Carrea, G. Ottolina, S. Riva, F. Secundo (1992) în *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (editor J. Tramper ş.a.), Elsevier, Amsterdam, 111-119.
286. Y.Y. Linko, O. Rantanen, H.C. Yu, P. Linko (1992) în *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (editor J. Tramper ş.a.), Elsevier, Amsterdam, 601-608.
287. R. Bacaloglu, A. Anghel, G. Musca, G. Pop, F. Peter (1986) în *Microsimpozion ICECHIM*, Bucureşti, 24-25 ianuarie 1986.
288. F. Peter, A. Anghel, M. Bota (1995). *Chem.Bull.Tech.Univ.(Timișoara)* **40**(54), 49-56.
289. D.D. Perrin, B. Dempsey (1983). *Buffers for pH and Metal Ion Control*, Chapman and Hall, London.

290. F. Peter, A. Anghel, C. Popa A. Sârbu (1995). *Simpozionul "Resurse și Dezvoltare în Industria Alimentară"*, Institutul de Chimie Alimentară, București, 28-29 noiembrie 1995.
291. U.R. Desai, A.M. Klibanov (1995). *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 3940-3945.
292. U.R. Desai, J.J. Osterhut, A.M. Klibanov (1994). *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 9420-9422.
293. P.A. Burke, R.G. Griffin, A.M. Klibanov (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 20057-20064.
294. R. Bacaloglu, F. Peter, G. Musca, G. Pop (1986). *Microsimpozion ICECHIM*, București, 24-25 ianuarie 1986.
295. F. Peter, E. Deretey, A. Anghel, R. Roșu, B. Pinteș (1993) în *Al II-lea Simpozion Național de Cataliză, 7-8 oct. 1993 București*, Rezumate, Societatea de cataliză din România, București, 89.
296. E. Jercan (1983). *Metode de separare în Chimia analitică*, Editura Tehnică, București.
297. F. Peter, C. Kiss, G. Preda (1998). *Chem. Bull. Univ. POLITEHNICA*, în curs de publicare.
298. W. Ferdinand (1976). *The Enzyme Molecule*, John Wiley & Sons, Chichester.
299. A.M. Klibanov (1995). *Nature*, **374**, 596.
300. R.J. Kazlauskas, U.T. Bornschauer (1998). în *Biotechnology, 2nd Edition, Volume 8a: Biotransformations* (Editori H.J. Rehm, G. Reed), Wiley-VCH, Weinheim, 38-191.
301. H. Noritomi, Ö. Almarsson, G.L. Barletta, A.M. Klibanov (1996). *Biotechnol. Bioeng.*, **51**, 95-99.
302. F. Peter, E. Deretey, R. Vâlceanu (1989). *A XV-a Sesiune de Comunicări Științifice*, Călimănești, 19-21 octombrie 1989.
303. J.A. Riddick, W.B. Bunger (1970). *Organic Solvents. Physical Properties and Methods of Purification, 3rd Ed.*, Wiley-Interscience, New York.
304. F. Peter, A. Anghel, R. Vâlceanu (1987). *A XIII-a Sesiune de Comunicări Științifice*, Călimănești, 15-17 octombrie 1987.
305. F. Peter, R. Vâlceanu, E. Deretey, A. Anghel, C. Csunderlik (1988). *A XIV-a Sesiune de Comunicări Științifice*, Călimănești, 13-15 octombrie 1988.
306. F. Peter, A. Anghel, R. Vâlceanu, C. Csunderlik, E. Deretey, A. Vlad (1988) în *Al III-lea Congres Național de Chimie*, 21-24 sept. 1988 București, Rezumate, Vol. III, Academia Română, București, 773.
307. R.C. Weast (Editor) (1988). *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 1st Student Edition*, CRC Press, Boca Raton, Florida,
308. F. Peter, R. Roșu (1994). *Științe și Tehnologii Alimentare* **2**(1), 33-37.
309. F. Peter, G. Preda, A. Chiriac (1998). *Lipaze: obținere, cinetică, utilizări. 1. Obținerea, purificarea și caracterizarea lipazelor*, Seria Monografii de Chimie, Nr. 17, Universitatea de Vest, Timișoara, 1-25.
310. F. Peter, G. Preda, A. Chiriac (1998). *Lipaze: obținere, cinetică, utilizări. 2. Cinetica și mecanismul reacțiilor catalizate de lipaze*, Seria Monografii de Chimie, Nr. 18, Universitatea de Vest, Timișoara, 1-24.
311. F. Peter, G. Preda, A. Chiriac (1998). *Lipaze: obținere, cinetică, utilizări. 3. Utilizarea lipazelor drept biocatalizatori în sinteze organice*, Seria Monografii de Chimie, Nr. 19, Universitatea de Vest, Timișoara, 1-36.
312. E.E. Reid (1970). *J. Am. Chem. Soc.*, **43**, 489-504.
313. U.T. Bornschauer (1995). *Enzyme Microb. Technol.*, **17**, 578-586.
314. A.J.J. Straathof, J.L.L. Rakels, J.J. Heinen (1992) în *Biocatalysis in Non-Conventional Media* (Editori J. Tramper ș.a.), Elsevier, Amsterdam, 137-144.

315. A. Janssen (1993). *Enzymatic Synthesis of Polyol Esters in Aqueous-Organic Two-Phase Systems*, Teză de doctorat, CIP-Gegevens Koninklijke Bibliotheek, Den Haag.
316. P.J. Halling (1987) în *Biocatalysis in Organic Media* (Editor C. Laane ș.a.), Elsevier, Amsterdam, 125-132.
317. F.J. Plou, M. Barandiaran, M.V. Calvo, A. Ballesteros, E. Pastor (1996). *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 66-71.
318. A. Coteron, M. Martinez, J. Aracil (1998). *J. Am. Oil Chem.Soc.* **75**(5), 657-660.
319. M. Berger, M.P. Schneider (1992). *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 961-965.
320. K.T. Lee, C.C Akoh (1998). *J. Am. Chem. Soc.*, **75**(4), 495-499.
321. C. Edmundo, V. Dossat, D. Combes, A. Marty (1998). *J. Am. Chem. Soc.*, **75**(2), 309-313.
322. R. Bacaloglu, G. Musca, G. Pop, F. Peter (1985). *Rev. Roum. Biochim.* **22**(3), 177-181.
323. R. Bacaloglu, G. Musca, G. Pop, F. Peter (1985). *Microsimpozion ICECHIM*, București, 25-26 ianuarie 1985.
324. F. Peter, C. Popa, C. Csunderlik (1995). *Al IV-lea Simpozion Național de Cataliză*, Ploiești, 21-22 septembrie 1995.
325. R. Bacaloglu, A. Anghel, A. Sauciuc, A. Stoi, G. Pop, G. Musca, F. Peter, T. Hava, C. Boeriu, A. Blasko, S.Eisler (1986), Brevet România nr. 95.942 (Cl. C 12 N 9/50).
326. R Bacaloglu, A. Anghel, A. Stoi, G. Pop, G. Musca, F. Peter, T. Hava, C. Boeriu, A. Blasko, S. Eisler (1986), Brevet România nr. 95.943 (Cl. C 12 N 9/50).