

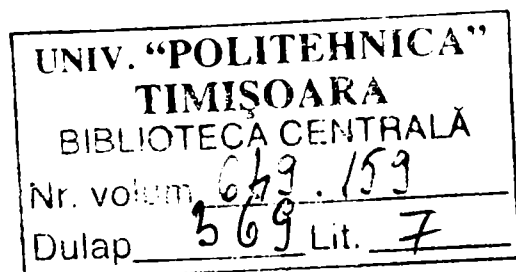
Ing. CLAUDIA KISS

**SINTEZE ENANTIOSELECTIVE PRIN
BIOTRANSFORMĂRI ENZIMATICE ÎN CLASA
DERIVAȚILOR FUNCȚIONALI AI ACIZILOR
CARBOXILICI**

TEZĂ DE DOCTORAT

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:

Prof. Dr. Chim. CAROL CSUNDERLIK



Timișoara
- 2006 -

Lui Andreas si Claudiu

CUPRINS

	Pag.
Introducere	1
1. Date de literatură	2
1.1. Introducere în enzimologie	2
1.1.1. Noțiuni generale despre enzime	2
1.1.2. Clasificarea, nomenclatura și codificarea enzimelor	4
1.1.3. Organizarea structurală a enzimelor	5
1.1.4. Activitatea enzimelor	5
1.2. Hidrolaze și lipaze	7
1.2.1. Noțiuni generale	7
1.2.2. Clasificarea lipazelor	8
1.2.3. Selectivitatea lipazelor	9
1.2.4. Efectul biologic al enantiomerilor	11
1.2.5. Structura lipazelor. Legătura structură - funcție	12
1.2.6. Mecanismul reacțiilor catalizate de lipaze	13
1.2.7. Efectul apei asupra lipazelor. Strategii pentru îndepărtarea apei din sistemul de reacție	15
1.3. Rolul solventului organic în reacții catalizate de lipaze	17
1.3.1. Efectul mediului de reacție asupra lipazei	17
1.3.2. Alegerea solventului	18
1.3.3. Efectul solventului	19
1.3.4. Efectul surfactanților	20
1.4. Metode analitice de determinare a excesului enantiomeric	21
1.4.1. Separarea enantiomerilor prin cromatografie	21
1.4.1.1. Metoda GC	22
1.4.1.2. Metoda HPLC	23
1.4.2. Separarea enantiomerilor prin RMN	24
1.5. Imobilizarea enzimelor	25
1.5.1. Noțiuni generale despre imobilizare	25
1.5.2. Legarea de suport prin adsorbție fizică	26
1.5.3. Entraparea în silicageluri	27
1.5.4. Entraparea în silicageluri combinată cu adsorbție	30
1.6. Reacții enantioselective catalizate de lipaze	31
1.6.1. Noțiuni generale	31
1.6.2. Reacții de hidroliză	32
1.6.2.1. Hidroliza diacetaților	33
1.6.2.2. Hidroliza diesterilor acizilor dicarboxilici	34
1.6.2.3. Hidroliza alcoolilor acilați	37
1.6.2.4. Hidroliza enolilor	39
1.6.2.5. Hidroliza heterociclicilor	40
1.6.3. Reacții de sinteză	41
1.6.3.1. Acilarea diolilor aciclici și ciclici	42
1.6.3.2. Acilarea alcoolilor primari	44
1.6.3.3. Acilarea alcoolilor secundari	46

1.6.3.4.	Esterificarea acizilor carboxilici	50
1.6.3.5.	Transesterificarea alcoolilor acilați	51
1.6.3.6.	Transesterificarea esterilor acizilor carboxilici	51
2.	Contribuții originale	53
2.1.	Studiul activității biocatalizatorilor imobilizați în reacții de hidroliză și esterificare	53
2.1.1.	Studiul imobilizării lipazelor și activității lipazelor imobilizate în reacții de hidroliză a uleiului de măsline emulsionat	53
2.1.1.1.	Determinarea activității hidrolitice a enzimelor libere	53
2.1.1.2.	Studiul influenței pH-ului de imobilizare și suportului asupra activității hidrolitice a PPL imobilizată prin adsorbție	54
2.1.1.3.	Entraparea lipazelor în sol-gel și dependența activității hidrolitice a enzimei imobilizate de tipul aditivului utilizat	55
2.1.1.4.	Studiul dependenței activității hidrolitice a enzimei imobilizate prin entrapare de raportul molar al silanilor precursori	56
2.1.1.5.	Dependența activității hidrolitice a enzimei imobilizate prin entrapare de raportul molar silan/apă și modul de obținere al solului	60
2.1.1.6.	Influența timpului de hidroliză al solului asupra activității hidrolitice a enzimei imobilizate prin entrapare	61
2.1.1.7.	Influența hidraților de carbon asupra activității enzimelor imobilizate și randamentului de imobilizare	62
2.1.2.	Studiul imobilizării lipazelor și activității lipazelor imobilizate în reacții de esterificare	64
2.1.2.1.	Studiul activității de esterificare a PPL imobilizată prin adsorbție	64
2.1.2.2.	Studiul influenței raportului molar și naturii silanilor precursori asupra randamentului de ester și activității în reacții catalizate de Cc imobilizată prin entrapare	64
2.1.2.3.	Studiul reacțiilor de esterificare catalizate de PPL imobilizată prin entrapare	66
2.1.2.4.	Studiul activității de esterificare a PPL imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție	67
2.1.2.5.	Studiul activității de esterificare în funcție de metoda de imobilizare a PPL	68
2.1.2.6.	Studiul activității de esterificare în funcție de rețeta de imobilizare a PPL	69
2.1.2.7.	Studiul influenței raportului molar MTEOS:TEOS asupra randamentului de regăsire a activității enzimaticice	70
2.2.	Studiul unor reacții enantioselective catalizate de lipaze prin rezoluție cinetică	72
2.2.1.	Reacții de esterificare enantioselectivă	74
2.2.1.1.	Studiul dependenței excesului enantiomeric de tipul enzimei utilizate în reacțiile de esterificare a 2-pentanolului	74
2.2.1.2.	Studiul influenței unor parametri de reacție asupra conversiei în reacțiile de esterificare a 2-pentanolului și 2-octanolului	75
2.2.1.3.	Studiul influenței temperaturii și timpului de reacție asupra conversiei acidului hexanoic în reacțiile de esterificare cu 2-pentanol	76

2.2.2.	Reacții de transesterificare enantioselectivă	77
2.2.2.1.	Studiul dependenței activității de transesterificare și a selectivității reacției de raportul și natura silanilor precursori, în reacțiile de acilare a 2-butanolului	77
2.2.2.2.	Studiul dependenței activității de transesterificare și a selectivității reacției de raportul și natura silanilor precursori, în reacțiile de acilare a 2-pentanolului	83
2.2.2.3.	Studiul dependenței activității de transesterificare și a selectivității reacției de raportul și natura silanilor precursori, în reacțiile de acilare a 2-octanolului	90
2.2.2.4.	Studiul dependenței factorului enantiomeric și a excesului enantiomeric de natura substratului	95
2.2.2.5.	Studiul termostabilității lipazelor imobilizate prin metoda entrapării în sol-gel combinată cu adsorbție	99
2.2.2.6.	Studiul reutilizării unor enzime imobilizate prin metoda entrapării combinată cu adsorbția în reacții de acilare a 2-pentanolului	103
3.	Parte experimentală	107
3.1.	Metode de imobilizare a enzimelor	107
3.1.1.	Imobilizarea prin adsorbție	108
3.1.1.1.	Imobilizare prin adsorbție a lipazei pancreatice	108
3.1.1.2.	Imobilizarea prin adsorbție pe Celite a lipazei din <i>Pseudomonas fluorescens</i>	109
3.1.1.3.	Imobilizarea prin adsorbție pe Celite a lipazei BUTE-3b	109
3.1.2.	Imobilizarea prin entrapare în sol-gel	109
3.1.2.1.	Imobilizarea prin entrapare a lipazei din <i>Candida cylindracea</i>	109
3.1.2.2.	Imobilizarea prin entrapare a lipazei PPL	111
3.1.2.3.	Imobilizarea prin entrapare a lipazei AK	111
3.1.2.4.	Imobilizarea prin entrapare a lipazei din <i>Pseudomonas cepacia</i>	113
3.1.3.	Imobilizarea prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție	113
3.1.3.1.	Imobilizarea prin metoda combinată a lipazei pancreatice	113
3.1.3.2.	Imobilizarea prin metoda combinată a lipazei AK	114
3.1.3.3.	Imobilizare prin metoda combinată a lipazei BUTE-3b	114
3.2.	Metode de analiză	115
3.2.1.	Metoda Lowry de determinare a proteinelor	115
3.2.2.	Analiza cantitativă prin cromatografie de gaze	117
3.3.	Rețete de lucru	119
3.3.1.	Reacții de hidroliză. Determinarea activității lipazice	119
3.3.2.	Reacții de esterificare. Determinarea activității lipazice	120
3.3.3.	Reacții de transesterificare. Determinarea activității lipazice, excesului enantiomeric și selectivității	121
3.3.4.	Reacții de esterificare enantioselectivă	122
4.	Concluzii finale	124
5.	Bibliografie	131

Lista de abrevieri

AK	Lipază din <i>Pseudomonas fluorescens</i>
A _q	Hidrofilicitate
a _w	Activitatea termodinamică a apei
BSA	Albumină serică bovină
BUTE-3b	Lipază microbială obținută din fungii termofile
Cc	Lipază din <i>Candida cylindracea</i>
E	Factor enantiomeric
ee	Exces enantiomeric
EtTEOS	Etiltrietoxisilan
Eu(TFC) ₃	Tris(2,2,2-trifluoro-1-hidroxiethyliden)-d-camforato europiu
FM	Fază mobilă
FS	Fază staționară
FSC	Fază staționară chirală
MTEOS	Metiltrietoxisilan
PEG	Polietilenglicol
PhTEOS	Feniltrietoxisilan
PPL	Lipază din pancreas de porc
PS	Lipază din <i>Pseudomonas cepacia</i>
TEOS	Tetraetoxisilan
TMS	Tetrametilsilan

INTRODUCERE

Hidrolazele reprezintă categoria de enzime ce catalizează scindarea legăturilor în reacție cu apa. Funcția naturală a majorității hidrolazelor este cea digestivă – adică de a scinda substanțele nutritive în unități mai mici în vederea digestiei. Câteva tipuri de hidrolaze există în natură dar numai două dintre acestea au fost larg utilizate în medii nenaturale : lipazele și proteazele. Aceste enzime au fost utilizate în laboratoare în toată lumea și sunt acum considerate reactanți chimici de referință. Motivul acestui succes provine din marea disponibilitate a acestor proteine de la diferiți furnizori la prețuri rezonabile, ușurința de manevrare, din marea lor stabilitate și ușurința în acțiune.

Din punct de vedere chimic, lipazele și proteazele pot fi considerate reactanți selectivi și blânzi în solvenți organici, capabili să formeze un complex acil-enzimă ce reacționează cu o gamă largă de nucleofili. Lipazele catalizează preferențial hidroliza esterilor insolubili în apă cum sunt trigliceridele, de exemplu hidroliza trioleinei la dioleină. În afară de acestea, lipazele catalizează de asemenea hidroliza unui spectru larg de esteri naturali și sintetici prezentând o înaltă enantio- și regioselectivitate. Combinarea acestor caracteristici, adică larga gamă de substraturi asupra cărora acționează și selectivitatea înaltă pe care o manifestă, face din lipaze un catalizator ideal pentru sintezele organice.

Chimiștii utilizează biotransformările catalizate de lipaze pentru obținerea compușilor farmaceutici și intermediarilor sintetici enantiomeric puri, pentru protejarea și deprotejarea intermediarilor sintetici, pentru modificarea lipidelor naturale precum și în alte scopuri.

Cea mai importantă aplicație a lipazelor în chimia organică este obținerea compușilor optic activi. Aceasta datorită excelenței enantio- și stereospecificității manifestată de majoritatea lipazelor, făcând astfel această cale de obținere a compușilor enantiomeric puri o alternativă față de sintezele organice asimetrice sau față de reacțiile care utilizează substraturi chirale.

Domeniul biocatalizei a fost abordat la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului din Timișoara în urmă cu peste două decenii, în cadrul Colectivului de Biocataliză înființat de Prof. Dr. Radu Bacaloglu și condus apoi de Prof. Dr. Carol Csunderlik. Acest colectiv integrat în cadrul Catedrei de Chimie Organică și Tehnologii Organice a avut rol de pionierat în dezvoltarea biocatalizei în țara noastră.

Cercetările care fac obiectul acestei teze au fost realizate sub îndrumarea Prof. Dr. Carol Csunderlik și a Conf. Dr. Francisc Peter.

Studiile efectuate sunt îndreptate spre acest domeniu foarte interesant de obținere a compușilor enantiomeric puri. S-a urmărit realizarea unor sinteze enantioselective catalizate de lipaze prin rezoluție cinetică în clasa derivaților funcționali ai acizilor carboxilici. Catalizatorii utilizați în aceste reacții au fost obținuți prin imobilizarea unor lipaze microbiene, lipaza pancreatică și o lipază obținută din fungii termofile, prin tehnici noi cărora li s-a acordat un interes deosebit în ultima perioadă.

1. DATE DE LITERATURĂ

1.1. INTRODUCERE ÎN ENZIMOLOGIE

1.1.1. Noțiuni generale despre enzime

Enzimele reprezintă biocatalizatori de natură proteică specifici reacțiilor chimice care au loc în organismele vii. Biotransformările enzimatică au la bază utilizarea capacității catalitice a acestora și pot fi incluse în ramura biotehnologiilor. Biotehnologia poate fi definită ca un domeniu multidisciplinar care utilizează potențialul microorganismelor și al altor organisme pentru obținerea unor bunuri industriale, alimentare, agricole, obținerea de energie sau protecția mediului. Utilizarea deliberată a unor reacții catalizate de enzime reprezintă esența oricărei biotehnologii (Peter, 2005).

Enzimologia s-a dezvoltat foarte mult în ultima perioadă de timp, începuturile ei fiind în primele decenii ale secolului 19 când Payen și Persoz au realizat prima descoperire a unei enzime. Aceștia au reușit separarea dintr-un extras apos de malț a unei enzime ce scindează amidonul la zaharuri inferioare, iar în final la glucoză, enzimă denumită astăzi amilază (Payen și Persoz, 1833). Dacă în 1920 erau cunoscute 10-15 enzime, descrise în principal după observarea efectului acțiunii lor, astăzi sunt caracterizate peste 1000 de enzime (Uniunea Internațională de Biochimie a publicat în 1972 o lucrare în care sunt tabelate 1770 enzime) dintre care aproximativ 500 au fost obținute sub forma unor preparate înalt purificate și s-au determinat proprietățile lor fizice, chimice și biologice. Un număr relativ mic de enzime au fost analizate din punctul de vedere al structurii primare, al conformației tridimensionale, realizându-se și modele macromoleculare spațiale corespunzătoare.

Intervenția enzimelor în diferite procese (fermentație, respirație, digestie, putrefacție) era cunoscută de foarte mult timp, dar explicația acestor procese complexe, rolul și locul enzimelor în secvențele chimice care le compun a rămas mult timp obscur, multe mecanisme intime fiind neclare și astăzi.

Denumite la început *fermenți* de la cuvântul latin *ferveo* – a fierbe – datorită aparentei fierberi care însoțește orice proces de fermentație, în realitate produsă de eliminarea unor substanțe gazoase, enzimele au făcut obiectul unor pasionante dispute academice. În 1878, Kühne introduce denumirea de *enzimă* pentru fermenții din celula de drojdie sau din celulele altor organisme. Denumirile de *enzimă* și *ferment* sunt astăzi sinonime, primul termen fiind aproape unanim utilizat.

Configurația moleculelor organice reprezintă o etapă superioară de cunoaștere a structurii lor. Dacă *constituția* unei molecule definește acel ansamblu de date care ne indică natura și numărul atomilor din molecula respectivă precum și succesiunea acestora de-a lungul liniilor de legătură, odată cu felul acestor legături (simple, duble, triple), prin *configurație* se extinde cunoașterea moleculei prin stabilirea modului de așezare spațială a atomilor constituenți în raport cu un element de structură rigid, fără a ține seama de variantele de așezare realizabile prin mișcări de torsiune în jurul unor axe internucleare. *Conformația* unei molecule caracterizează așezarea spațială a atomilor în moleculă în raport cu o axă de torsiune (Bacaloglu și colab., 1985).

Enzimele pot fi alcătuite fie numai din catene polipeptidice ale căror unități de bază sunt resturile de aminoacizi și din punct de vedere chimic sunt proteine simple sau *holoproteine*, fie din două componente (una de natură proteică și alta de natură neproteică) și atunci pot fi definite ca *heteroproteine*. Partea neproteică poate fi o

coenzimă când se leagă la partea proteică prin legături necovalente sau o *grupare prostetică* când este legată prin legături de tip covalent și poate fi reprezentată prin diferite vitamine hidrosolubile sau derivați ai lor, nucleotide, ioni metalici etc. Partea proteică, numită *apoenzimă* poate fi constituită din una sau mai multe catene polipeptidice. Fiecare enzimă conține o secvență unică din aproximativ 20 de *L*-aminoacizi, legați prin legături peptidice. Diferitele enzime diferă nu numai prin secvența resturilor de aminoacizi ci și prin compoziția lor procentuală. Catena polipeptidică a enzimei prezintă o serie de plieri care conduce la structuri spațiale extrem de complicate – *conformații* – care condiționează manifestarea anumitor funcții biologice. Structura tridimensională este o consecință a secvenței primare a resturilor de aminoacizi care alcătuiesc catena polipeptidică a enzimei respective. Aceste plieri realizează o regiune "geometric distinctă" numită *centru catalitic activ*, responsabilă pentru actul catalitic. În cazul enzimelor – holoproteine, centrul activ este alcătuit din resturi de aminoacizi, care pot fi situați în poziții diferite ale catenei polipeptidice, însă apropiate în spațiu și grupate pe o arie cu un diametru de aproximativ 15 – 20 Å. Rolul centrului activ este de a "recunoaște" structura chimică a substratului și de a-l lega cu formarea unui *complex enzimă-substrat*, deosebit de reactiv, care se scindează spontan punând în libertate produșii de reacție și enzima într-o stare chimic nemodificată. Centrul catalitic activ poate "recunoaște" substratul datorită faptului că cele două entități – substratul și enzima – prezintă structuri stereochemic complementare care permit stabilirea de interacții fizice și chimice și formarea complexului enzimă-substrat.

Enzimele sunt catalizatori și respectă toate legile catalizei:

- enzima nu se consumă în timpul reacției și teoretic poate provoca transformarea unui număr nelimitat de molecule de substrat. Eventuala denaturare a enzimei este independentă de actul catalitic;
- enzima nu modifică natura reacției, echilibrul sau bilanțul ei termodinamic, reacția fiind posibilă și în absența ei;
- enzima accelerează viteza de reacție, pentru acest parametru cinetic înregistrându-se valori de aproximativ 10^{11} ori mai mari decât cele obținute în absența biocatalizatorului.

Catalizatorii, în general, accelerează viteza unor reacții chimice posibile din punct de vedere termodinamic, determinând o scădere a energiei de activare a reactanților și conducând la instalarea mai rapidă a stării de echilibru. Eficiența catalitică a enzimelor este superioară celei a catalizatorilor chimici. Faptul că enzimele sunt macromolecule proteice le conferă toate proprietățile fizico-chimice ale acestei clase de biomolecule: solubilitatea, proprietățile osmotice și de difuzie, schimburile ionice, denaturarea termică și labilitatea la anumiți reactivi chimici. Deosebirea esențială dintre enzime și catalizatorii chimici constă în înalta specificitate de acțiune a enzimelor, concretizată în capacitatea de a cataliza un singur tip de reacție biochimică, de cele mai multe ori catalizând transformarea unei singure substanțe chimice. Specificitatea de substrat a unei anumite enzime poate fi *absolută* – când aceasta catalizează transformarea unei singure substanțe chimice sau *relativă* – când enzima acționează asupra unui număr de substanțe, înrudite structural, care posedă aceeași grupare sau aceleași grupe de atomi pe care biocatalizatorul le "recunoaște" (Dumitru și Iordăchescu, 1981).

1.1.2. Clasificarea, nomenclatura și codificarea enzimelor

În funcție de tipul de reacție pe care îl catalizează, enzimele sunt reunite în șase mari clase (conform IUPAC/IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1972):

1. Oxidoreductaze
2. Transferaze
3. Hidrolaze
4. Liaze
5. Izomeraze
6. Ligaze sau sintetaze

După cum indică și numele *oxidoreductaze* sunt enzime care catalizează diverse reacții redox. *transferazele* catalizează reacții de transfer a unor grupări chimice de la o moleculă la alta. *hidrolazele* implică scindarea hidrolitică a unor legături sau grupări. *liazele* catalizează reacții de eliminare sau de adiție a unor grupări din sau la molecula substratului fără participarea apei, cu formarea unei duble legături sau la nivelul dublei legături în cazul reacțiilor de adiție. *izomerazele* catalizează diverse reacții de izomerizare (D-L, *cis-trans* etc.), iar *ligazele sau sintetazele* catalizează reacții de sinteză prin condensarea a două molecule, cuplate cu scindarea unei legături pirofosforice din ATP sau dintr-un nucleozid trifosfat similar. Deoarece are la bază tipul de reacție pe care îl catalizează o anumită enzimă, această clasificare are un caracter funcțional, nu structural.

Enzimele reunite într-o anumită clasă sunt ulterior clasificate în subclase, și subsubclase în funcție de unele detalii privind grupările chimice asupra cărora acționează, cofactorii implicați în reacția respectivă etc. De asemenea, fiecare enzimă este caracterizată printr-un cod format din patru cifre care urmează abrevierea EC (EC indică faptul că este vorba de clasificarea conform normativelor fostei Comisii de Enzimologie).

- primul număr indică una din cele șase posibile tipuri de reacții care pot fi catalizate de enzimă.

- al doilea număr indică structura chimică a legăturii scindate în proces: legătura esterică (3.1), compuși glicozil (3.2), legături eterice (3.3), legături peptidice (3.4), legături C – N, altfel decât cele peptidice (3.5), anhidride acide (3.6), legături C – C (3.7), legături care implică un halogen (3.8), legături P – N (3.9), legături S – N (3.10) și legături C – P (3.11).

- al treilea număr indică proprietățile enzimei implicate în reacție sau alte caracteristici ale reacției catalizate. De exemplu din subsubclasa 3.1.1 fac parte enzime care catalizează reacțiile de hidroliză ale esterilor acizilor carboxilici, subsubclasa 3.2.1 hidrolizează compuși O-glicozil, etc. În mod excepțional, în cazul peptidil – peptid hidrolazelor a treia cifră este bazată pe mecanismul catalitic, după cum indica studiile asupra centrului activ și ale efectului pH.

- al patrulea număr este un număr de ordine specific fiecărei enzime. De exemplu lipaza are codul 3.1.1.3, care indică faptul că este vorba despre o hidrolază care acționează asupra legăturii eterice și hidrolizează anumii esteri de acizi carboxilici. Ultima cifră arată că este vorba de cea de a treia enzimă clasificată în subsubclasa carboxil ester hidrolazelor.

Acest sistem de clasificare acoperă un număr de peste 3000 de enzime (Buchholz și colab., 2005).

1.1.3. Organizarea structurală a enzimelor

Enzimele, fără excepție, sunt proteine, fiind constituite fie numai din aminoacizi legați prin legături peptidice (proteine simple), fie din catene polipeptidice și alte componente organice sau anorganice (proteine conjugate). Acestea prezintă structuri spațiale complicate care includ *centrul catalitic activ* – partea care realizează efectiv funcția biologică a acestor proteine. Studiul structurii enzimelor a fost posibil numai după înregistrarea unor mari progrese în chimia proteinelor prin utilizarea unei metodologii de înaltă rezoluție ca determinarea secvenței de aminoacizi, măsurători ale unor proprietăți hidrodinamice, difracția razelor X etc.

În chimia polipeptidelor, termenul de *conformație* trebuie utilizat pentru a descrie diferite aranjamente spațiale ale atomilor produse prin rotația lor în jurul legăturilor covalente; o modificare conformațională nu implică scindarea legăturilor chimice (excepție legăturile de hidrogen) sau schimbări în chiralitate. Termenul de *configurație* trebuie utilizat pentru a descrie aranjamente spațiale ale atomilor a căror intertransformare necesită ruperea și formarea de legături covalente.

Structura primară a unui segment dintr-o catenă polipeptidică sau a unei proteine este reprezentată de secvența aminoacizilor și nu înglobează aranjamente spațiale (cu excepția configurației α -atomului de carbon). Această definiție nu include pozițiile legăturilor disulfurice și deci nu este identică cu "structura covalentă".

Structura secundară a unui segment dintr-o catenă polipeptidică reprezintă aranjamentul spațial local al principalilor atomi care constituie scheletul catenei, fără a ține seama de conformația resturilor *R* și de relațiile cu alte segmente.

Structura terțiară a unei molecule de proteină sau a unei subunități dintr-o moleculă de proteină este reprezentată de aranjamentul tuturor atomilor în spațiu, fără a considera relațiile cu molecule vecine sau subunități.

Structura cuaternară a unei molecule proteice este reprezentată de aranjamentul subunităților ei în spațiu și de ansamblul interacțiilor și contactelor dintre subunități, fără a ține seama de geometria internă a subunităților. O macromoleculă proteică care nu poate fi separată în subunități prin procedee blânde nu are structura cuaternară. Astfel, atât ribonucleaza (o catena) cât și chimotripsina (trei catene) nu posedă structuri cuaternare.

Structurile primare ale enzimelor sunt investigate prin metode fizico-chimice relativ simple. Structurile secundară, terțiară și cuaternară sunt extrem de greu de elucidat, prin metode fizice complicate, ca analiza cristalografică cu raze X.

Utilizând metode chimice selective, se poate stabili natura resturilor de aminoacizi situate în centrul catalitic activ sau în imediata lui apropiere. Trebuie făcută o distincție clară între efectul mediului asupra grupărilor catalitice din centrul activ și efectul mediului asupra integrității structurale a conformației active.

Centrul activ al enzimelor. Activitatea catalitică este realizată de o regiune mică din enzimă, numită centru activ sau situs catalitic activ. În cazul enzimelor alcătuite numai din resturi de aminoacizi, centrul activ este alcătuit din resturi de aminoacizi care pot fi situate în poziții diferite ale catenei polipeptidice, însă apropiate în spațiu și grupate pe o arie cu un diametru de aproximativ 10 – 30 Å, ca urmare a unui proces de "pliere" a macromoleculei proteice.

1.1.4. Activitatea enzimelor

Activitatea catalitică este cea mai importantă caracteristică a unei enzime. Exprimarea cantitativă a acestei activități nu se poate face direct, întrucât ea depinde

foarte mult de substratul asupra căruia acționează enzima, majoritatea enzimelor fiind active asupra unui număr mai mare de asemenea substraturi. Din considerente practice, s-a ales exprimarea activității prin efectul reacției catalizate de enzima respectivă. Aceasta înseamnă măsurarea vitezei unei anumite reacții definite, în condiții strict controlate. Reacția aleasă este de preferat să fie de ordinul întâi. Chiar dacă rezultatul măsurătorii depinde mult de condițiile concrete ale analizei, este de dorit să existe o unitate general acceptată pentru exprimarea activității catalitice (Peter, 2005).

În 1961 Comisia de Enzimologie a Uniunii Internaționale de Biochimie a introdus măsurarea vitezei reacțiilor enzimatică în micromoli de substrat transformat într-un minut, iar pentru exprimarea activității s-a propus noțiunea de *unitate enzimatică* (Dumitru și Iordăchescu, 1981). O asemenea unitate (U) se poate defini ca fiind acea cantitate de enzimă care catalizează transformarea unui micromol de substrat într-un minut, în condiții standard. A fost de asemenea definită *activitatea specifică*, drept numărul de micromoli de substrat transformați într-un minut de un miligram de proteină enzimatică. Aceste definiții se aplicau enzimelor care nu erau purificate până la omogenitate și cărora nu li se cunoștea masa moleculară, noțiunea de cantitate de enzimă neavând o semnificație legată de masa de enzimă propriu-zisă. În 1972, Comisia de Enzimologie a propus abandonarea denumirii de "unitate" în favoarea celei de "katal" (Dybkaer, 2002). A fost definită noțiunea de activitate catalitică (notație z), ce a suferit mai multe ajustări, fiind adoptată în cele din urmă în anul 1995 de IUPAC/IFCC astfel: este proprietatea unui component, măsurată prin viteza de conversie catalizată de acesta a cantității dintr-o substanță, într-o reacție chimică specificată și într-un sistem de măsură specificat. Trebuie menționat că această definiție se referă la catalizatori în mod general și nu numai la catalizatorii enzimatici și că activitatea catalitică, deși se definește printr-o viteză de conversie (exprimată în moli/sec), nu reprezintă o viteză de conversie în sine. Activitatea catalitică este o caracteristică cantitativă a catalizatorului și nu a cineticii de reacție. În anul 2000 katalul a fost adăugat la Sistemul Internațional de Unități ca unitate derivată, notat prescurtat cu kat și măsurat în $s^{-1} \cdot mol$. De asemenea a fost adoptat termenul de *concentrație de activitate catalitică* sau *concentrație catalitică*, exprimat în kat/m^3 (dar se acceptă și kat/L). Relația de transformare din unități enzimatică în katali este:

$$1 U = 16.667 \cdot 10^{-9} \text{ kat}$$

1.2. HIDROLAZE ȘI LIPAZE

1.2.1. Noțiuni generale

Hidrolazele reprezintă categoria de enzime ce catalizează scindarea legăturilor prin reacție cu apă. Funcția naturală a majorității hidrolazelor este cea digestivă – adică de a scinda substanțele nutritive în unități mai mici în vederea digestiei. De exemplu, proteazele hidrolizează proteinele în peptide mai mici și apoi la aminoacizi, iar lipazele hidrolizează lipidele (trigliceridele) la glicerină și acizi grași. Datorită necesității de scindare a unei game foarte largi de substanțe nutritive, hidrolazele au de obicei o specificitate de substrat redusă.

Clasa hidrolazelor reunește enzimele care catalizează reacțiile de hidroliză, adică de scindare a substratelor cu formare de compuși mult mai simpli și cu adăugarea elementelor apei. Reacția catalizată presupune ruperea unei legături covalente C-O, C-N, C-C etc. din cadrul structurii substratului, în prezența apei.

Reacțiile catalizate de hidrolaze sunt teoretic reversibile, dar în cele mai multe cazuri echilibrul este deplasat în sensul scindării hidrolitice. Reacțiile inverse, de sinteză, sunt realizate prin alte secvențe metabolice (Bornscheuer și Kazlauskas, 1999).

Reacțiile catalizate de hidrolaze sunt printre cele mai studiate biotransformări în solvenți organici. Câteva tipuri de hidrolaze există în natură dar numai două dintre acestea au fost larg utilizate în medii nenaturale: lipazele și proteazele. Aceste enzime au fost utilizate în laboratoare în toată lumea și sunt acum considerate reactanți chimici de referință. Motivul acestui succes provine din marea disponibilitate a acestor proteine de la diferiți furnizori la prețuri rezonabile, ușurința de manevrare, din marea lor stabilitate și ușurința în acțiune. Din punct de vedere chimic, lipazele și proteazele în solvenți organici pot fi considerate reactanți selectivi și blânzi capabili să formeze un complex acil-enzimă ce reacționează cu o gamă largă de nucleofili (Carrea și Riva, 2000).

Lipaze

Lipazele (EC 3.1.1.3.) și esterazele (EC 3.1.1.1.) sunt hidrolazele care catalizează hidroliza esterilor. Lipazele catalizează preferențial hidroliza esterilor insolubili în apă cum sunt trigliceridele, de exemplu hidroliza trioleinei la dioleină. În afară de acestea, lipazele catalizează de asemenea hidroliza unui spectru larg de esterii naturali și nenaturali/sintetici prezentând o înaltă enantio- și regioselectivitate. Combinarea acestor caracteristici, adică largă gamă de substraturi asupra cărora acționează și selectivitatea înaltă pe care o manifestă, face din lipaze un catalizator ideal pentru sintezele organice. Chimii utilizează biotransformările catalizate de lipaze pentru obținerea compușilor farmaceutici și intermediarilor sintetici enantiomeric puri, pentru protejarea și deprotejarea intermediarilor sintetici, pentru modificarea lipidelor naturale precum și în alte scopuri.

Pe lângă selectivitatea înaltă pe care o manifestă și spectrul larg de substraturi, un alt avantaj important al lipazelor este acela că ele acționează eficient asupra substraturilor insolubile în apă. Lipazele manifestă această capacitate deoarece substratul natural al lipazelor – trigliceridele – sunt insolubile în apă. Lipazele se leagă la interfața apă – substrat organic și catalizează hidroliza la această interfață. Această legare nu numai că plasează lipaza în apropierea substratului dar sporește considerabil puterea catalitică a lipazei, fenomen numit activare interfacială. Majoritatea lipazelor sunt catalizatori slabi în absența unei interfețe. O schimbare conformațională în structura lipazei determină probabil activarea interfacială. Spre deosebire de aceasta,

reacțiile eficiente cu proteaze necesită deseori o modificare chimică a substratului pentru creșterea solubilității în apă (Bornscheuer și Kazlauskas, 1999).

1.2.2. Clasificarea lipazelor

Lipazele se găsesc în plante, animale și microorganisme unde au un rol digestiv. Majoritatea biotransformărilor utilizează lipaze comerciale, dintre care în jur de 70 sunt disponibile. A fost făcută o clasificare a lipazelor în funcție de originea lor, respectiv de sursa microbială (Nilsson și colab., 1990; Hui și Kissel, 1990) însă această împărțire împiedică uneori observarea asemănarilor structurale. O clasificare mai bună utilizează înșiruirea secvențelor de proteine (Tabelul 1) care este în concordanță cu structura tridimensională a proteinelor.

Tabelul 1. Clasificarea lipazelor comerciale după similaritățile din secvența de proteine^a

Clasificare	Caracteristici	Exemple
Lipaze de origine animală (pancreatică)	50 kDa	PPL - lipaza din pancreas de porc
Lipaze fungice Familia <i>Candida rugosa</i>	60-65 kDa	CRL (<i>Candida rugosa</i> sau <i>Candida cylindracea</i>), GCL(<i>Geotrichum candidum</i>), CE (pancreatic colesterol esteraza)
Familia <i>Rhizomucor</i>	30-35 kDa	CAL-B (<i>Candida antarctica B</i>), RML(<i>Rhizomucor miehei</i> sau <i>Mucor miehei</i>), ROL(<i>Rhizopus oryzae</i>), HLL(<i>Humicola lanuginosa</i>), PcamL(<i>Penicillium camembertii</i>)
Neclasificate		ANL(<i>Aspergillus niger</i>), CAL-A (<i>Candida antarctica A</i>), CLL(<i>Candida lipolytica</i>)
Lipaze bacteriene Familia <i>Pseudomonas</i>	30-35 kDa	PCL (<i>Pseudomonas cepacia</i> sau <i>Burkholderia cepacia</i>), PFL(<i>Pseudomonas fluorescens</i>), CVL(<i>Chromobacterium viscosum</i>)
Familia <i>Staphylococcus</i>	40-45 kDa	BTL2 (<i>Bacillus thermocatenulatus</i>)

^a Clasificare după Cygler și colab. (1993) și Svendsen (1994) cu unele completări.

Lipazele de origine animală (pancreatică) formează o grupă. lipazele de origine fungică formează două grupe – familia *Candida rugosa* și familia *Rhizomucor*, iar lipazele bacteriene de asemenea formează două grupe – Familia *Pseudomonas* și familia *Staphylococcus*. Familia *Candida rugosa* include CRL, GCL și chiar dacă este o lipază de origine animală, colesterol esteraza pancreatică. Aceste lipaze sunt mari (60-65 kDa). De reținut că lipaza *Candida antarctica B* nu aparține

acestei familii, chiar dacă provine dintr-o drojdie *Candida*. Familia *Rhizomucor* include lipaze dintr-un domeniu larg de ciuperci/fungi: lipazele *Rhizopus*, lipazele *Rhizomucor*, lipaza *Penicillium camembertii*, HLL, CAL-B. Aceste lipaze sunt mici (30-35 kDa). Lipazele *Pseudomonas* sunt de asemenea mici și includ toate lipazele *Pseudomonas* și CVL. Lipazele *Staphylococcus* sunt de mărime medie (40-45 kDa) dar nu sunt disponibile comercial. O singură lipază din această grupă, o lipază termostabilă din *Bacillus Thermo-catenulatus* (BTL2), este disponibilă de la Boehringer Mannheim. Câteva dintre lipaze rămân neclasificate. Pentru acestea, de ex. ANL, nu se cunoaște secvența de aminoacid, pentru altele, de ex. CAL-A, secvența este cunoscută (Hoegh și colab., 1995) dar acestea prezintă doar puține asemănări cu celelalte lipaze.

Cele mai utilizate lipaze în sinteza organică sunt: lipaza din pancreas de porc (PPL), lipaza din *Pseudomonas cepacia* (lipazele Amano PS, PCL), lipaza din *Candida rugosa* (CRL), și lipaza B din *Candida antarctica* (CAL-B). Pentru modificarea lipidelor lipaza din *Rhizomucor miehei* (RML) este cea mai importantă.

1.2.3. Selectivitatea lipazelor

Hidrolazele respectiv lipazele manifestă trei tipuri importante de selectivitate:

- **Chemoselectivitatea**

Chemoselectivitatea este "reacția preferențială a unui reactant chimic cu una sau mai multe grupe funcționale diferite" (P.Muller, 1994).

Ca și catalizatori enzimele acționează asupra unei singure grupări funcționale, celelalte grupe funcționale care în cataliză chimică ar fi reacționat într-o oarecare măsură, rămân nemodificate.

- **Regioselectivitatea**

IUPAC definește o reacție regioselectivă ca fiind acea reacție în care direcția de formare sau ruperea a unei legături are loc preferențial față de toate celelalte direcții posibile (P.Muller, 1994).

Datorită structurii tridimensionale a complexului lor, enzimele pot distinge între grupele funcționale care sunt situate din punct de vedere chimic în diferite regiuni ale aceleiași molecule de substrat (Kise și colab., 1990)

- **Enantioselectivitatea**

Enantiomeria este izomeria care apare dacă molecula nu prezintă plan de simetrie, centru de simetrie sau axă de rotire – oglindire.

Unele substanțe au proprietatea de a roti planul luminii polarizate, când sunt străbătute de aceasta. Asemenea substanțe se numesc optic active. *Enantiomerii* sunt două specii chimice moleculare identice care diferă una de cealaltă datorită nesuperpozabilității imaginilor în oglindă. Cel mai simplu model pentru structura enantiomerilor este cel al celor două mâini, stânga și dreapta. Condiția necesară și suficientă pentru apariția activității optice este ca moleculele substanței să nu fie superpozabile, prin mișcări de translație sau rotație, cu imaginea lor în oglindă. Această proprietate a fost numită chiralitate (cheir = mână în limba greacă) (Nenițescu, 1980).

Chiralitatea moleculelor enantiomere se datorează prezenței unuia sau mai multor elemente chirale (axa de chiralitate, plan de chiralitate, centru de chiralitate cum ar fi de exemplu un atom de carbon asimetric) în structura lor. Sensul chiralității și activitatea optică a enantiomerilor este determinată de configurația absolută, adică de aranjamentul spațial al atomilor în moleculă (Avram, 1983; Badea și Kerek, 1974).

Cererea mare de compuși enantiomeric puri din partea companiilor farmaceutice și agrochimice a condus la studierea intensă a hidrolazelor în sintezele organice, cea mai exploatată aplicație fiind rezoluția cinetică a amestecurilor racemice (Carrea și Riva, 2000).

Enantioselectivitatea reacțiilor catalizate de lipaze

Aproape toate enzimele sunt alcătuite din L-aminoacizi iar aceștia sunt compuși chirali (Langrand și colab., 1986). Ca o consecință, orice tip de chiralitate prezentă în molecula substratului este "recunoscută", apoi are loc formarea complexului enzimă – substrat. Astfel un substrat prochiral poate fi transformat într-un produs optic activ și ambii enantiomeri ai unui substrat racemic pot reacționa cu viteză diferită, realizând o rezoluție cinetică. Aceste proprietăți constituie "specificitatea" unei enzime și reprezintă cea mai importantă proprietate a sa în vederea exploatării sale din punct de vedere selectiv și asimetric (Koshiro și colab., 1985).

Fabricarea și comercializarea compușilor enantiomeric puri a devenit o ramură în continuă expansiune în industria chimică, datorită avantajelor fiziologice și ecologice ale acestora. Dacă un compus farmaceutic, agrochimic, aditiv alimentar sau intermediari ai acestora sunt comercializați ca un singur enantiomer, atunci este necesar ca acesta să fie de o puritate enantiomerică înaltă, de obicei excesul enantiomeric ee > 98% uneori chiar mai mare decât 99.5%. Acest lucru conduce la studierea obținerii unor catalizatori cu performanțe optimizate și enantioselectivitate maximă. S-au studiat diferite aspecte și moduri de abordare privind controlul enantioselectivității lipazelor. Trei dintre parametrii ce pot influența enantioselectivitatea lipazelor sunt:

1. Mediul de reacție

Activitatea lipazelor este considerabil mărită în prezența unei interfețe apă/lipid, fenomen cunoscut sub denumirea de activare interfacială. Activarea interfacială a fost asociată cu un capac amfifilic care poate acoperi situsul activ. Inițial capacul este închis iar partea hidrofilică este orientată spre solvent, posibil pentru a preveni agregarea enzimei. După adsorbția lipazei pe o interfață apă/lipid capacul se deschide iar partea hidrofobă este expusă interfeței (Overbeeke și colab., 2000). Această adsorbție nu duce doar la creșterea activității ci afectează și enantioselectivitatea. Van Tol și colaboratorii au studiat rezoluția cinetică catalizată de lipaza din pancreas de porc a butiratului de glicidil în apă unde $E = 8$ și într-un sistem bifazic apă/solvent organic unde $E = 16$. O posibilă explicație pentru această creștere a valorii E este că deschiderea sau închiderea capacului influențează valoarea E (Van Tol și colab., 1995).

2. Aditivii

Altă metodă avantajoasă de creștere a enantioselectivității este utilizarea unui aditiv care reglează activitatea enzimatică. De exemplu unii eteri tip coroană au potențialul de a mări și enantioselectivitatea și viteza de reacție în hidroliza catalizată de lipaze a esterului (1-metil-2-ciano)etilic al acidului acetic (Itoh și colab., 1996).

3. Structura substratului

Un studiu făcut asupra modificării părții acil a substratului a demonstrat că această modificare poate crește enantioselectivitatea, deoarece ea este dependentă de mărimea și natura grupării acil (Itoh și colab., 1997).

De asemenea creșterea enantioselectivității lipazei se mai poate realiza prin purificare, imobilizare, modificare chimică, mutageneză sau evoluție direcționată (Berglund, 2001; Sinisterra, 1989).

În dezvoltarea unor noi tehnologii de proces, rezoluția clasică, cromatografia chirală și cataliza enantioselectivă sunt alternative importante (Eliel și Wilen, 1994). Metodele ce utilizează cataliza enantioselectivă și care implică enzime, microbi, catalizatori chimici chirali, necesită o combinație adecvată a condițiilor, tipului de proces și catalizatorului. Evident, performanța enantioselectivă a catalizatorului este factorul cel mai important pentru desfășurarea cu succes a unui astfel de proces. Evaluarea acestei proprietăți se face cu ajutorul raportului (factorului) enantiomeric E care este un parametru comun utilizat pentru caracterizarea enantioselectivității în rezoluțiile cinetice catalizate de enzime (Rakels și colab., 1993).

Într-o rezoluție cinetică, puritatea enantiomerică a produșilor și a materialelor de start variază pe parcursul reacției (Kagan și Fiaud, 1988). Astfel, compararea purității enantiomerice pentru două rezoluții cinetice are sens doar pentru același grad al conversiei (Bornscheuer și Kaslauskas, 1999). Un mod convenabil de comparare a rezoluțiilor cinetice a fost propus de Chen și colaboratorii (Chen și colab., 1982, 1987) care au propus ecuații pentru calculul enantioselectivității. Raportul de enantioselectivitate E măsoară abilitatea enzimei de a face distincție între enantiomeri. O reacție neselectivă are E aprox. 1, în timp ce reacțiile cu E aprox. 20 sunt utile pentru sinteze. Pentru calcularea lui E cu una din ecuațiile de mai jos sunt necesare două din cele trei variabile: excesul enantiomeric (sau puritatea enantiomerică) a substratului (ee_S), puritatea enantiomerică a produsului de reacție (ee_P), și gradul conversiei c . Excesul enantiomeric se calculează funcție de concentrația celor doi enantiomeri (Straathof și Jongejan, 1997):

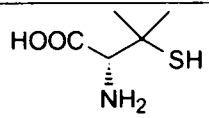
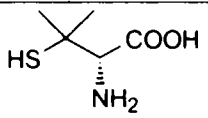
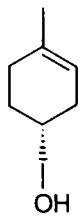
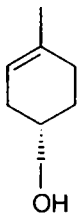
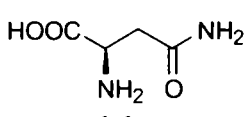
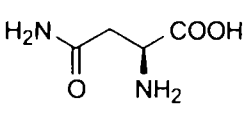
$$ee = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} \quad \text{unde } C_R \text{ este concentrația enantiomerului (R)}$$

C_S este concentrația enantiomerului (S)

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + ee_P)]}{\ln[1 - c(1 - ee_P)]} \quad E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - ee_S)]}{\ln[(1 - c)(1 + ee_S)]} \quad E = \frac{\ln\left[\frac{1 - ee_S}{1 + (ee_S/ee_P)}\right]}{\ln\left[\frac{1 + ee_S}{1 + (ee_S/ee_P)}\right]}$$

1.2.4. Efectul biologic al enantiomerilor

Toate evenimentele biochimice majore care au loc într-un organism sunt guvernate de enzime. Datorită faptului că majoritatea dintre ele sunt înalt selective cu privire la chiralitatea substratului, este evident că enantiomerii unui anumit compus bioactiv, cum ar fi produșii farmaceutici sau agrochimici, produc diferite efecte biologice. În consecință aceștia trebuie priviți ca două specii distincte. Câteva exemple reprezentative cu efecte biologice diferite sunt prezentate în Schema 1.

Enantiomerul R		Enantiomerul S
 toxic	Penicilamina	 antiartritic
 miros de liliac	Alcool terpenic	 miros de "cold pipe"
 dulce	Asparagina	 amar

Schema 1.

1.2.5. Structura lipazelor. Legătura structură - funcție.

Cele mai multe studii cu privire 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 prin faptul că lipaza A este mai acidă. În stare normală aceste două enzime sunt asociate cu câte o coenzimă. Aceste coenzime sunt contituite din catene polipeptidice aproape similare având masa moleculară în jur de 11000. Masa moleculară a lipazei din pancreas de porc a fost estimată la 45000-50000 (Verger și colab., 1969). A fost determinată structura primară a completă a lipazei pancreatice, stabilindu-se că ea este formată dintr-un singur lanț de aminoacizi (De Caro și colab., 1981). Această secvență corespunde unei mase moleculare a enzimei de 49859, la care se adaugă un rest de hidrați de carbon cu masa moleculară în jur de 2000, ceea ce dă o masă totală în jur de 52000. Au fost determinate structurile primare și pentru o serie de lipaze de origine bacteriană sau fungică (Svendsen, 2000).

Structura tridimensională a lipazei din *Rhizomucor miehei* și lipaza din pancreas uman a fost determinată în 1990 (Brandy, 1990). De atunci alte unsprezece structuri de lipaze au fost elucidate, care cu excepția lipazei pancreatice sunt toate de origine microbială (Cygler și Schrag, 1997). Aceste enzime care au o masă moleculară cuprinsă între 19-60 kDa, posedă o structură pliată, cunoscută sub numele de pliere α - β -hidrolazică. Partea centrală a lipazei este alcătuită dintr-un β -strat central, ce conține opt lanțuri β diferite (β_1 - β_8) conectate la opt spirale α (A-F). Centrul activ este format de o așa numită "triadă catalitică", alcătuită din aminoacizii serină, acid aspartic (sau glutamic) și histidină. Restul nucleofilic de serină se găsește la capătul C-terminal al lanțului β_5 într-o pentapeptidă, zona fiind denumită și "cot nucleofilic".

Determinarea structurii tridimensionale a permis înțelegerea fenomenului de activare interfacială, fenomenul cel mai cunoscut din studiile cinetice ale reacțiilor lipolitice și care constă în creșterea însemnată a activității lipazelor față de substraturile insolubile atunci când acestea formează o emulsie. Explicația constă în faptul că centrul activ al lipazei este acoperit de o structură polipeptidică elicoidală care acționează ca un capac, făcând inaccesibil accesul solventului și substratului. Partea din această structură care este îndreptată spre situsul catalitic este alcătuită în principal din lanțuri alifatiche hidrofobe iar partea opusă este hidrofilică (Brandy și colab., 1990). După fixarea enzimei la interfață, acest capac se deplasează în forma "deschis", situsul activ rămânând accesibil solventului și substratului (Cleasby și colab., 1992; Verger, 1997).

Un exemplu de model tridimensional al unei lipaze microbiene, lipaza din *Pseudomonas aeruginosa*, constituit pe baza unor determinări structurale cu raze X este prezentat în Figura 1 (Jaeger și Reetz, 1998).

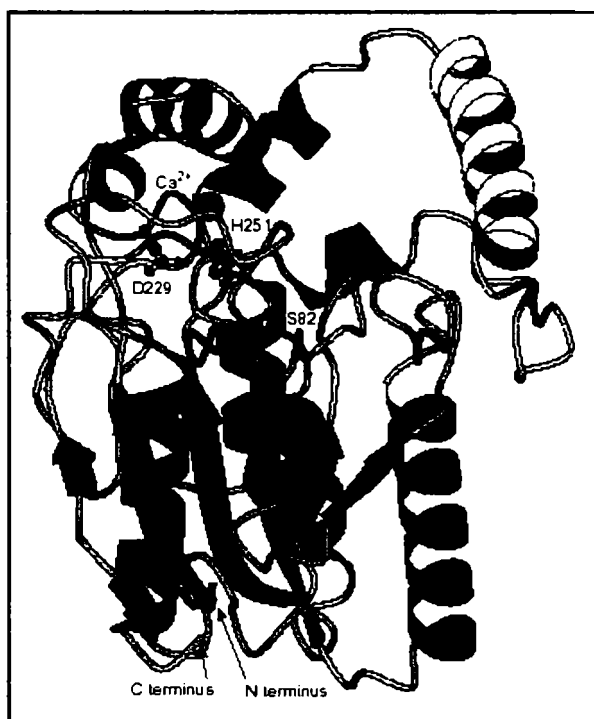
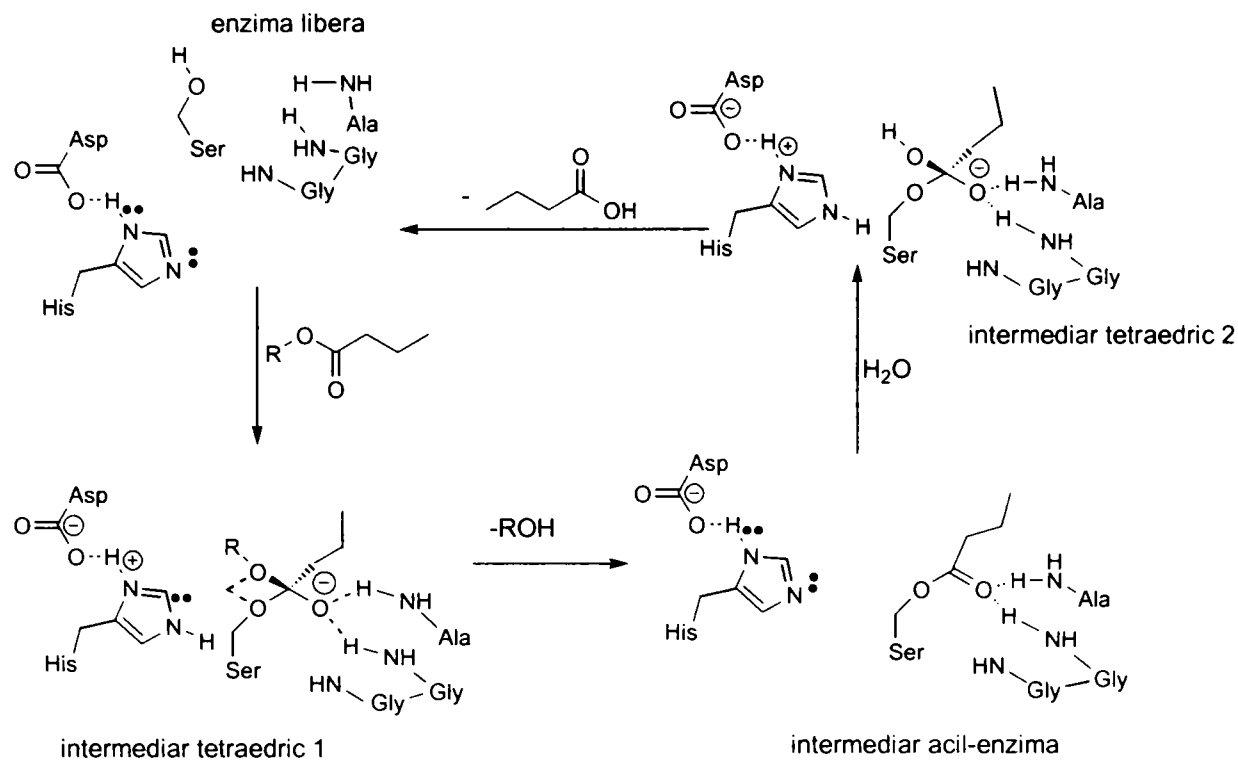


Figura 1. Structura tridimensională a lipazei din *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.6. Mecanismul reacțiilor catalizate de lipaze

Mecanismul catalitic implică centrul activ al lipazei constituit dintr-o triadă catalitică alcătuită din aminoacizii serină, histidină și acidul aspartic (Ser, His, Asp) și câteva resturi care au rol de stabilizare al oxianionului. Aceste resturi apar în aceeași ordine în toate secvențele de aminoacizi din lipaze și au aceeași orientare spațială în toate structurile, așa cum se poate observa în Schema 2. Mecanismul hidrolizei catalizate de lipaze implică formarea unui intermediar acil-enzimă și a doi intermediari tetraedrici diferiți. Formarea intermediarului acil-enzimă conduce la formarea primului intermediar tetraedric. În această etapă se eliberează alcool, astfel această etapă determină selectivitatea lipazei față de alcooli. Formarea produsului prin atacul nucleofil asupra intermediarului acil-enzimă implică formarea intermediarului tetraedric 2. Dacă dezacilarea este etapa determinantă de viteză, ea determină selectivitatea lipazei față de acizi (Bornscheuer și Kazlauskas, 1999).

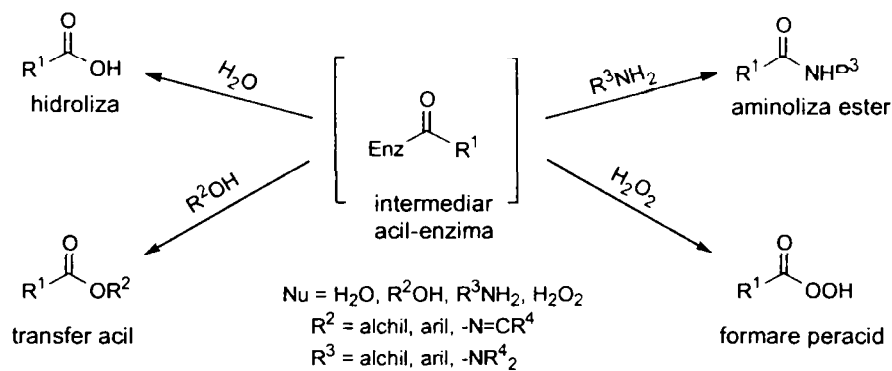


Schema 2. Mecanismul hidrolizei enzimatic

Dacă enzima acționează într-un mediu cu conținut redus de apă, cu alte cuvinte o concentrație mică de apă, orice alt nucleofil poate concura cu apa în atacul asupra intermediarului acil-enzimă, fiind posibile o serie de transformări (Schema 2):

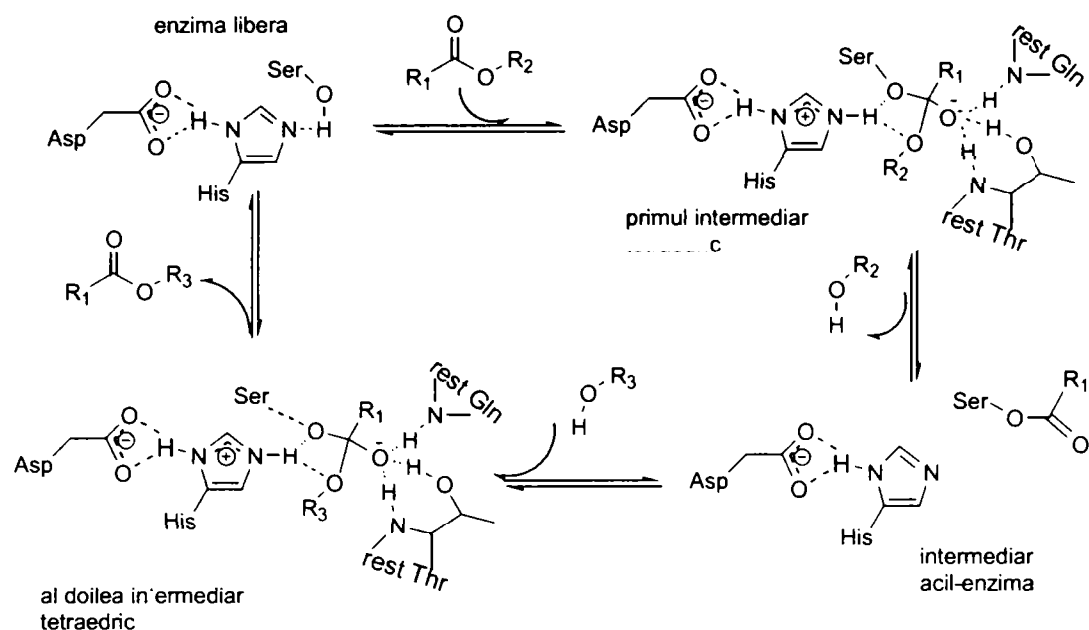
- Atacul unui alt alcool R^2-OH conduce la un alt ester $R^1-CO-OR^2$. Aceasta este o reacție de interesterificare, denumită în enzimologie "transfer de acil" (Klibanov, 1990)
- Reacția cu o amină R^3-NH_2 conduce la formarea unei amide $R^1-CO-NH-R^3$, printr-o aminoliză enzimatică a esterului (Klibanov, 1986; Klibanov, 1989)
- Reacția cu peroxidul de hidrogen ca nucleofil conduce la un peracid de tipul $R^1-CO-OOH$

În cursul tuturor acestor reacții orice tip de chiralitate din structura substratului este "recunoscută" de către enzimă determinând o preferință din punct de vedere stereochemic pentru una din cele două căi posibile ale reacției. Gradul de discriminare este un parametru crucial pentru selectivitatea reacției (Faber, 1995).



Schema 3

Lipaza din *Candida antarctica* B catalizează reacții de transfer acil după mecanismul ilustrat în figură (Magnusson, 2005).



Se observă că primul substrat se poziționează în situsul activ formându-se astfel primul intermediar tetraedric. Primul produs părăsește situsul activ și se formează intermediarul acil-enzimă. Cel de al doilea substrat se poziționează în situsul activ și apoi se formează cel de al doilea intermediar tetraedric. Al doilea produs părăsește situsul activ și enzima este apoi pregătită pentru un nou ciclu de reacție.

1.2.7. Efectul apei asupra lipazelor. Strategii pentru îndepărtarea apei din sistemul de reacție

Enzimele necesită o cantitate mică de apă pentru a-și păstra starea conformațională tridimensională activă, chiar dacă enzima este legată covalent de un suport (Carta și colab., 1991). Apa contribuie la integritatea structurală, la polaritatea situsului activ și la stabilitatea proteinelor (Triantafyllou și colab., 1995). Apa poate de asemenea limita solubilitatea substratului hidrofobic în vecinătatea enzimei (Tanaka și Sonomoto, 1990). Cantitatea de apă necesară variază în funcție de originea lipazei. În reacțiile de esterificare și hidroliză conținutul de apă afectează poziția echilibrului (Yahya și colab., 1998), la fel ca și distribuția produsului în mediul de reacție (Basheer și colab., 1995). Pe lângă activitate apa influențează și inactivarea termică a enzimei. Stabilitatea este mai mare la temperaturi mai ridicate în medii cu conținut redus de apă în comparație cu soluțiile apoase (Reslow și colab., 1988).

Halling a propus utilizarea termenului de activitate termodinamică a apei (a_W) pentru a defini relația dintre apă și celelalte componente ale sistemului de reacție. În ce privește influența asupra activității catalitice a lipazei, conținutul de apă al catalizatorului este mult mai important decât conținutul total de apă din sistem. S-a descoperit că activitatea catalitică a lipazei din *Mucor miehei* în diferiți solvenți variază foarte puțin pentru aceeași valoare a a_W , dar variază semnificativ pentru același conținut total de apă (Dudal și Lortie, 1995). Cercetările în căutarea sistemelor de reacție cu condiții favorabile sintezei esterilor au condus la cataliza în medii

neconvenționale. S-a dovedit că enzimele sunt rezistente în condiții care s-au crezut a fi dăunătoare activității enzimatică. Structura lor este mult mai rigidă în astfel de medii în comparație cu apa, ceea ce poate crește stabilitatea. S-a demonstrat că lipaza din pancreas de porc este activă catalitic pentru mai multe ore la 100°C într-un mediu organic (Zaks și Klibanov, 1984). Solvenții organici pot favoriza menținerea unei valori scăzute a a_H , care apoi scad bariera cinetică sau termodinamică pentru reacții cum ar fi esterificare în competiție cu hidroliza; pe lângă aceasta o solubilitate mare a substratului organic în solvenți organici conduce la viteză de reacție ridicată (Kwon și colab., 1995). Produse obținute cu randamente ridicate în sisteme neapoase simplifică recuperarea produsului. Solubilitatea scăzută a enzimelor în solvenți organici scade cantitatea de enzimă pierdută prin desorbție de pe materialul de suport. Aceasta face posibilă utilizarea tehnicilor simple de imobilizare a enzimelor cum ar fi adsorbția și implicit scade costul preparării enzimei (Wehtje și colab., 1993). Recuperarea produsului este apoi simplificată prin utilizarea solvenților cu punct de fierbere scăzut.

Aproape toate mediile neconvenționale implică prezența a cel puțin două faze distincte. Faza fluidă majoritară este uzual relativ nepolară și servește ca solvent pentru reactanți și/sau produși nepolari. Această fază poate fi un fluid organic, gaz sau fluid supercritic. Biocataliza poate avea loc exclusiv în faza apoasă, sau are loc la interfața dintre cele două faze (Halling, 1994).

Regenerarea lipazei în vederea reutilizării ei în procedee continue sau semicontinue necesită adesea uscarea enzimei. Uscarea excesivă poate conduce la dezactivarea enzimei. Una din dificultățile majore în reacțiile de esterificare catalizate de lipaze o constituie îndepărtarea apei produse pe parcursul reacției. Două din metodele de îndepărtare a apei ar fi adăugarea în sistemul de reacție de site moleculare activate sau de săruri anhidre, ca de exemplu sulfat de magneziu anhidru (Fonteyn și colab., 1994).

Într-o reacție de esterificare catalizată de Lipozyme în n-hexan, s-a încercat îndepărtarea apei prin barbotare de aer, spălare cu acetonă urmată de barbotarea aerului sau prin adăugare de site moleculare. Prin toate trei metodele s-a obținut același conținut rezidual de apă. S-a raportat și scăderea randamentelor pentru reacțiile de esterificare în care perioada de contact a sitelor moleculare cu enzima a fost mare (deCastro și colab., 1992). Îndepărtarea apei cu site moleculare este dificilă de aplicat la scară industrială. În plus, afinitatea mare a sitelor moleculare pentru legarea apei poate conduce la deshidratarea enzimei.

1.3. ROLUL SOLVENTULUI ORGANIC ÎN REACȚIILE CATALIZATE DE LIPAZE.

Cataliza enzimatică în medii neapoase a depășit semnificativ biocataliza convențională în medii apoase. Apa este un solvent nepotrivit pentru aproape toate aplicațiile din industria chimică, iar majoritatea compușilor organici de interes comercial sunt foarte puțin solubili și uneori instabili în soluții apoase. În plus îndepărtarea apei este de lungă durată și costisitoare datorită punctului ridicat de fierbere și căldurii de vaporizare mari (Ghanem și Aboul-Enein, 2005).

1.3.1. Efectul mediului de reacție asupra lipazei

Printre numeroasele metode adoptate pentru creșterea solubilității substraturilor hidrofobe în reacțiile biocatalitice cea mai utilizată este cea bazată pe solvenți organici. Aceasta include utilizarea amestecurilor apă-solvent organic miscibil cu apa, sisteme bifazice apă-solvent organic nemiscibil cu apa, mai recent studiate au fost sistemele de micelii inverse și în sfârșit sistemele de solvenți organici. În sistemele bifazice, Figura 2.a, enzima și componentele hidrofilice sunt conținute în faza apoasă, unde are loc reacția, în timp ce compuși hidrofobici sunt în general repartizați în faza organică. Pentru ca biotransformarea să aibă loc, moleculele de substrat trebuie să treacă din faza organică în cea apoasă, iar după terminarea reacției moleculele hidrofobe de produs se vor transfera înapoi în faza organică. În sistemele de micelii inverse, Figura 2.b, moleculele de enzimă sunt solubilizate în mici micelii inverse hidratate formate cu ajutorul surfactanților, în interiorul unei faze continue de solvent organic hidrofobic. În sistemele de solvenți organici, Figura 2.c, preparatele enzimatiche solide sunt suspendate în solventul organic în prezența unei cantități suficiente de apă care asigură activitatea enzimatică.

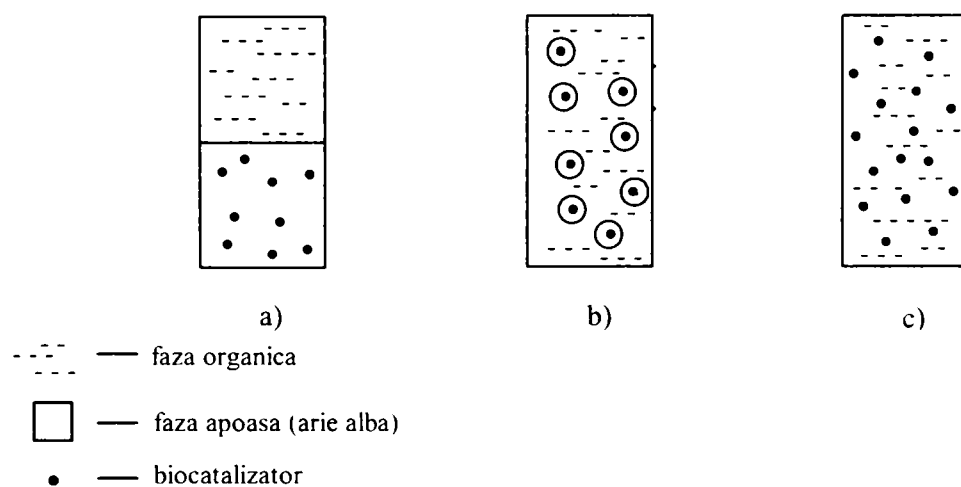


Figura 2. Reprezentarea unor sisteme de solvenți organici.

a) sistem bifazic b) sistem de micelii inverse c) sistem de solvent organic

Cu toate că sistemele prezentate mai sus au argumente pro și contra pentru utilizarea lor, sistemele de solvenți organici au fost cele mai studiate și utilizate. Multă vreme solvenții organici au fost considerați toxici pentru enzime, în sensul că acestea și-ar pierde ireversibil activitatea în asemenea medii. Această afirmație se baza pe studiul comportării enzimelor în medii apos organice, în care uneori acestea se

denaturau. În medii de solvenți organici anhidri însă situația este alta, deoarece în absența apei care acționează ca un lubrifianț molecular, enzimele sunt foarte rigide și își păstrează conformația catalitic activă (Klibanov, 2001).

Câteva avantaje ale reacțiilor catalizate enzimatic în solvenți organici sunt:

- posibilitatea realizării unor reacții care nu au loc în medii apoase
- reacțiile secundare, cum ar fi hidroliza anhidridelor acide sau esterilor halogenați, sunt înlăturate
- substraturile hidrofobe pot fi solubilizate
- unii produși se pot ușor recupera
- biocatalizatorul insolubil poate fi ușor recuperat
- termostabilitatea biocatalizatorului crește la un conținut redus de apă (Carrea și Riva, 2000).

1.3.2. Alegerea solventului

În medii neapoase, apa legată de biocatalizator este singura cantitate de apă din sistem. Solvenții organici pot afecta reacția prin interacțiunea directă cu enzima sau prin îndepărtarea apei din enzimă. Un solvent ideal trebuie să fie biocompatibil și să extragă bine produsul din sistem în condițiile de operare. Din păcate pentru producții polari, solvenții polari (care sunt buni extractanți pentru aceștia) acționează asupra enzimei iar schimbarea conformației enzimei conduce la inactivarea ei (Manjon și colab., 1991; MacNaughtan și Daugulis, 1993). Datorită rigidității moleculei de enzimă în solvenți organici fără conținut de apă, aceasta nu poate adopta conformația necesară pentru a facilita accesul substratului la situsul activ și în consecință activitatea catalitică a enzimei este foarte mică (Zaks și Klibanov, 1988). Gray și colaboratorii au descoperit că în absența unei cantități suplimentare de apă, obținerea butanoatului de mentil prin reacție de transesterificare catalizată de lipaza din *Candida cylindracea* a încetat după 24 h. Prin adăugarea a 0.1ml apă, activitatea enzimei a fost menținută mai mult de 48 h la 500 unități de activitate (Gray și colab., 1990).

Activitatea enzimatică ar trebui corelată cu hidrofobicitatea solvenților în funcție de dependența lor de apă. Solvenții potriviți se vor putea alege prin măsurarea hidrofobicității solventului. Un astfel de parametru este $\log P_{\text{oct}}$ care reprezintă o măsură a polarității unui solvent și este definit ca logaritmul coeficientului de repartiție a unui solvent într-un amestec octanol/apă a cărui volum este adaptat în funcție de valoarea presupusă a coeficientului de repartiție (Claon și Akoh, 1994). Solvenții care au $\log P_{\text{oct}} \leq 2$ sunt hidrofilici și prin urmare se presupune că nu sunt potriviți pentru biocataliză. Solvenții cu valoarea $\log P_{\text{oct}}$ cuprinsă între 2 și 4 sunt mult mai puțin hidrofilici, dar nici aceștia nu sunt potriviți ca solvenți. Odată cu creșterea valorii $\log P_{\text{oct}}$, solvenții devin hidrofobici și de aceea sunt cei mai buni pentru biocataliză (Manjon și colab., 1991). În prezent nu există o alternativă mai bună decât acest parametru. Sensibilitatea lipazei față de $\log P_{\text{oct}}$ al solventului ca și față de alți factori este puternic dependentă de sursa lipazei (Tramper, 1996).

Valorile $\log P$ pot fi determinate experimental sau pot fi calculate pe baza structurii moleculare a solventului (Rekker, 1977). Pentru o serie de solvenți organici uzuali, aceste valori sunt prezentate în Tabelul 2 (Laane și colab., 1987).

Tabelul 2. Valorile log P pentru solvenți uzuali

Solvent	log P	Solvent	log P
Trietilenglicol-dimetileter	-1.9	Cloroform	2.0
Dietilenglicol-dimetileter	-1.3	2,4-Dimetil-3-pentanol	2.3
N,N-Dimetilformamidă	-1.0	3-Etil-3-pentanol	2.3
Etilenglicol-dimetileter	-0.75	2-Metil-2-hexanol	2.3
4-Hidroxi-4-metil-2-pentanonă	-0.34	Toluen	2.5
Acetonitril	-0.33	Trifluorotricloroetan	2.8
Acetonă	-0.23	Eter butilic	2.9
1-Metil-2-pirolidonă	-0.20	2,6-Dimetil-4-heptanol	3.4
2-Butanonă	0.28	Hexan	3.5
Diclorometan	0.60	Eter pentilic	3.9
2-Metil-2-propanol	0.79	Eter izoamilc	4.0
2-Pentanonă	0.80	1-Octenă	4.2
3-Pentanonă	0.80	Eter fenilic	4.3
Eter etilic	0.85	Izooctan	4.5
1,2-Diclorețan	1.2	1-Nonenă	4.7
2-Metil-2-butanol	1.3	Eter hexilic	5.0
4-Metil-2-pentanonă	1.3	Nonan	5.1
t-Butilmetil eter	1.4	Decan	5.6
2-Metil-2-pentanol	1.8	1-Dodecenă	6.2
3-Metil-3-pentanol	1.8	Dodecan	6.6
Izopropil eter	1.9		

1.3.3. Efectul solventului

A. Influența solventului asupra apei asociate cu enzima

Natura solventului organic este un alt factor important în enzimologia în medii neapoase. Solventul nu numai că influențează, direct sau indirect, activitatea și stabilitatea enzimei ci modifică totodată specificitatea acesteia (specificitatea de substrat, enantio-, regio- și chemoselectivitatea). În general, un solvent influențează activitatea enzimei prin interacțiunea sa cu apa, enzima, substratul și produșii de reacție (Peter, 2005).

Deși unii solvenți par a avea un efect minim asupra moleculelor de apă legate de enzimă, solvenții hidrofilii sunt capabili să extragă chiar și apa de pe suprafața enzimei, determinând o hidratare insuficientă a acesteia și implicit micșorând activitatea enzimatică. Efectul determinat de extragerea apei a fost studiat măsurându-se cantitatea de T_2O eliberată din trei enzime (chimotripsină, subtilizină și peroxidază) dispersate în diferiți solvenți (Gorman și Dordick, 1992). S-a găsit că desorbția T_2O se produce în toate enzimele și solvenții testați și a fost completă în câteva minute. Extragerea apei din enzime de către solventul organic poate fi minimizată prin hidrofilizarea suprafeței enzimatică. De exemplu, prin modificarea covalentă a α -chimotripsinei cu dianhidridă piromelică rezultă o stabilizare puternică a enzimei împotriva denaturării cauzate de solvenții organici (Khmelnitsky și colab., 1991).

B. Influența solventului asupra enzimei

Mai multe studii au relevat faptul că conformația enzimei poate fi modificată la contactul acesteia cu solvenții organici. Scăderea fluorescenței resturilor de triptofan din peroxidază față de cele din L-triptofanul liber în dioxan indică o denaturare a enzimei în acest solvent. Totuși, peroxidaza pare să-și mențină integritatea structurală a centrilor săi activi într-o serie de alți solvenți organici. α -Chimotripsina este de asemenea denaturată într-un sistem apă : 2,3-butandiol, fapt indicat prin modificări ale fluorescenței (Yang și Russell, 1996).

Solventul poate afecta activitatea enzimatică prin distrugerea unei anumite proporții din numărul total de centri activi ai enzimei (Burke și colab., 1992). Aceasta ar putea fi rezultatul deshidratării și/sau deplierii enzimei.

C. Influența solventului asupra substraturilor și produșilor de reacție

Solvenții pot interacționa direct sau indirect cu substraturile și produșii de reacție, afectând astfel activitatea enzimatică. Solvenții pot să modifice concentrațiile substraturilor și produșilor în stratul de apă ce înconjoară enzima și întrucât substratul trebuie să penetreze stratul apos pentru ca reacția să aibă loc iar produșii trebuie să fie eliminați pentru continuarea reacției, solventul va influența activitatea enzimatică.

1.3.4. Efectul surfactanților

De când s-a dovedit că reacțiile catalizate de lipaze au loc la interfața apă - mediu organic, este de așteptat ca creșterea suprafeței interfaciale să ducă la creșterea moleculelor de lipază implicate în procesul catalitic și în consecință la creșterea vitezei de reacție. Aceasta explică necesitatea utilizării sistemelor bifazice apă-mediul organic. În prezența unui anumit surfactant de concentrație corespunzătoare, se formează ușor micelii inverse în timpul adăugării unei cantități mici de apă solventului nemiscibil cu apa (Tsai și Chiang, 1991). Sistemele de micelii inverse oferă o interfață apă / solvent organic foarte mare de aproximativ 100 m²/ml de emulsie.

În soluții apoase, surfactanții anionici și cationici au în general un efect de denaturare asupra enzimei (Schomaecker și colab., 1988) prin interacțiunile electrostatice și hidrofobice inerente sistemului. În schimb, surfactanții neionici oferă avantajul stabilizării sistemului de micelii inverse, fără a avea loc interacțiuni electrostatice între moleculele de surfactant (care formează membrana micelară) și moleculele de enzimă (Stamatis și colab., 1995). Activitatea enzimei este afectată de asemenea de repartiția substratului și produșilor între faza apoasă, interfața apă/solvent organic și faza organică.

Modificarea lipazei prin formarea unui complex cu sorbitan monostearat (Span 60) s-a demonstrat că a determinat creșterea vitezei reacției de interesterificare a tripalmitinei cu acidul stearic într-un sistem microapos de n-hexan (Basheer și colab., 1995). Detașarea moleculei de surfactant de complexul lipază-surfactant în mediul de reacție și creșterea vitezei de hidroliză poate justifica scăderea activității la un conținut ridicat de apă. Lipazele supraîncărcate cu molecule de surfactanți rămân active, indicând faptul că moleculele de surfactant interacționează cu situsuri specifice din molecula enzimei, impunând o anumită formă conformațională a acesteia. Isono și colaboratorii au utilizat Span 60 pentru obținerea unui complex lipază-surfactant al lipazei din specia *Pseudomonas* pentru catalizarea unei reacții de esterificare a alcoolului cetilic cu acid palmitic în n-hexan. Conversia a fost de 90% în 30 minute, și atinge maxim 96% în 60 minute (Isono și colab., 1995).

1.4. METODELE ANALITICE DE DETERMINARE A EXCESULUI ENANTIOMERIC

Dezvoltarea metodelor de determinare a purității enantiomerice, care a început încă din anii 1960, a fost foarte importantă pentru aprecierea enantioselectivității sintezelor. Astfel, un lucru necesar în rezoluția cinetică catalizată de enzime a amestecurilor racemice, este o determinare precisă și exactă a gradului enantioselectivității (E), a excesului enantiomeric (ee) și a conversiei (C). Printre aceste metode se numără: 1) metodele polarimetrice, 2) metodele gaz-cromatografice (CG), 3) metodele cromatografiei de lichide (HPLC) și 4) spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (RMN). Cele mai avantajoase și sensibile metode sunt CG și HPLC chirală (Ghanem și Aboul-Enein, 2005).

1.4.1. Separarea enantiomerilor prin cromatografie

În ultimii ani s-a manifestat un interes deosebit față de sinteza și separarea enantiomerilor compușilor organici, în special datorită importanței lor în biochimie și industria farmaceutică. Metodele utilizate pentru separarea, monitorizarea desfășurării unei sinteze asimetrice sau determinarea purității optice a produselor sunt de cele mai multe ori cromatografia de lichide și de gaze, sau cromatografia cu lichide supercritice. Recent s-a adăugat și electroforeza capilară ca metodă analitică de separare chirală.

Separarea enantiomerilor din amestecul racemic, adică rezoluția racemicului, este o problemă frecventă în cercetările stereochemice, precum și la prepararea compușilor biologic activi, îndeosebi medicamente. Problema este că spre deosebire de diastereoizomeri și celelalte tipuri de izomeri, enantiomerii într-un mediu achiral au proprietăți fizice și chimice identice.

Un mod de separare a enantiomerilor se referă la o rezoluție enantiomerică indirectă și implică cuplarea enantiomerilor cu un reactant chiral auxiliar care duce la transformarea lor în diastereomeri. Diastereomerii pot fi apoi separați prin orice tehnică de separare achirală. În prezent metodele de separare directă sunt frecvent utilizate și constau în plasarea enantiomerilor într-un mediu chiral. În principiu doar prin intermediul unui selector chiral sau prin iradiere chirală se poate face distincție între cei doi enantiomeri. Selectorii chirali pot fi o moleculă chirală sau o suprafață chirală. Datorită enantioselectivității, prin interacțiunea cu cei doi enantiomeri, selectorul chiral sau transformă enantiomerii cu o viteză diferită într-o nouă specie chimică (enantioselectivitate cinetică), sau formează aducți moleculari cu stabilitate diferită cu cei doi enantiomeri (enantioselectivitate termodinamică). Transformarea enzimatică selectivă a L-enantiomerilor din amestecurile racemice de D,L-aminoacizi este un exemplu tipic de proces enantioselectiv cinetic (rezoluție cinetică). Cromatografia enantioselectivă (chirală) nu modifică speciile enantiomerice pentru a fi separate și reprezintă un exemplu pentru un proces enantioselectiv termodinamic.

Rezoluția enantiomerică directă este posibilă doar în sistemele cromatografice care conțin un selector chiral potrivit. Acesta poate fi încorporat în FS (având în acest caz faze staționare chirale) sau poate fi legat permanent sau depus pe suprafața materialului de umplură a coloanei, fiind numite faze staționare chirale chimic legate sau faze staționare chirale depuse. În toate aceste cazuri, când se face referire la coloana cromatografică este vorba de fapt de o coloană enantioselectivă (chirală) (Davankov, 1997).

1.4.1.1. Metoda CG

O metodă atractivă de determinare a excesului enantiomeric (ee) a substraturilor și produșilor rezultați din rezoluția cinetică catalizată de enzime a alcoolilor secundari este cromatografia de gaze (CG) chirală (Schuring, 2001; Ghanem și colab., 2003). Această metodă este sensibilă, rapidă și ușor de realizat, neafectată de prezența impurităților din proba de analizat; de aceea nu este necesară izolarea și purificarea probei. Pentru analiză sunt necesare cantități foarte mici de probă, prin urmare reacțiile pot fi realizate la scară mică. Această metodă se bazează pe faptul că asocierile moleculare duc la o recunoaștere chirală, conducând la separare enantiomerică atunci când se folosește în CG o fază staționară chirală (de ex. ciclodextrinele). Gazul (faza mobilă, de ex. hidrogen, heliu, azot) este purtătorul substanței chirale de analizat, prin faza staționară. Enantiomerii de analizat suferă interacțiuni rapide și reversibile cu faza staționară chirală și prin urmare eluează la timpi de retenție diferiți. O condiție pe care trebuie să o îndeplinească proba de analizat este ca ea să fie suficient de volatilă, stabilă termic și să poată fi separată pe faza staționară utilizată. Prin această metodă se pot determina valori ale ee >99% (Ghanem și Aboul-Enein, 2005).

Fazele staționare utilizate în cromatografia de gaze se pot împărți în:

A. Faze staționare chirale bazate pe legături de hidrogen**A.1. Derivați de aminoacizi și oligopeptide**

Câteva exemple din acest tip de sunt esterul lauric al N-trifluoro-acetil-L-izoleucinei (Gil-Av și colab., 1966), terț-butil amida N-lauroil-L-valinei (Feibush, 1971), N-Lauroil-L-prolin-(S)-1-(α -naftil)-etilamida, care manifestă cea mai mare stabilitate termică și a fost găsită, alături de O-lauroil-(S)-1-(α -naftil)-etilamidă, utilă în separarea compușilor de tipul esterilor de aminoacizi N-protejați, esterilor acizilor O-trifluoroacetici α -hidroxicarboxilici, terțbutilamidelor și esterilor acizilor carboxilici, unor nitrili și N-perfluoroacil-aminelor (Oi și colab. 1982; 1983).

A.2. Faze staționare chimic legate de tip polisiloxanic

O FSC cu stabilitate termică ridicată a fost obținută prin legarea covalentă a unei FSC cu masă moleculară mică de tip diamidă (terț-butilamida L-valinei) de o structură polimerică de tip silionic, prin gruparea aminică. (Frank și colab., 1977, 1978). Același principiu se poate aplica pentru cuplarea altor liganzi chirali, și se pot obține alte serii de polisiloxani cu substituenți chirali. Coloanele capilare umplute cu acest tip de FS sunt comercializate sub denumirea de „Chirasil-Val”.

B. Faze staționare bazate pe complecși chirali cu metale

Acest tip de FSC pentru GC capilară a fost introdusă în 1977 când s-a demonstrat pentru prima dată, că un chelat optic activ de rodium (I) poate fi utilizat pentru rezoluția unui amestec racemic de 3-metilciclopentenă prin complexare (Schurig și Gil-Av, 1976; Schurig, 1977). Această tehnică bazată pe principiul formării de legături coordinative cu metale este cunoscută sub numele de cromatografie de gaze prin complexare.

C. Faze staționare chirale bazate pe efecte de incluziune

A fost demonstrată posibilitatea utilizării în cromatografia gaz-lichid a efectelor de incluziune, cunoscute din chimia soluțiilor ca efecte „gazdă-oaspete” („host-guest”). Această tehnică utilizează ciclodextrina (CD) ca selector chiral, în amestec cu un solvent polar, care joacă rolul unei matrici lichide. Alte progrese s-au făcut în 1988 când s-a descoperit că prin substituția tuturor grupelor hidroxil libere din

α -CD, se poate obține o FS chirală, utilă în GC cu coloane capilare, dar stabilă și la temperaturi înalte. S-a demonstrat că această FS permite separarea unor carbohidrați trifluoroacilați, metil-glicozide, 1,4- și 1,5-anhidroalditoli, polioli și esteri metilici ai polihidroxiacizilor (König și colab., 1988). Prin analogie cu „Chirasil-Val”, s-a obținut o FSC ce conține o β -ciclodextrină permetilată, legată de un schelet polisiloxanic (Fisher și colab., 1990). Pe acest tip de FS s-au putut separa un număr mare de compuși chirali ce conțin grupe hidroxil (dioli, esteri de hidroxiacizi, acizi carboxilici) fără a fi necesară derivatizarea lor.

1.4.1.2. Metoda HPLC

Metodele cromatografiei de lichide (HPLC) urmează aceleași principii și au aceleași avantaje ca și analiza CG. Diferența majoră este că prin această metodă se pot analiza atât compuși mai polari cât și compuși nevolatili sau cu volatilitate redusă.

În GC chirală conceptul de separare a enantiomerilor este foarte clar, și anume aceasta are loc pe o fază staționară chirală. În LC chirală situația este mult mai complicată. Aici se pot distinge două cazuri fundamentale diferite, care depind de modul în care are loc diferențierea enantiomerilor: printr-un efect de recunoaștere chirală a fazei staționare, sau prin intermediul unui constituent chiral din FM care formează un complex diastereomeric „*in situ*” pe parcursul procesului cromatografic.

Din punct de vedere experimental se pot distinge două metode: una implică utilizarea unei coloane chirale, adică a unei coloane ce conține o FS chirală și a unei FM achirale, iar cealaltă presupune utilizarea unei coloane achirale și a unei FM chirale. În ce privește cea de-a doua variantă, separarea chirală este în funcție de afinitatea relativă a componentei chirale care urmează a fi separată față de faza staționară și respectiv faza mobilă. Sorbenții chirali pentru LC se pot clasifica în funcție de structura lor generală. Unii sunt bazați pe polimeri sintetici sau naturali și sunt total sau parțial chirali, alții sunt constituiți din selectori chirali cu masă moleculară mică, care sunt atașați de o matrice solidă incompresibilă, de obicei silicagel. Există de asemenea sorbenți ce conțin polimeri legați de silicagel, pentru a crește performanțele coloanei cromatografice.

A. FSC bazate pe polimeri naturali și sintetici

Datorită cunoașterii naturii chirale a multor produse naturale, în special a carbohidraților, acești compuși au fost primii utilizați ca sorbenți pentru rezoluția optică prin LC (Henderson, 1938). Capacitatea de separare a polizaharidelor, și anume a celulozei, a fost demonstrată prima dată atunci când la separarea unui amestec racemic de aminoacizi, prin cromatografie pe hârtie, au fost observate două spoturi diferite (Dent, 1948; Dalgliesh, 1952). Dalgliesh a enunțat teoria interacțiunii în trei puncte în 1952, pe baza rezultatelor obținute la separarea amestecurilor racemice de aminoacizi prin cromatografie pe hârtie (Dalgliesh, 1952). S-au prezentat apoi și alte rezultate obținute la rezoluția optică directă prin cromatografie pe hârtie (Weichert, 1970) și cromatografie în strat subțire, pe celuloză (Contractor și Wragg, 1965).

A.1. Polizaharide și derivați ai polizaharidelor

- Polizaharide nederivatizate : Celuloza, amidonul și ciclodextrinele
- Derivați de polizaharide : Triacetatul de celuloză

A.2. Derivați de poli(acril)amidă și polimeri sintetici similari

Din acest tip de faze staționare chirale amintim:

- Sorbenți bazați pe polimeri sintetici chirali modificați prin substituție cu ajutorul reactivilor chirali (Blascke, 1974; Blascke și Markgraf, 1980).
- Sorbenți bazați pe polimetacrilati liniari izotactici cu conformație elicoidală

A.3. Polimeri sintetici ce conțin atașate cavități chirale

Încă înainte de 1949 Pauling a prezentat ideea de includere în rețeaua de polimer, prin sinteză, a unor cavități a căror dimensiune să corespundă doar unuia dintre cei doi enantiomeri (Pauling, 1949). În prezent această tehnică este des utilizată și se numește imprimare moleculară.

A.4. Proteine

Structura moleculară complicată a proteinelor a făcut ca acestea să prezinte interes pentru legarea unor compuși specifici. Au fost făcute un număr mare de studii privind echilibrul în soluții între proteinele din ser și diferiți liganzi, în special compuși farmacologici activi și s-au observat diferențe semnificative între constantele de legare ale enantiomerilor respectivi (Brown și colab., 1977; Müller și Wollert, 1975). Dintre proteinele utilizate pentru obținerea FSC amintim: albumina imobilizată, glicoproteina α_1 -acidă imobilizată, ovomucoida imobilizată, avidina imobilizată, celobiohidrolaze imobilizate.

B. Selectorii chirali sintetici

FSC denumite astfel sunt caracterizate de o structură moleculară bine determinată legată de un suport solid, de obicei silicagel. Acești compuși chirali cu masă moleculară mică, denumiți selectorii, au fost aleși pe baza faptului că proprietățile lor enantioselective pot fi determinate prin studii de RMN. Dintre selectorii chirali sintetici se pot aminti: eterii coroană, complexii cu metale, selectorii bazați pe complexare cu transfer de sarcină, selectorii bazați pe legături de hidrogen.

Cromatografia enantioselectivă poate fi de asemenea realizată pe o coloană achirală, utilizând selectorul chiral necesar în FM chirală sau ca aditiv chiral la FM. Combinarea mai multor selectorii chirali în FM la fel ca și în FM și FS este de asemenea posibilă.

Cromatografia enantioselectivă și electroforeza capilară sunt foarte utilizate în analiza compoziției enantiomerice (a excesului enantiomeric și purității optice) a compușilor chirali. Cromatografia cu lichide supercritice a fost de asemenea utilizată pentru izolarea compușilor chirali din amestecuri racemice la scară preparativă (Davankov, 1997; Allenmark, 1991).

1.4.2. Separarea enantiomerilor prin spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară (RMN)

Spectrele de rezonanță magnetică nucleară oferă informații despre câmpurile magnetice locale ce înconjoară un anumit nucleu magnetic. Metoda RMN este o metodă des utilizată pentru separarea enantiomerilor și determinarea purității optice. Enantiomerii nu se disting într-un mediu achiral. Astfel pentru a obține o separare spectrală și a determina puritatea optică se recomandă utilizarea unui mediu chiral. Pentru a induce schimbări în spectrele RMN ale enantiomerilor sunt utilizați reactivi de deplasare chirali care sunt mai eficienți decât solvenții chirali diamagnetici de exemplu. Deplasările induse de lantanide sunt importante surse de informații în vederea determinării structurii precum și în simplificarea spectrelor. Cei mai mulți reactivi de deplasare chirali sunt disponibili comercial ca și chelați ai Eu, Pr, Yb, Ho, Dy, cu dicitone. Reactivii de deplasare chirali sunt potriviți numai dacă substratul conține grupări funcționale bazice capabile să coordoneze cu lantanidul. Pe lângă acestea, efecte mai puternice sunt așteptate dacă poziția de coordonare a substratului este relativ apropiată de centrul chiral.

1.5. IMOBILIZAREA ENZIMELOR

1.5.1. Noțiuni generale despre imobilizare

Enzimele au un enorm potențial ca și catalizatori ai reacțiilor chimice în diferite domenii ale industriei și în medicină datorită specificității și eficienței catalitice binecunoscute. Aceste avantaje indiscutabile pot fi diminuate datorită costului și instabilității termice și chimice, care pot limita utilizarea lor în condiții industriale. Dezvoltarea tehnicilor de imobilizare a enzimelor în ultimii 30 de ani au redus aceste probleme și au condus la creșterea numărului domeniilor de aplicații comerciale ale enzimelor. Multe tehnici de imobilizare fizice și chimice sunt disponibile la ora actuală, care duc la modificarea activității și stabilității catalizatorilor enzimatici (Bullock, 1995).

Istoria imobilizării enzimelor datează din 1916, când s-a descoperit că invertaza extrasă din drojdie și adsorbită pe cărbune activ a avut aceeași activitate catalitică cu enzima nativă (Nelson și Griffin, 1916). Prima tentativă de a imobiliza o enzimă pentru a-i îmbunătăți proprietățile urmărind o anumită utilizare datează din 1953, când Grubhofer și Schleith au imobilizat o serie de enzime ca diastaza, pepsina, ribonucleaza și carboxipeptidaza, folosind ca suport rășină de poliaminopolistiren diazotat (Prenosil și colab., 1989). Începând din anii 1960 a avut loc o dezvoltare însemnată a cercetărilor privind enzimele imobilizate, cu scopul de a le utiliza drept catalizatori industriali în procese continue.

Principalele avantaje ale enzimelor imobilizate în raport cu cele solubile (libere, native) sunt următoarele:

- Permit utilizarea repetată a enzimei
- Recuperarea ușoară
- Procesele pot fi operate în regim continuu, ceea ce permite și automatizarea lor
- Transformarea substratului se poate opri la un moment dat prin separarea catalizatorului printr-o simplă operație mecanică
- Nu mai apare problema impurificării produșilor de reacție cu enzimă
- În unele cazuri activitatea și stabilitatea se pot modifica în sens favorabil prin imobilizare
- Se pot trata, în condiții economice, soluții diluate de substrat (ape reziduale, subproduse, etc.)

Metodele de imobilizare se pot clasifica în trei categorii principale:

1. Legare de suport – constă în legarea enzimei de suporturi insolubile prin:

- Adsorbție fizică
- Legare ionică
- Legare covalentă

2. Înrețelare (reticulare) – constă în legarea intermoleculară a enzimelor cu ajutorul unor reactivi bifuncționali sau multifuncționali

3. Entrapare (incluziune) – constă în încorporarea enzimei într-o structură semipermeabilă, care poate fi de două tipuri:

- a. Rețea macromoleculară de tip gel sau fibră
- b. Membrană polimerică semipermeabilă, în care enzima se fixează prin microîncapsulare.

1.5.2. Legarea de suport prin adsorbție fizică

Imobilizarea prin legare de suport este cea mai veche metodă de imobilizare. Pentru a realiza o imobilizare eficientă, este necesară o selecție atentă a suportului și a metodei de legare de suport. Cantitatea de enzimă fixată pe suport și activitatea după imobilizare depind în mare măsură de natura suportului. Cu toate că natura suportului ales depinde de însăși natura enzimei, totuși alegerea trebuie efectuată ținând cont și de următoarele caracteristici:

- mărimea particulelor suportului
- suprafața specifică
- raportul molar dintre grupările hidrofile și cele hidrofobe
- compoziția chimică

O creștere a stabilității este observată la obținerea unor lipaze imobilizate, probabil datorită capacității materialului de suport de a reține cantitatea potrivită de apă astfel încât enzima să rămână activă fără a fi expusă denaturării (Vermue și Tramper, 1995). Activitatea lipazelor imobilizate în special pe suporturi hidrofobe ca polietilena, s-a dovedit a fi mai mare decât a lipazelor neimobilizate (Kimura și colab., 1983). Acest lucru de datorează probabil unor efecte de orientare determinate de structura suportului și care determină o expunere mai bună a enzimei față de substrat.

Capacitatea de adsorbție a apei de către un material de suport este caracterizată de hidrofilicitate (Aq) care este raportul dintre cantitatea de apă din suport și cantitatea de apă din solvent în condiții standard (Vermue și Tramper, 1995). Aceasta nu este o constantă de repartitie reală din moment ce este dependentă de cantitatea de material de suport și de solvent și de tipul solventului. Un suport cu Aq mare este hidrofilic și ar putea împiedica hidratarea necesară a enzimei. Activitatea enzimelor este în general mai mare cu suporturi hidrofobe cum ar fi Celite sau Bonopore. Celite este unul din cele mai convenabile suporturi utilizate în procesul de imobilizare prin adsorbție și stabilizare al enzimelor în mediu organic (Balcao și colab., 1996; Andersson și colab., 1999). Chiar dacă se adaugă apă în procesul de imobilizare, enzimele imobilizate pe suporturi cu hidrofilicitate mare au activitate mai mică decât cele imobilizate pe suporturi cu hidrofilicitate mică (Adlercreutz, 1991).

Conținutul total de apă poate fi utilizat pentru a estima cantitatea de apă care este legată (sau absorbită) pe materialul de suport, prin stabilirea conținutului total de apă. Într-o reacție de esterificare catalizată de Lipozyme, cantitatea totală de apă s-a observat că scade, chiar dacă în timpul procesului se formează apă. Lipozyme este o lipază din *Mucor miehei* imobilizată pe o rășină macroporoasă schimbătoare de anioni de tip fenolic. S-a demonstrat că aceasta își pierde total activitatea după prima utilizare într-un mediu fără solvenți (Oguntimein și colab., 1995). Aceasta s-a atribuit acumulării de apă formată în timpul reacției de esterificare în materialul de suport. Novozym SP435 este o lipază din *C. Antarctica* imobilizată pe rășină macroporoasă acrilică, și are un conținut de apă de 1-2% (w/w). S-a demonstrat că acest preparat enzimatic conduce la randamente mari de produși esterici în condiții de reacție neapoase (Claon și Akoh, 1993; Fonteyn și colab., 1994). Proteinele enzimatică au în structura lor grupări reactive, grupări cu caracter ionic, grupări hidrofobe, sau domenii hidrofobe. Aceste grupări provenite din aminoacizii constituenți, cât și domeniile hidrofobe pot participa la imobilizarea enzimei prin adsorbție fizică, legare ionică sau legare covalentă.

Imobilizarea prin adsorbție fizică se bazează, așa cum arată și denumirea, pe adsorbția fizică a enzimei pe suprafața suportului insolubil, materialul suportului

nefiind în general funcționalizat specific. Biocatalizatorii se pot fixa pe suport prin interacțiuni fizice cum ar fi legături de hidrogen, interacțiuni hidrofobe, forțe Van der Waals, sau combinații ale acestora. Suporturile utilizate sunt mai ales de natură anorganică, dar se folosesc și polimeri sintetici sau materiale organice naturale, cum este chitosanul cu micropori de mărime controlată. Important este ca aceste materiale să aibă o capacitate de adsorbție ridicată. Pentru stabilizarea enzimei adsorbite se pot folosi metode ca adsorbția urmată de înrețelare cu glutaraldehidă. Adsorbția enzimei depinde de următorii factori:

- pH
- natura solventului
- tăria ionică
- concentrația enzimei și a suportului solid
- temperatură

Metoda adsorbției fizice este foarte utilă și pentru imobilizarea celulelor. În anumite condiții, suporturile pot fi regenerate. Adsorbția nu determină în general modificări conformaționale ale proteinei enzimatică sau distrugerea centrului activ. Deci, cu condiția găsirii unui suport adecvat, această metodă este simplă și eficientă. Dezavantajul principal al acestei metode este tăria redusă a interacțiunii dintre suport și enzimă, care face ca aceasta să fie afectată de condițiile de mediu în care se face utilizarea biocatalizatorului imobilizat, cum ar fi temperatura sau concentrația reactanților. Drept urmare, enzima imobilizată se poate desorbi ușor.

1.5.3. Entraparea în silicageluri

În ultimii ani, o foarte mare atenție s-a acordat aplicațiilor tehnicii sol-gel de entrapare a proteinelor, incluzând enzimele, microorganismelor, și celulelor de țesut animal, pentru descoperirea unor noi biosenzori, catalizatori imobilizați și organe artificiale. Unul din avantajele utilizării materialelor sol-gel pentru entraparea mecanică a enzimelor este acela că permite stabilizarea structurii terțiare a moleculelor de proteină datorită structurii etanșe a gelului. Un alt avantaj este ușurința de a insera grupe de substituenți în matricea de silicat care conferă enzimei imobilizate un micromediu înconjurător avantajos. Aceste avantaje contribuie la stabilizarea enzimei împotriva inactivării termice rezultată din depliere (Kawakami și Yoshida, 1996). Gelurile anorganice au fost cunoscute încă de la începuturile dezvoltării chimiei, prin publicațiile despre sinteza silicagelurilor din alcoxizi în 1846 de către Ebelmen. De atunci tehnica procesului sol-gel a cunoscut o dezvoltare enormă. Materialele utilizate sunt în general oxizi, în special de siliciu, aluminiu, aluminosilicați, dioxid de titan, dioxid de zirconiu, și mulți alții. Cel mai larg studiat dintre aceste materiale este SiO_2 , care este potrivit pentru încapsularea enzimelor. Preferința pentru siliciu se datorează faptului că gelurile corespunzătoare pot fi ușor realizate în mod specific pentru obținerea unei game largi de texturi poroase, rețele structurale, suprafețe funcționale, și condiții de proces. Timpul de gelifiere, pH-ul, forma, transparența sau hidrofobicitatea pot fi adaptate pentru o anumită enzimă sau aplicație. Alte geluri anorganice necesită condiții de reacție cum ar fi pH-ul, care nu sunt întotdeauna favorabile încapsulării unei enzime. Cu toate acestea, gelurile sunt cele mai interesante deoarece o enzimă poate fi imobilizată prin clădirea unei rețele poroase de gel în jurul fiecărei macromolecule de enzimă, așa cum se poate observa în Figura 3, tehnică denumită încapsulare sau entrapare. Nu s-a stabilit încă exact dacă enzima este doar entrapată fizic, sau poate avea loc și o legare adițională multiplă prin interacțiuni covalente, ionice sau hidrofobe (Pierre, 2004).

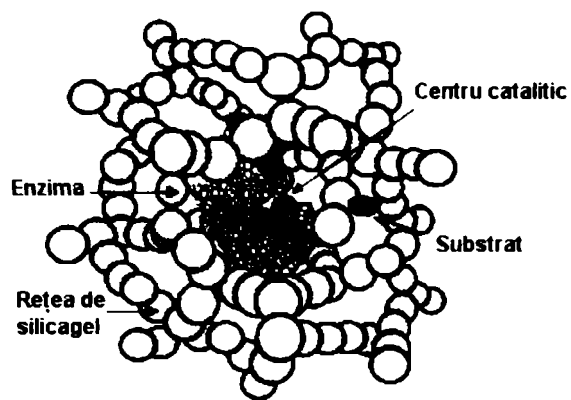
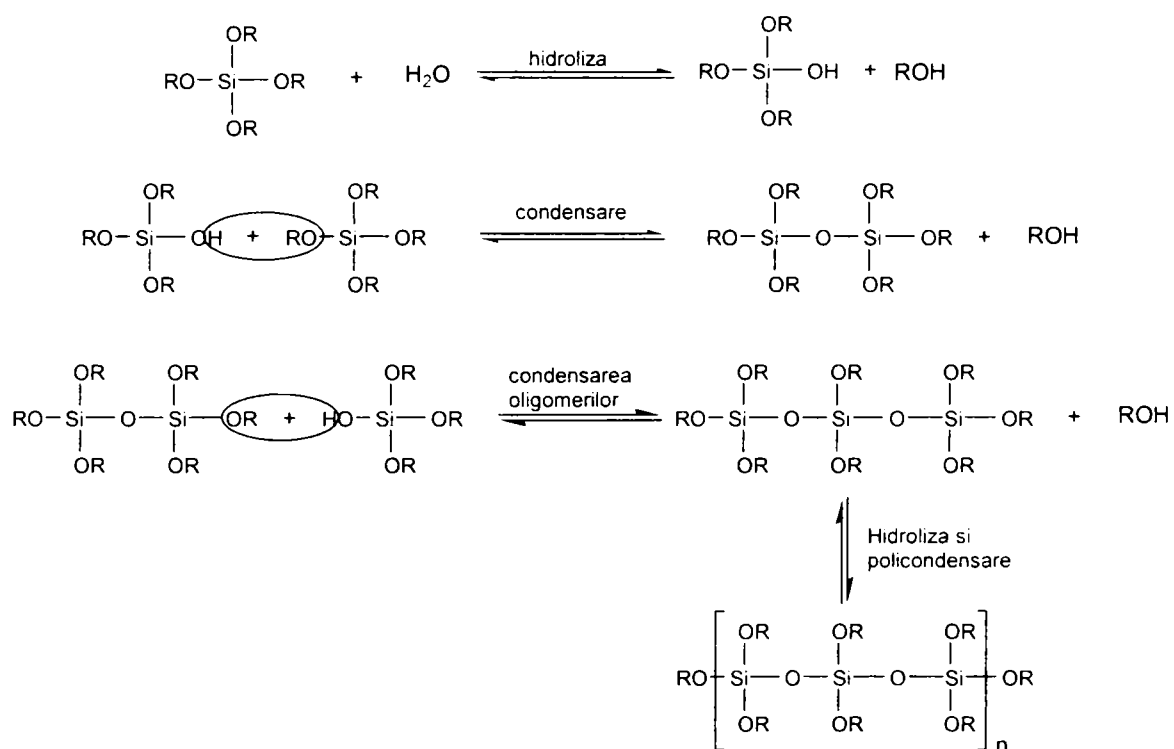


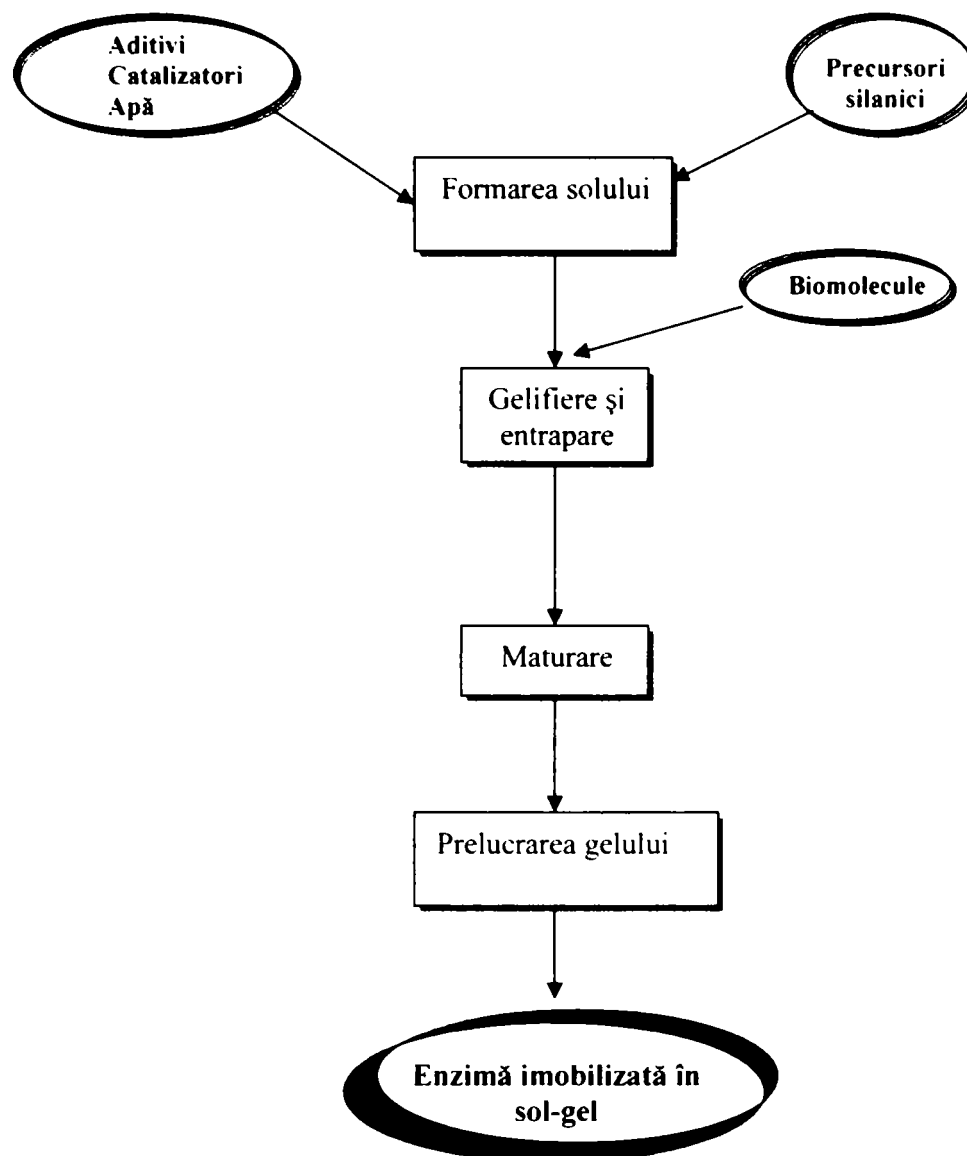
Figura 3. Imaginea schematică a unei enzime entrapate în sol-gel

Procesele sol-gel au fost studiate foarte bine în știința materialelor. Ele pot fi împărțite în două clase în funcție de natura precursorilor: precursori anorganici și precursori alcoxidici. Calea alcoxidică este importantă pentru materialele utilizate la imobilizări și implică transformarea acestor precursori într-un polimer anorganic extrem de reticulat prin hidroliză și reacții de condensare. Exemple de precursori alcoxidici sunt: tetraalcoxisilani, alchiltrialcoxisilani, trialcoxisilani funcționali, alcoximetalaiți.



Schema 3

Biocompușii derivați de sol-gel sunt preparați în mod general conform procesului prezentat în Schema 4 (Jin și Brennan, 2002).



Schema 4.

Formarea unui biocompozit sol-gel începe cu hidroliza parțială sau completă a unui precursor potrivit într-un solvent organic, de exemplu alcoolii, pentru a forma un sol apos (dispersie coloidală a particulelor într-un lichid). Precursorii pot fi alcătuiți din tetraalcoxisilani, mono-, di-, tri-alkilalcoxisilani sau pot conține grupări funcționale de tip alchil, aril, amino carboxil, tiol sau alte grupări. Alte centre metalice cum ar fi: Al, Ti, V sau Ce pot fi de asemenea folosite pentru a modifica proprietățile materialului. Reacția de hidroliză implică un atac nucleofil al apei la atomul de siliciu central. Mecanismul este dependent de catalizatorul folosit. Sunt posibile trei tipuri de cataliză: acidă, bazică (ioni OH⁻) și nucleofilă (F⁻, N-metilimidazol, etc.). Hidroliza poate fi urmată de transesterificare cu aditivi cu compuși conținând grupe hidroxilice, cum ar fi glicerina pentru a forma poli(gliceril silicați) care sunt mult mai biocompatibili decât alcoxisilanii tipici (Gill, 2001). După hidroliză, solul poate fi folosit imediat sau poate fi păstrat timp de câteva săptămâni pentru a permite evoluția continuă a particulelor de sol. În tot acest timp se produc reacții de condensare și continuă hidroliza, rezultând un mare număr de polisilicați liniari, ramificați și coloidali (Schema 3). Precursorul hidrolizat este apoi amestecat cu o soluție tampon apoasă ce conține biomoleculele, alături de catalizatori, aditivi pentru controlul

uscării, polimeri, agenți de modelare sau materiale de umplură, care sunt necesari pentru modificarea proprietăților materialului finit. În mod uzual reacția de polimerizare este inițiată printr-o schimbare a pH-ului și poate dura o perioadă de timp de la minute la ore, rezultând un gel (o structură solidă continuă ce înglobează o fază lichidă continuă). Gelifierea precursorului de sol este însoțită de entraparea biomoleculei.

Gelurile inițiale sunt moi, ușoare și conțin o cantitate mare de apă (50-80%) și pori mari (până la 200 nm diametru). Maturarea rețelei de silicat umed timp de câteva zile până la câteva săptămâni determină continuarea reacțiilor de condensare și face rețeaua mai puternică. În timpul acestei etape, alcoolul entrapat și apa rezultată din hidroliza inițială și din reacția de condensare vor fi îndepărtate din matrice, făcând ca aceasta să se micșoreze cu 10-30%, diametrul porilor să scadă cu aproximativ 25% și proporția relativă a grupărilor siloxan față de grupările de silanol să crească.

În final, materialul maturat este uscat, rezultând evaporarea celei mai mari părți din apa interstițială, continuarea reacțiilor de înrețelare din matrice, micșorarea a porilor până la 2-20 nm și o contractare globală a materialului până la 85% din volumul său inițial. Gelul uscat se numește xerogel. Xerogelurile sunt materiale interesante datorită porozității lor și ariei ridicate a suprafeței lor. Ele pot fi transformate în ceramică prin sinterizare, ceea ce nu este cazul când matricea de siliciu se folosește pentru imobilizarea enzimelor prin entrapare, însă materialul ceramic respectiv poate fi un suport potrivit pentru imobilizarea enzimelor prin adsorbție sau legare covalentă.

1.5.4. Entraparea în silicageluri combinată cu adsorbție pe suport

Tehnica de imobilizarea enzimelor prin entrapare în matrice sol-gel s-a dezvoltat foarte mult în ultima perioadă datorită avantajelor pe care le prezintă și anume: stabilizarea structurii terțiare a moleculelor de enzimă, posibilitatea inserării grupelor de substituenți în matricea de silicat. Adsorbția enzimelor pe suporturi poroase anorganice este o metodă de imobilizare ușor de realizat și frecvent utilizată deși prezintă dezavantajul că legătura suport – enzimă este slabă iar enzima se poate ușor desorbi. Combinând adsorbția cu entraparea în sol-gel se obține o tehnică de imobilizare care permite utilizarea avantajelor ambelor metode. În acest mod suprafața specifică mare a suportului va conduce la o repartiție uniformă fără agregare a enzimei entrapate în sol-gel, iar aceasta va conferi o stabilitate ridicată și proprietăți îmbunătățite preparatului enzimatic imobilizat obținut la final.

1.6. REACȚII ENANTIOSELECTIVE CATALIZATE DE LIPAZE

1.6.1. Noțiuni generale

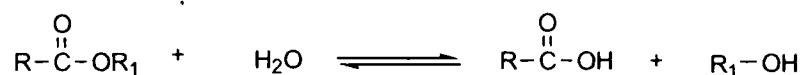
La ora actuală este dovedit faptul că hidrolazele sunt utile în sinteza organică atât la scară de laborator cât și la scară industrială. Motivul constă în natura hidrolazelor. Hidrolazele sunt catalizatori chirali ușor de utilizat, care se utilizează fără coenzime (Dordick, 1989) sunt disponibile comercial într-un număr și varietate foarte mare și prezintă frecvent, alături de o specificitate de substrat redusă și o înaltă selectivitate enantiomerică. Cea mai importantă aplicație a lor este, din acest motiv, în domeniul sintezelor asimetrice la scară preparativă. Lipazele (triacil glicerol acil hidrolazele, E.C.3.1.1.3) sunt cele mai potrivite din clasa hidrolazelor pentru sinteze asimetrice ale substraturilor racemice sau prochirale, deoarece sunt catalitic active în apă, amestecuri de apă-solvent organic nemiscibil cu apa și în solvenți organici (Klibanov, 1990). Acestea sunt disponibile din surse fungice, bacteriene și animale în număr mare, ceea ce explică în parte capacitatea lor de a cataliza sinteze asimetrice. Cele mai utilizate lipaze comerciale sunt lipaza din pancreas de porc (PPL), lipaza din *Pseudomonas cepacia* (PCL), lipaza din *Candida cylindracea* (CCL) (Wu și colab., 1990; Xie, 1991), lipaza din *Pseudomonas* sp. (PSL) (Sztajer și colab., 1991), iar pe o arie mai restrânsă se utilizează lipaza din *Rhizopus delemar* (RDL) (Iwai și Tsujisaka, 1974), lipaza din *Mucor miehei* (MML), lipaza din *Chromobacterium viscosum* (CVL) și lipaza din *Geotrichum candidum* (GCL) (Kazlauskas și colab., 1991). Lipazele sunt în general solubile în apă, insolubile în solvenți organici și pot fi puternic adsorbite la interfața aer/apă.

Lipazele catalizează reacții de derivatizare enantioselectivă a compușilor chirali, și o mulțime de reacții de esterificare, hidroliză, transesterificare și interesterificare. Lipaze din surse diferite pot cataliza aceeași reacție, dar rezultatele pot diferi în aceleași condiții de reacție. Formarea apei prezintă o problemă în reacțiile de esterificare atunci când favorizează reacția reversibilă și anume hidroliza. Într-o reacție de transesterificare, prezența apei conduce la reacții secundare de hidroliză (Yahya și colab., 1998).

Substraturi pentru lipaze sunt în principal acei compuși care conțin grupe esterice enantiotopice prochirale conținute fie în acidul dicarboxilic fie în partea diolică. O a doua dar nu mai puțin însemnată clasă de substraturi sunt amestecurile racemice cum ar fi acizii carboxilici racemici sau alcoolii racemici și esterii acizilor hidroxicarboxilici racemici (Drauz și Waldmann, 1995).

Reacțiile catalizate de lipaze, utilizate în special pentru transformarea selectivă a substraturilor sunt hidrolizele, acilările (transesterificări) și alcoolizele (transesterificări). Esterificarea unui alcool cu un acid carboxilic, destul de utilă în unele cazuri este utilizată doar foarte puțin. Aceste reacții se pot împărți în două categorii mari:

A. Reacții de hidroliză:

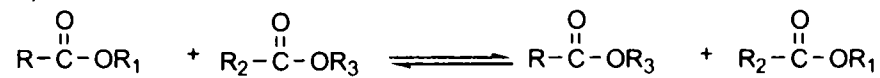


B. Reacții de sinteză:

a) Esterificare:



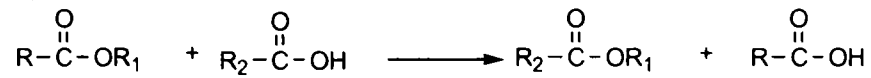
b) Interesterificare:



c) Alcooliză:



d) Acidoliză:



Ultimele trei tipuri de reacții sunt de obicei grupate în categoria reacțiilor de transesterificare (Gandhi, 1997).

1.6.2. Reacții de hidroliză

Reacțiile de hidroliză se desfășoară uzual în soluție apoasă sau într-un amestec de apă cu solvent miscibil sau nemiscibil cu apa. Din cauza excesului mare de apă, echilibrul este aproape complet deplasat în sensul formării acidului carboxilic și a alcoolului și reacția este practic ireversibilă.

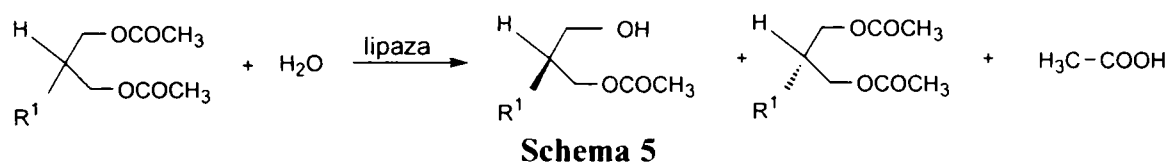
Solubilitatea scăzută a substratului lichid nu prezintă probleme. În cazul substraturilor cristaline, solubilitatea acestora poate fi mărită prin folosirea unui solvent organic. Cei mai utilizați solvenți sunt alcoolii, cum ar fi metanolul și *tert*-butanolul, acetonitrilul, acetona, tetrahidrofuranul, dietileterul, *tert*-butilmetileterul, dimetilformamida sau dimetilsulfoxidul. Utilizarea unui cosolvent depinde de enzimă. La concentrații mai mari stabilitatea și activitatea enzimei poate fi foarte scăzută iar prezența cosolventului poate de asemenea modifica enantioselectivitatea enzimei în ambele direcții. În soluții apoase parametrii care influențează în principal viteza hidrolizei sunt valoarea pH-ului și temperatura. În majoritatea cazurilor hidrolizele enzimatică se desfășoară la pH = 7.0. Pentru recuperarea mai ușoară a enzimei din soluțiile apoase și în alte scopuri enzima poate fi imobilizată prin diferite metode.

Majoritatea lipazelor de origine animală acționează optim la un pH cuprins între 8 și 9, iar cele de origine microbiană la pH între 5.6 și 8.5. Intervalul de temperatură pentru obținerea activității maxime este 30-40°C. În cazul substraturilor labile sau a unei selectivități enantiomerice insuficiente, hidrolizele se pot realiza în solvent organic nemiscibil cu apa cum ar fi diizopropil eterul, hexanul, sau ciclohexanul saturate cu apă.

Lipazele manifestă o activitate catalitică mare în apă și chiar una și mai mare în sisteme bifazice alcătuite din apă și un solvent organic nemiscibil cu apa sau apă și substrat lichid. În sistemele bifazice ca apă – *tert*-butilmetil eter sau apă - hexan, s-au obținut viteze de reacție mult mai mari și enantioselectivități crescute. Enantioselectivitatea și randamentele pot diferi în hidrolize și alcoolize, respectiv în acilări. O combinație a acestor metode poate fi avantajoasă într-o anumită situație pentru obținerea ambilor enantiomeri cu o puritate enantiomerică ridicată (Drauz și Waldmann, 1995).

1.6.2.1. Hidroliza diacetaților

Diacetații primari aciclici sunt substraturi excelente pentru lipaze. Derivații prochirali ai 1,3-propandiolului au fost studiați din punct de vedere al influenței structurii substratului, compoziției mediului de reacție și originii și purității lipazei asupra enantioselectivității. O comparație între hidroliza diacetaților 1,3-propan-diolului 2-alcilsubstituiți cu lipază din pancreas de porc crudă, lipază din pancreas de porc comercială purificată și o fracțiune de carboxilesterază izolată din pancreas de porc crudă arată că ultima menționată dă monoacetatul **1** (Tabelul 3) cu o enantioselectivitate și viteză de reacție mai mare decât primele două. Și în cazurile monoacetaților **2**, **4**, **5**, **6**, excesele enantiomerice sunt mari în reacțiile catalizate de fracțiunea de carboxilesterază izolată din pancreas de porc crud. Imitând condițiile in vivo pentru acțiunea lipazei asupra trigliceridelor, prin adăugare de diizopropil eter în soluția apoasă, și realizarea reacției de hidroliză în sistem bifazic, conduce în câteva dar nu toate cazurile, la o enantioselectivitate și viteză de reacție mare, așa cum s-a demonstrat pentru monoacetații **7** și **8** (Tabelul 3). Nesaturarea în lanțul alchil conduce la un monoacetat cu o valoare a excesului enantiomeric mai mare așa cum se poate observa din exemplele **9** și **10** (Tabelul 3).

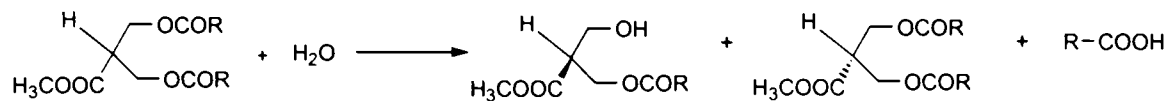


Tabelul 3. Hidroliza catalizată de lipaze a diacetaților diolilor aciclici prochirali în soluții apoase (PPL – lipaza din pancreas de porc)
(Tombo și colab., 1987, 1986; Wang și Sih, 1984; Guanti și colab., 1989, 1990)

	R ¹	R ²	R ³	Lipaza	ee (%)	Randament (%)
1	(CH ₃) ₂ CH	H	COCH ₃	PPL ^{crud}	37	-
1	(CH ₃) ₂ CH	H	COCH ₃	PPL ^a	75	91
1	(CH ₃) ₂ CH	H	COCH ₃	PPL ^{purificată}	f.mic	hidroliza
2	C ₆ H ₅ CH ₂	H	COCH ₃	PPL ^a	61	65
3	CH ₂ =CH-CH ₂	H	COCH ₃	PPL	95	34
4	CH ₂ =CH-(CH ₂) ₂	H	COCH ₃	PPL ^a	≥95	80
5	C ₆ H ₅	H	COCH ₃	PPL ^a	≥95	91
6	c-C ₆ H ₁₁	H	COCH ₃	PPL ^a	60	96
7	(E)-n-Pent-CH=CH	H	COCH ₃	PPL	84	49
8	(E)-n-Pent-CH=CH	H	COCH ₃	PPL	95	63
8	(E)-n-Pent-CH=CH	H	COCH ₃	PPL	93	59
9		H	COCH ₃	PPL	67	29
10		H	COCH ₃	PPL	2	45

^a fracțiune de carboxilesterază izolată din pancreas de porc crudă

Selectivitatea de grup și enantioselectivitatea, la fel ca și influența grupei alchil din funcțiunea acil și influența cosolventului asupra enantioselectivității este demonstrată la hidroliza propandiolului diacilat metoxycarbonilsubstituit la monoesterul corespunzător, catalizată de lipaza din pancreas de porc. Se observă ca cel mai mare exces enantiomeric și randament se obțin când R este n- C₇H₁₃ (J.Ehler și colab., 1990).



Schema 6

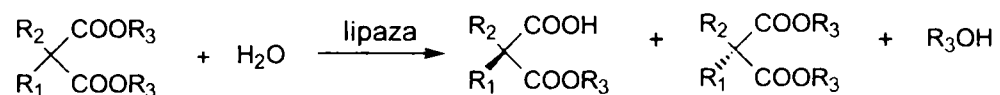
Tabelul 4. Hidroliza catalizată de lipaza din pancreas de porc a unor derivați de propandiol diacilat

R	ee monoester (%)	Randament monoester (%)	Lipaza
n-C ₃ H ₇	65	29	PPL ^d
n-C ₄ H ₉	68	36	PPL ^d
n-C ₅ H ₁₁	70	25	PPL ^d
n-C ₆ H ₁₂	70	17	PPL ^d
n-C ₇ H ₁₃	84	48	PPL ^c

PPL^d lipaza din pancreas de porc cu configurație absolută necunoscută
PPL^c în metanol 30%

1.6.2.2. Hidroliza diesterilor acizilor dicarboxilici

Un număr limitat de diesteri ai acizilor dicarboxilici ciclici și aciclici, au fost bune substraturi pentru hidrolizele catalizate de lipaze. Exemple care ne ilustrează potențialul lipazelor sunt derivații ditioacetalici și trifluoroalchil malonații din Tabelul 5 (Kitazume și colab., 1984, 1986). Se poate concluziona că lipaza din *Candida cylindracea* este cea mai potrivită lipază pentru sinteza fluoroalchil malonaților cu grupe alchil mici.

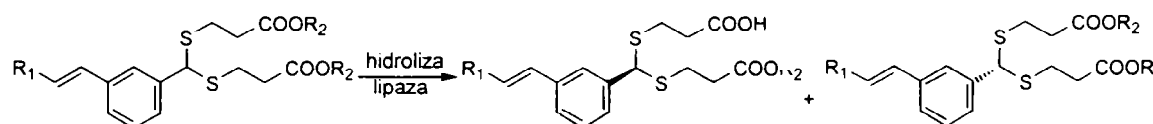


Schema 7

Tabelul 5. Hidroliza diferențiată catalizată de lipaze a diesterilor acizilor dicarboxilici prochirali, ciclici și aciclici, în soluție apoasă.(CCL - lipaza din *Candida cylindracea*, PPL – lipaza din pancreas de porc)

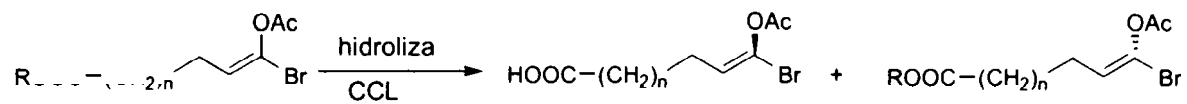
R ₁	R ₂	R ₃	Lipaza	ee monoester (%)	Randament monoester (%)
CF ₃	H	CH ₃	CCL	nu hidrolizează	-
F	C ₂ H ₅	CH ₃	CCL	99	87
F	CH ₃	CH ₃	CCL	95	74
F	CH ₃	C ₂ H ₅	CCL	91	87
F	H	C ₂ H ₅	PPL	61	23
F	H	C ₂ H ₅	CCL	62	70
F	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CCL	93	87
F	n-C ₃ H ₇	C ₂ H ₅	CCL	33	30
F	n-C ₄ H ₉	C ₂ H ₅	CCL	11	78

Ditiomonoesterul de mai jos este obținut cu ajutorul diferitelor lipaze cu selectivitate și randament mare, în ciuda centrului chiral destul de depărtat (Hughes și colab., 1989, 1993).

**Schema 8****Tabelul 6.** Hidroliza ditiodiesterilor cu lipaze(PSL – lipaza din specia *Pseudomonas*, CVL – lipaza din *Chromobacterium viscosum*)

R ₁	R ₂	Lipaza	ee monoester (%)	Randament monoester (%)
	CH ₃	PSL, CVL	≥ 98	90
	CH ₂ CON(C ₂ H ₅) ₂	CCL	≥ 98	90

O înaltă enantioselectivitate este observată nu numai pentru acei esteri care au un centru chiral în poziția α ci și pentru cei care au centrul chiral în poziția β . Un exemplu spectaculos în acest sens este esterul acidului carboxilic acetiloxi substituit, corespunzător exemplului 2 (Tabelul 7), unde centrul chiral este separat de opt grupe metilen de grupa esterică. Acidul 3 este obținut prin hidroliza catalizată de lipaza din *Candida cylindracea* (CCL) a esterului butilic racemic corespunzător cu o foarte mare enantioselectivitate. În mod surprinzător, hidroliza esterului metilic corespunzător decurge cu o enantioselectivitate mult mai mică (Bhalerao și colab., 1991).

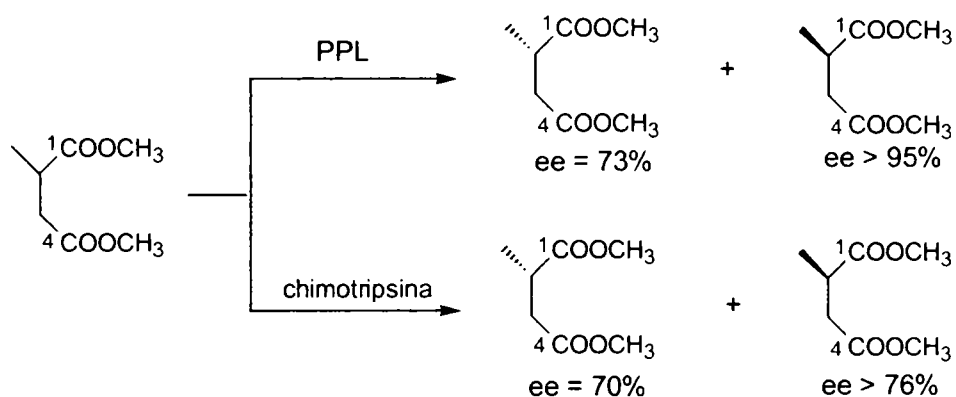


Schema 9

Tabelul 7. Hidroliza esterilor acizilor carboxilici cu centru chiral depărtat

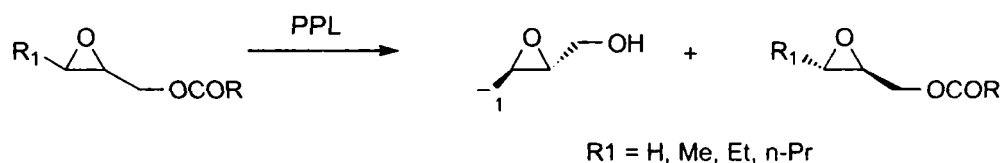
Exemplul	R	n	ee acid (%)
1	Me	4	28
2	Me	8	68
3	Bu	8	>99

O reacție de hidroliză simultan regio- și enantioselectivă este hidroliza dimetil-2-metil succinatului catalizată de PPL (Schema 10). Se observă că se formează (*S*)-esterul iar hidroliza are loc în poziția 4. Esterul rezidual nehidrolizat s-a obținut cu un ee > 95%. Interesant este că α -chimotripsina catalizează aceeași reacție enantioselectivă, dar manifestă o regioselectivitate inversă față de substrat comparativ cu PPL, hidrolizând esterul în poziția 1 (Bianchi și colab., 1988).



Schema 10

Epoxi alcoolii chirali se pot obține cu succes prin hidroliza enantioselectivă catalizată de lipaza din pancreas de porc (PPL) a epoxiesterilor, așa cum se poate observa în Schema 11 (Monsan și Combes, 1984).

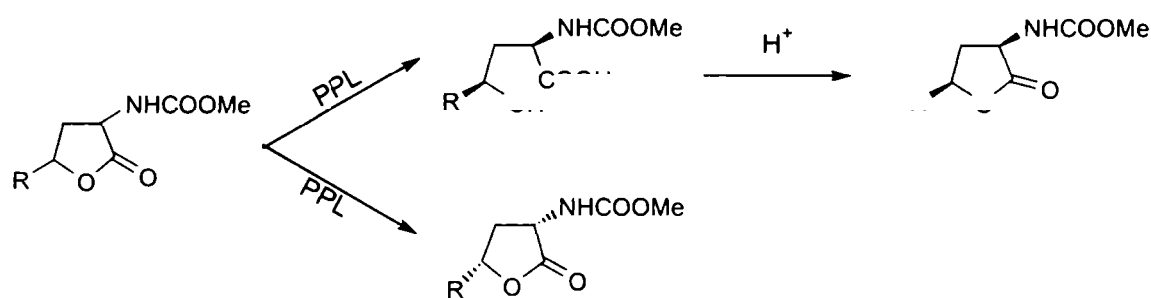


Schema 11

Tabelul 8. Hidroliza epoxiesterilor

R_1	R	ee (%)	Selectivitate E
H	CH ₃	53	5
H	C ₂ H ₅	88	28
H	n-C ₃ H ₇	92	45
H	n-C ₄ H ₉	96	95

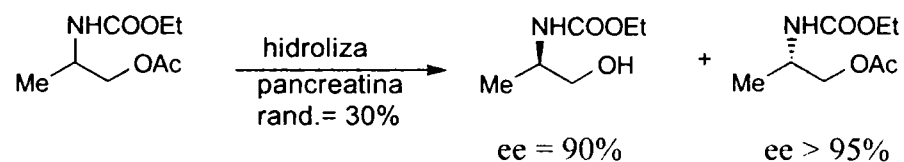
Lipaza din pancreas de porc (PPL) a fost de asemenea utilizată pentru deschiderea α -amino lactonelor γ -substituite, prin reacții enantioselective, așa cum se poate observa din schema de mai jos (Kahn și Siddiqui, 1985). În acest caz separarea produsului de substratul rămas nereacționat se face cu ușurință datorită solubilității diferite la diferite valori de pH.

**Schema 12****Tabelul 9.** Deschiderea ciclurilor α -amino lactonelor γ -substituite

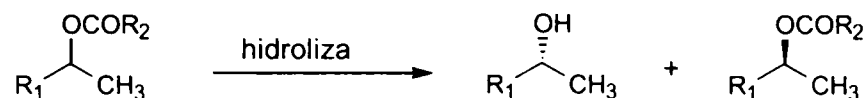
R	ee acid (%)	ee lactonă (%)	Selectivitate E
H	71	62	11
C ₆ H ₅	86	32	18
CH ₂ =CH-	90	95	70

1.6.2.3. Hidroliza alcoolilor acilați

Hidroliza enantioselectivă catalizată de lipaze a alcoolilor primari racemici acilați a fost deocamdată puțin utilizată, și anume doar pentru sinteza derivaților de aminoalcooli și epoxi alcooli. Un exemplu în acest sens este reacția de mai jos. Se observă că excesele enantiomerice sunt foarte mari, deși randamentele sunt de aprox. 30% (Francalanci și colab., 1987).

**Schema 13**

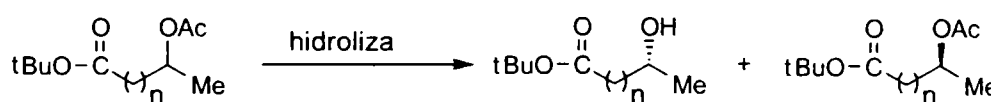
Hidroliza enantioselectivă catalizată de lipaze a alcoolilor secundari racemici acilați este la ora actuală una din cele mai bune metode pentru sinteza alcoolilor secundari optic activi. Din numărul mare de exemple existente se pare că nu există restricții cu privire la natura substratului, iar datorită multitudinii de lipaze disponibile fie ca enzime izolate fie conținute în diferite organisme, pare posibilă găsirea lipazei potrivite fiecărui substrat. Este posibilă hidroliza și alcooliza înalt enantioselectivă catalizată de lipaze a esterilor dintr-un domeniu structural larg al alcoolilor secundari. Nu numai alcoolii secundari de tipul aril-alchil sau dialchil sunt accesibili, dar și aceia care conțin tot felul de grupe funcționale în diferite poziții (Schemele 14-17).



Schema 14

Tabelul 10. Hidroliza enantioselectivă a esterilor alcoolilor racemici aciclici în soluții apoase (Cambou și Klibanov, 1984; Laumen și Schneider, 1988) (CCL - lipaza din *Candida cylindracea*, PSL – lipaza din specia *Pseudomonas*, PCL - lipaza din *Pseudomonas cepacia*)

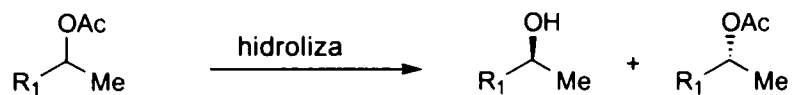
R ₁	R ₂	Lipaza	ee alcool (%)	Randament alcool (%)	ee ester (%)	Randament ester (%)
Et	Pr	CCL	90	39	88	40
Ph	Me	PSL	>99	48	>99	48
4-Me-C ₆ H ₄	Me	PSL	97	47	99	45
4-MeO-C ₆ H ₄	Me	PSL	80	46	80	47
PhCH ₂	Me	PSL	95	47	97	48
4-piridil	Me	PSL	95	46	89	47
2-naftil	Me	PSL	>99	43	>99	46
Ph	CH ₂ Cl	PSL	94	50	96	44



Schema 15

Tabelul 11. Hidroliza enantioselectivă a esterilor alcoolilor secundari cu lipaza din specia *Pseudomonas* (Scilimati și colab., 1988)

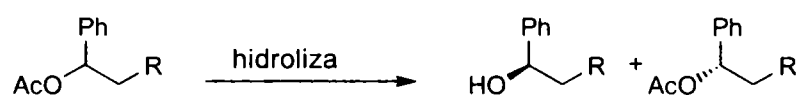
n	Lipaza	ee alcool (%)	ee ester (%)
0	PSL	>99	96
1	PSL	>99	-
5	PSL	>99	-
10	PSL	>99	-



Schema 16

Tabelul 12. Hidroliza enantioselectivă a esterilor alcoolilor secundari cu lipaza din *Candida cylindracea* (Lin și colab., 1987)

R ₁	Lipaza	ee alcool (%)	ee ester (%)
Ph	CCL	57	-
CH ₂ Ph	CCL	94	98
CH ₂ CH ₂ Ph	CCL	98	-
2-stiril	CCL	93	-
CH ₂ CO ₂ Et	CCL	96	-
CH ₂ CO ₂ Hex	CCL	94	-



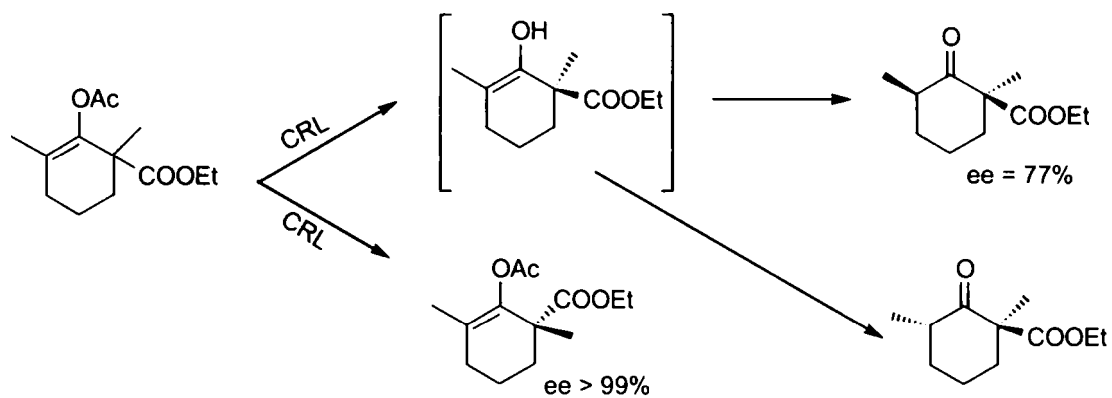
Schema 17

Tabelul 13. Hidroliza enantioselectivă a esterilor alcoolilor secundari cu lipaza din specia *Pseudomonas* (Kutsuki și colab., 1986; Mori și Bernotas, 1990)

R	Lipaza	ee alcool (%)	Randament alcool (%)	ee ester (%)	Randament ester (%)
Cl	PSL	100	24	100	29
Br	PSL	94	24	100	11
C ₅ H ₁₁	PSL	92	-	>99	-
C ₆ H ₁₃	PSL	98	-	>99	-
C ₇ H ₁₅	PSL	97	-	98	-

1.6.2.4. Hidroliza enolilor

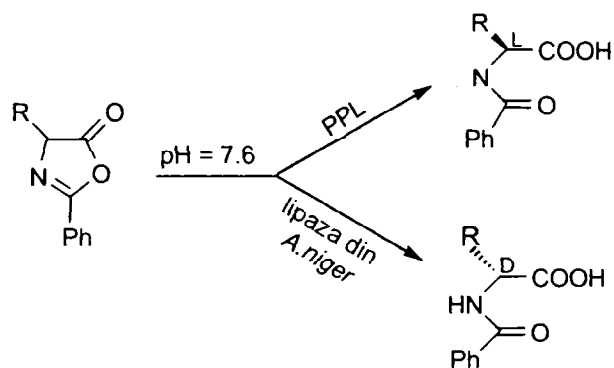
Amestecul racemic de esteri ai ciclohexil enolului din schema de mai jos a fost hidrolizat enzimatic cu lipază din *Candida rugosa* (CRL), obținându-se un cetoester cu un stereocentru (*S*) în poziția α. De asemenea, are loc o protonare diastereoselectivă a enolului obținându-se cetoesterul cu configurația (*R*) la carbonul din poziția γ și doar o mică cantitate de diastereomer cu configurație (*S,S*). Enolul netransformat de configurație (*R*) a fost de puritate optică > 99% (Luisi, 1985).



Schema 18

1.6.2.5. Hidroliza heterocicililor

Hidroliza heterocicililor, cum ar fi oxazolin-5-onele, poate fi realizată de către proteaze, esteraze și lipaze (Kaul și colab., 1984). Reacția catalizată de proteaze conduce la produși cu puritate optică mică, spre deosebire de lipaze care sunt catalizatori eficienți în acest caz (Karube și colab., 1985). Dacă hidroliza este condusă în anumite condiții, pH = 7.6, se pot obține N-benzoil aminoacizi, cu diferite valori ale purității optice în funcție de substituentul la carbonul C₄, așa cum se poate observa mai jos. Reacția catalizată de PPL conduce la L-aminoacizi pe când cea catalizată de lipaza din *Aspergillus niger* duce la formarea D-aminoacizilor.



Schema 19

Tabelul 14. Hidroliza catalizată de lipaze a oxazolinonelor

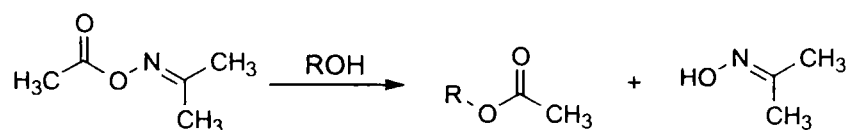
R	Lipaza	Configurația	ee (%)
Ph-	PPL	L	76
CH ₃ -S-CH ₂ -CH ₂ -	PPL	L	80
(CH ₃) ₂ CH-CH ₂ -	PPL	L	87
3-indolil-CH ₂ -	PPL	L	98
Ph-CH ₂ -	PPL	L	>99
Ph-	<i>Sp. Aspergillus</i>	D	80
CH ₃ -S-CH ₂ -CH ₂ -	<i>Sp. Aspergillus</i>	D	83
Ph-CH ₂ -	<i>Sp. Aspergillus</i>	D	>99

1.6.3. Reacții de sinteză

Din numărul mare de hidrolaze cunoscute doar lipazele și subtilizina prezintă o destul de înaltă activitate catalitică în solvenți organici cu conținut scăzut de apă, pentru a fi utile în sintezele asimetrice prin acilarea alcoolilor racemici sau prochirali, alcooliza alcoolilor acilați racemici sau prochirali și anhidridelor prochirale și ciclizarea acizilor hidroxicarboxilici racemici (Poppe și colab., 1992; Klivanov, 1990). Lipazele sunt foarte utile în sinteza organică de când s-a descoperit că ele manifestă o activitate catalitică mare nu numai în apă sau sisteme bifazice compuse din apă și solvent organic nemiscibil cu apa, sau cu substraturi lichide dar cel mai important în solvenți organici nemiscibili cu apa și cu conținut redus de apă. Ele sunt utilizate în mod avantajos pentru acilarea diolilor prochirali sau alcoolilor racemici și pentru alcooliza alcoolilor racemici acilați.

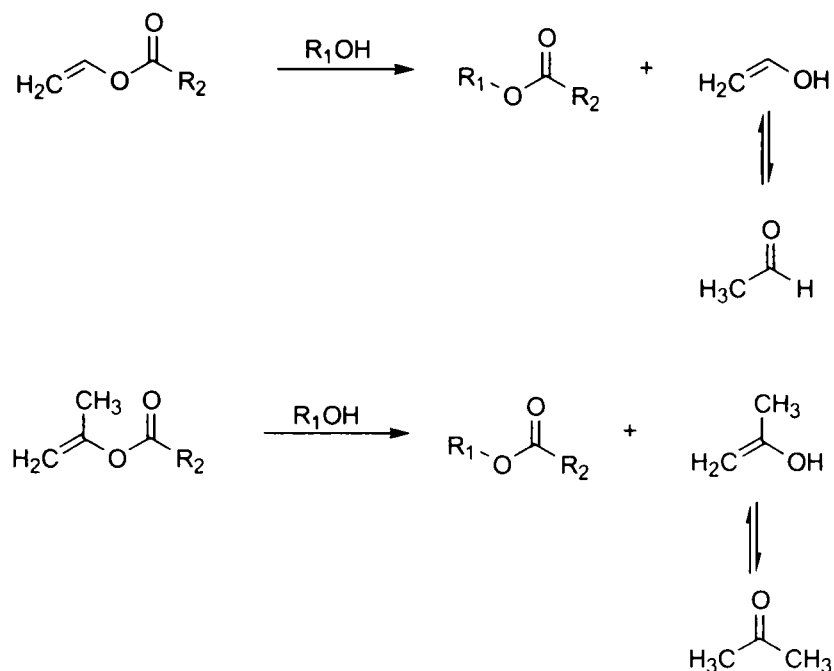
Formarea legăturilor C-O este realizată prin utilizarea activității de transferază a lipazelor în reacții de acilare și alcoolize (transesterificări) în mediu organic cu conținut redus de apă. Lipazele ca și alte hidrolaze nu sunt solubile în solvenți organici. Acestea formează mai degrabă suspensii de agregate proteice și sunt active doar în prezența unei anumite cantități de apă adsorbită sau legată de către enzimă sau dizolvată în solventul organic. Solvenții organici cu o solubilitate mare pentru apă nu sunt potriviți probabil datorită deshidratării enzimei. Solvenții folosiți uzual sunt: dietileterul, diizopropileterul, *terț*-butimetileterul, tetrahidrofuranul, clorura de metilen, pentanul, hexanul sau toluenul. S-a observat frecvent că enantioselectivitatea acilării unui alcool catalizată de o lipază într-un solvent organic este mai mare decât hidroliza acetatului corespunzător catalizată de aceeași lipază în apă. Pentru obținerea unor poziții extreme ale echilibrului în reacțiile de acilare ale alcoolilor catalizate de lipaze în medii organice, esterii acizilor grași trifluoro- sau tricloroetilați, vinil esterii (acetatul de vinil, butiratul de vinil, propionatul de vinil, lauratul de vinil, palmitatul de vinil, cloroacetatul de vinil), esterii oximelor sau anhidridele acizilor carboxilici sunt utilizate cu mare succes, deoarece acestea conduc practic la reacții ireversibile. Dintre acestea esterii vinilici sunt cei mai utilizați. Majoritatea lipazelor utilizate pentru formarea legăturilor C-O în aceste condiții sunt preparate crude care în multe cazuri conțin doar câteva procente din lipaza de interes pe lângă alte proteine care pot fi chiar alte lipaze și aditivi (Drauz și Waldmann, 1995).

Rezoluția amestecurilor racemice este una din cele mai atractive metode utilizate pentru obținerea compușilor optic activi. Rezoluția cinetică se definește ca fiind reacția chimică a unui amestec racemic în care unul dintre cei doi enantiomeri ai substratului reacționează mai rapid decât celălalt (Eliel și Wilen, 1994). Dintre toate metodele utilizate în rezoluția cinetică, transesterificarea în solvenți organici catalizată de lipaze este cea dominantă. În prezența unui donor acil, a unui solvent și a unei enzime potrivite, la o temperatură optimă, unul din enantiomerii amestecului racemic este transformat selectiv în esterul corespunzător, lăsând celălalt enantiomer nereacționat în forma enantiomeric pură. Pentru a deplasa echilibrul spre o reacție ireversibilă, a fost propusă utilizarea esterilor de oxime ca agenți de acilare (Schema 20).



Schema 20

Există totuși câteva dezavantaje, cum ar fi inhibiția generată de un cosubstrat și reversibilitatea reacției. Cea mai bună metodă pentru o transesterificare ireversibilă este utilizarea un enol ester (Schema 21), când reacția inversă este împiedicată datorită tautomerizării alcoolului enolic rezultat la acetaldehidă sau acetonă, depinzând de donorul de acil utilizat : izopropenilester sau vinil ester (Ghanem, 2005).



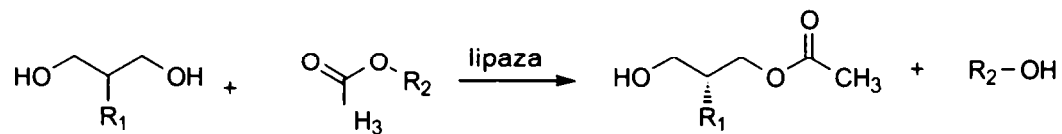
Schema 21

Enantioselectivitatea și termostabilitatea enzimei poate fi mărită dacă se utilizează solvenți organici cu conținut minim de apă. O cantitate minimă de apă este necesară pentru activitatea catalitică a lipazei. În general se folosesc preparate de lipază cu un conținut rezidual de apă de aproximativ 1% în solvenți organici anhidri. În mod uzual termostabilitatea lipazelor este mult mai mare în solvenți organici cu conținut redus de apă decât în soluții apoase. O alternativă pentru reacțiile de acilare este imobilizarea lipazei prin adsorbție, care conduce la recuperarea ușoară prin filtrare și posibilitatea reutilizării sale și asigură o suprafață mare de contact în reacția heterogenă (Drauz și Waldmann, 1995).

1.6.3.1. Acilarea diolilor aciclici și ciclici

Diolii sunt intermediari valoroși pentru o serie de reacții chimice. În multe aplicații însă este necesară acilarea numai a grupei $-\text{OH}$ primare. A fost realizată acilarea regioselectivă a diolilor cu o grupă $-\text{OH}$ primară și una secundară prin transesterificarea unor acetati de alchil în prezența lipazelor fără a se determina enantioselectivitatea reacției (Peter și colab., 1995, 1997).

O serie de derivați ai 1,3-propandiolului substituiți în poziția 2 cu grupe alchil, alcoxi, acilamino au fost supuși acilării catalizate de lipaze iar monoacetații s-au obținut cu exces enantiomeric de la moderat la mare, așa cum se poate observa în Tabelul 15. Agentul de acilare a îndeplinit și rol de solvent. Randamentele obținute au fost ridicate. Reacțiile în și cu acetat de etil în general decurg mai încet decât reacțiile cu și în acetat de vinil (Tsuji și colab., 1989; Tombo și colab., 1986; Atsumi și colab., 1990; Wang și colab., 1988; Terao și colab., 1988; Murata și colab., 1989).



Schema 22

Tabelul 15. Acilarea enantioselectivă catalizată de lipaze a diolilor aciclici prochirali în solvenți organici, cu lipază din pancreas de porc (PPL) și *Pseudomonas fluorescens* (PFL)

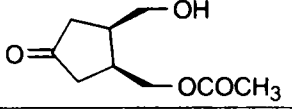
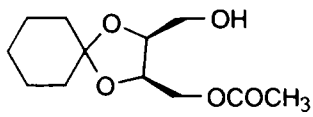
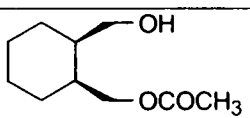
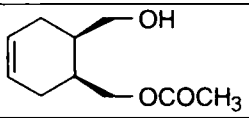
R ₁	R ₂	Lipaza	e.e. (%)	Randament (%)
CH ₃	CH ₂ =CH	PFL	60	70
CH ₂ =CH-CH ₂	CH ₂ =CH	PFL	81	89
CH ₂ =CH-(CH ₂) ₂	CH ₃ CH ₂	PPL	90	70
C ₆ H ₅	CH ₃ CH ₂	PPL	92	98
C ₆ H ₅ CH ₂	CH ₃ CH ₂	PPL	13	90
C ₆ H ₅ CH ₂	CH ₂ =CH	PFL	>94	100
1-C ₁₀ H ₇ CH ₂	CH ₂ =CH	PFL	86	93
i-Pr	CH ₂ =CH	PFL	61	85
C ₆ H ₁₁	CH ₃ CH ₂	PPL	58	90
C ₆ H ₁₁ CH ₂	CH ₃ CH ₂	PPL	10	90
C ₆ H ₅ CH ₂ OCONH	CH ₂ =CH	PPL	97	77
C ₆ H ₅ CH ₂ O	(CH ₃) ₂ CH	PFL	96	53
C ₆ H ₅ CH ₂ O	CH ₂ =CH	PFL	92	92
C ₆ H ₅ CH ₂ O	CH ₃ CH ₂	PFL	90	88
C ₂ H ₅ O	C ₆ H ₅	PFL	90	90

S-a studiat și acilarea enantioselectivă catalizată de lipaze a derivaților ciclici ai 1,4-butandiolului, în diferiți solvenți cum ar fi acetatul de vinil, acetatul de etil sau anhidride acetică. Din Tabelul 16 se observă că s-au obținut excese enantiomerice și randamente ridicate.

Tabelul 16. Acilarea enantioselectivă a diolilor ciclici prochirali în solvenți organici cu lipază din pancreas de porc (PPL) și *Pseudomonas fluorescens* (PFL) (Ader și colab., 1989; Hemmerle și Gais, 1987; Hemmerle, 1990)

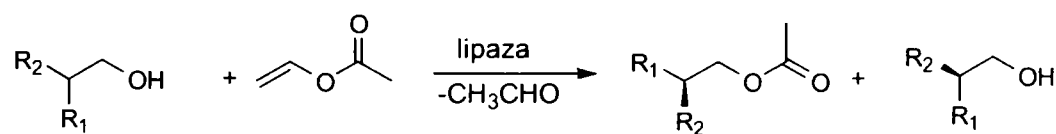
Monoacetatul sintetizat	ee (%)	Randament (%)	Lipaza	Agent de acilare
	>95	82	PFL	Acetat de vinil
	88	87	PFL	Acetat de vinil
	>95	82	PFL	Acetat de etil
	>95	85	PFL	Acetat de vinil

Tabelul 16 – continuare

	94	64	PPL	Acetat de vinil
	77	91	PPL	Acetat de vinil
	>98	78	PFL	Acetat de vinil
	94	71	PFL	Anhidridă acetică
	7	44	PFL	Acetat de vinil
	80	60	PFL	Acetat de vinil

1.6.3.2. Acilarea alcoolilor primari

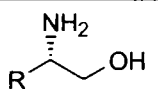
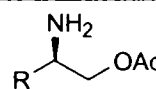
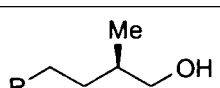
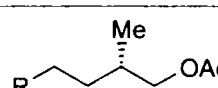
Un mare număr de alcooli primari cu substituenți cu azot sau oxigen legați de atomul de carbon chiral, se pot acila enantioselectiv cu reactivi de acilare uzuali, obținându-se ambii enantiomeri ai alcoolului și acetatului așa cum se poate observa în Tabelul 17.



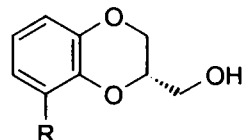
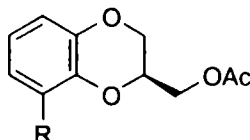
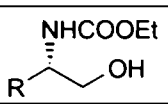
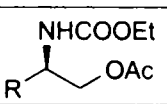
Schema 23

Tabelul 17. Acilarea enantioselectivă a amestecurilor racemice de alcooli aciclici primari cu acetat de vinil în solvenți organici, în prezența lipazei din pancreas de porc (PPL) și *Pseudomonas cepacia* (PCL)

(Fernandez și colab., 1992; Ferraboschi și colab., 1990; Antus și colab., 1993; Ennes și Old, 1992; Francalanci și colab., 1987)

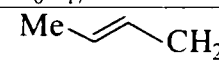
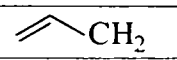
			
ee alcool (%)	R	Lipază	ee acetat (%)
85	Me	PPL	73
83	Et	PPL	78
99	Pr	PPL	99
95	Bu	PPL	95
			
ee alcool (%)	R	Lipază	ee acetat (%)
98	PhS	PCL	98
98	PhSO ₂	PCL	98

Tabelul 17 – continuare

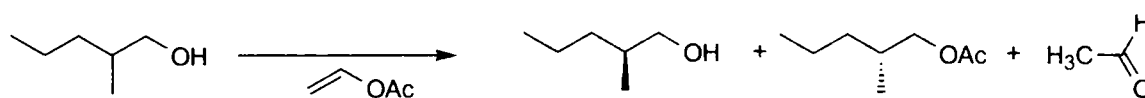
					
ee alcool (%)	Randament alcool (%)	Lipază	R	ee acetat (%)	Randament acetat (%)
>99	37	PCL	H	26	-
83	44	PCL	Ome	81	43
					
ee alcool (%)	Randament alcool (%)	Lipază	R	ee acetat (%)	Randament acetat (%)
90	31	PPL	Me	>95	30
>95	31	PPL	Et	92	32

În mod remarcabil, o serie de alcooli primari al căror centru chiral are un substituent alchil, s-au obținut cu înaltă enantioselectivitate prin acilare catalizată de lipaza din *Pseudomonas fluorescens*, cu acetat de vinil în clorură de metilen. În toate cazurile acilarea a fost (*S*)-specifică. Exemple de acest tip se pot observa în Tabelul 18. Acetatul corespunzător obținut a fost de puritate enantiomerică foarte mică.

Tabelul 18. Obținerea alcoolilor primari cu substituent alchil la atomul de carbon chiral, prin acilări enantioselective cu acetat de vinil, în clorură de metilen catalizate de lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (Barth și Effenberger, 1993).

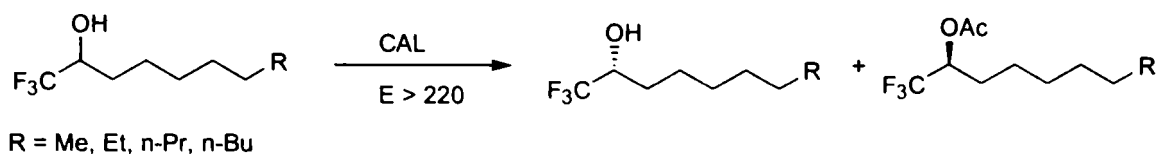
R₁	R₂	ee alcool (%)	Randament (%)
C ₃ H ₇	CH ₃	99	22
C ₄ H ₉	CH ₃	97	23
C ₄ H ₉	C ₂ H ₅	96	20
(CH ₃) ₂ CHCH ₂	CH ₃	98	29
C ₆ H ₁₇	CH ₃	98	26
Me-  -CH ₂	CH ₃	96	33
 -CH ₂	CH ₃	97	25

Acilarea enantioselectivă a (*R,S*)-2-metil-1-pentanolului cu acetat de vinil s-a făcut cu o lipază din specia *Pseudomonas*, imobilizată prin legături ionice în porii unei rășini schimbătoare de anioni Duolite A 568. S-a urmărit obținerea izomerului (*R*) al alcoolului, acesta având în finalul reacției puritatea enantiomerică > 95% (Indlekofer și colab, 1996).



Schema 24

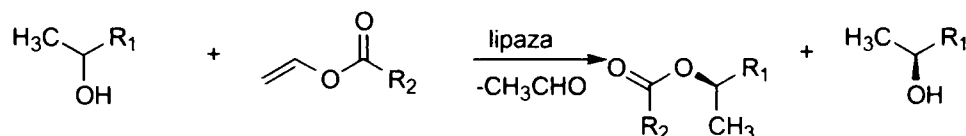
În studiile făcute pentru obținerea unor 1.1.1-trifluoro-2-alcanoli s-a descoperit că dintre 40 de lipaze utilizate, cea mai bună în acest scop a fost lipaza din *Candida antarctica* (CAL). Toți compușii obținuți au avut puritatea enantiomerică > 99%, reacțiile au avut loc în hexan, agentul de acilare fiind acetatul de vinil. Timpul de reacție a fost 6-11 zile iar conversiile au fost între 14-35% (Itoh și colab., 1997).



Schema 25

1.6.3.3. Acilarea alcoolilor secundari

Acilarea enantioselectivă catalizată de lipaze a alcoolilor secundari a fost studiată pentru o gamă largă de amestecuri racemice și s-a demonstrat că este metodă generală de obținere a alcoolilor secundari enantiomeric puri (Schema 26). Această reacție este complementară hidrolizei catalizate de lipaze a alcoolilor acilați corespunzători. În Tabelul 19 se pot observa câteva exemple din acest tip de reacție, realizate cu diferiți agenți de acilare, excesele enantiomerice obținute având valori ridicate.



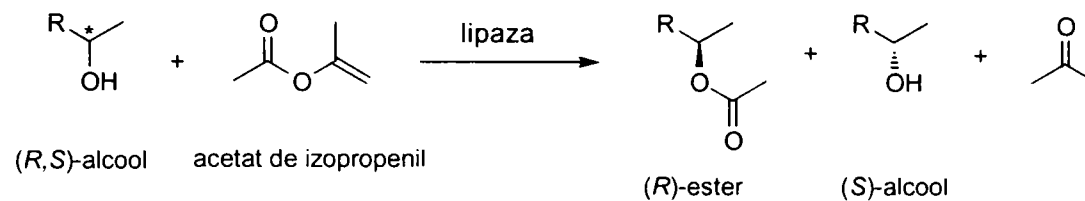
Schema 26

Tabelul 19. Esterificarea enantioselectivă a amestecurilor racemice de alcooli secundari aciclici, catalizată de lipaze în solvenți organici

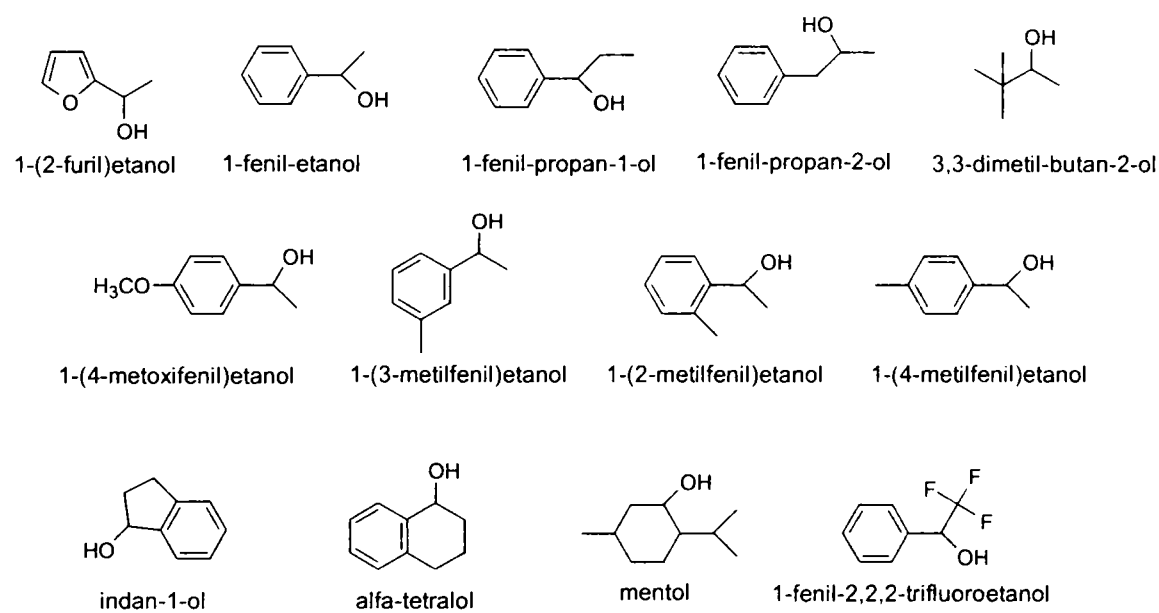
R ₁	R ₂	Lipaza	Agent de acilare	ee ester (%)	Rand. ester (%)	ee alcool (%)	Rand. alcool (%)
C ₂ H ₅	Pr	CCL	Tributirină	93	38	89	35
C ₆ H ₁₃	Pr	PPL	Cl ₃ CCH ₂ OCOPr	95	35	90	30
C ₆ H ₁₃	Pr	CCL	Tributirină	92	41	95	38
C ₈ H ₁₇	Pr	PPL	Cl ₃ CCH ₂ OCOPr	>99	44	95	44
C ₁₄ H ₂₉	Pr	PPL	Cl ₃ CCH ₂ OCOPr	98	42	>99	43
	C ₁₁ H ₂₃	PPL	CF ₃ CH ₂ OCOC ₁₁ H ₂₃	80	38	>97	43
	Pr	PPL	Cl ₃ CCH ₂ OCOPr	87	31	92	26
Ph	Ac	PSL	CH ₂ =CHOAc	>99	45	93	41
Ph	Ac	PCL	Ac ₂ O	>95	39	>95	43
PhCH ₂	Ac	PSL	CH ₂ =CHOAc	>99	30	66	43
PhCH ₂	COEt	PCL	(EtCO) ₂ O	>95	39	92	43
1-naftil	Pr	PPL	Cl ₃ CCH ₂ OCOPr	95	47	>95	46
2-naftil	Pr	PSL	CH ₂ =CHOAc	>99	41	95	48

(PCL- lipaza din *Pseudomonas cepacia*; PPL – lipaza din pancreas de porc; CCL - lipaza din *Candida cylindracea*; PSL – lipaza din specia *Pseudomonas*)
(Cambou și Klibanov, 1984; Ambramowicz și Keese, 1989; Kirchner și colab., 1985; Wang și colab., 1988; Stokes și Oehlschlager, 1987; Laumen și colab., 1988; Bianchi și colab., 1988; Theisen și Heathcock, 1988).

Un studiu făcut asupra reacției de acetilare asimetrică a unui set de alcooli secundari racemici (Schema 28) cu acetat de izopropenil în toluen, a condus la obținerea alcoolilor chirali și a acetatilor corespunzători cu un exces enantiomeric ridicat (>99%). Enzima folosită a fost lipaza din *Pseudomonas cepacia* coliofilizată cu β-ciclodextrină peracetilată entrapată în sol-gel. Enantiomerii obținuți, ai substratului respectiv produsului, au fost separați fără derivatizare, prin cromatografie de gaze. Reacția generală se poate observa în Schema 27 (Ghanem și Schurig, 2003; Ghanem, 2003).

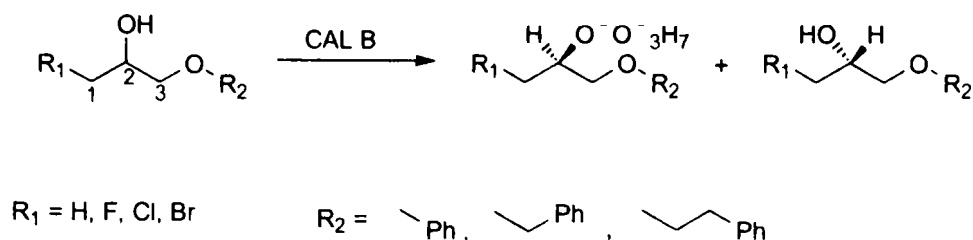


Schema 27



Schema 28

S-a studiat reacția de transesterificare a unui set de nouă alcooli secundari racemici și butanoatul de vinil și butanoatul de 2,2,2.-trifluoroetil ca donor de acil (Schema 29).



Schema 29

Acil donorii s-au utilizat în exces de 5:1 față de alcooli racemici, iar solventul a fost hexanul. Lipaza utilizată ca și catalizator a fost lipaza B din *Candida antarctica* (Novozyme 435). Selectivitatea reacțiilor, depinde de grupa protectoare a funcțiunii hidroxilice din poziția 3 și de halogenul din poziția 1. De asemenea, pentru unele substraturi valoarea factorului enantiomeric E depinde de agentul de acilare. Rezultatele obținute se pot observa în Tabelul 20 (Hoff și colab. 2000).

Tabelul 20. Transesterificarea alcoolilor secundari racemici cu lipaza din *Candida antarctica*

Substrat	R ₁	R ₂	E Butanoat de vinil	E Butanoat de 2,2,2- trifluoroetil
1	F	Ph	87	490
2	F	CH ₂ Ph	4	17
3	F	CH ₂ CH ₂ Ph	37	375
4	Cl	Ph	11	41
5	Cl	CH ₂ Ph	13	20
6	Cl	CH ₂ CH ₂ Ph	15	32
7	Br	Ph	58	37
8	Br	CH ₂ Ph	9	13
9	Br	CH ₂ CH ₂ Ph	52	26

Rezultate recente (Reetz și colab., 2003) demonstrează conversii și enantioselectivități înalte ale lipazelor entrapate în sol-gel în reacții de acilare enantioselectivă ale unor alcooli secundari aciclici. Entraparea lipazei în sol-geluri hibride hidrofobe, derivate dintr-un amestec de tetraalcoxisilan și silani alchil-substituiți, a dus la activitate înaltă și stabilitate ridicată a enzimei entrapate. Acestea sunt datorate interacțiunilor dintre domeniile lipofile ale enzimei și zonele hidrofobe ale catalizatorului, care au drept rezultat modificări conformaționale ale centrului activ, în special deplasarea capacului α -elicoidal. Astfel enzima devine accesibilă moleculelor de substrat și activitatea observată crește. Această tehnică pare să fie generală pentru lipaze și conduce la produși imobilizați care pot cataliza biotransformări regio-, chemo- și enantioselective, atât în medii apos-organice cât și în solvenți organici.

Precursorii silanici au fost amestecuri de *n*-butil-trimetoxisilan sau *izo*-butil-trimetoxisilan și tetrametoxisilan în raport 5:1. Alcoolul polivinilic și alcoolul izopropilic au fost utilizați ca aditivi și fluorura de sodiu ca și catalizator. În unele experimente au fost utilizați aditivi adiționali, un eter coroană (18-coroană-6) și un surfactant (Tween 80). În unele cazuri enzimele imobilizate au arătat enantioselectivități neobișnuit de mari față de substraturi racemice. În Tabelul 21 sunt

prezentate activitățile relative (față de enzima liberă) și enantioselectivitățile în reacția de acilare cu acetat de vinil a 1-fenil-etanolului și 1-naftil-etanolului racemic.

Tabelul 21. Rezoluția cinetică a unor alcooli secundari racemici în prezența lipazei din *Burkholderia cepacia*, liberă și încapsulată în sol-gel.

Substrat	Tipul lipazei	Aditiv	Activitate relativă	E
1-fenil-etanol ^a	liberă	-	1	> 100
	imob.sol-gel	-	11.1	> 100
	imob.sol-gel	18-coroană-6	16.8	> 100
	imob.sol-gel	Tween 80	22.2	> 100
1-naftil-etanol ^b	liberă	-	1	> 100
	imob.sol-gel	-	22.9	> 100
	imob.sol-gel	18-coroană-6	15.1	> 100
	imob.sol-gel	Tween 80	15.2	> 100

^asolvent: izooctan

^bsolvent: toluen

Alcoolii secundari ciclici se pot de asemenea acila enantioselectiv în prezența lipazelor. În Tabelul 22 se pot observa câteva exemple de acest tip.

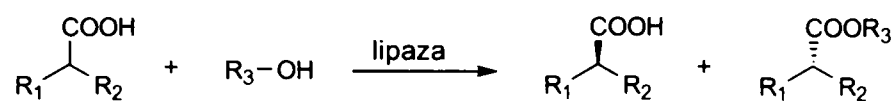
Tabelul 22. Acilarea enantioselectivă a amestecurilor racemice de alcooli secundari ciclici catalizată de lipaze, în solvenți organici (CCL - lipaza din *Candida cylindracea*, PCL - lipaza din *Pseudomonas cepacia*, CAL - lipaza din *Candida antarctica*)

(Fritschke și colab., 1989; Frykman și colab., 1993; Berkowitz și colab., 1991, 1992)

ee alcool (%)	Randament alcool (%)	Lipază	Agent acilare	ee acetat (%)	Randament acetat (%)
96	36	CCL	Triacetină	95	48
97	-	CAL	EtSCOC ₇ H ₁₅	97	-
>97	47	PCL	CH ₂ =CHOAc	97	47

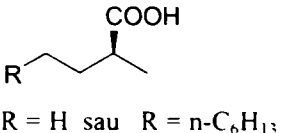
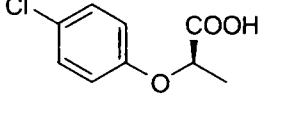
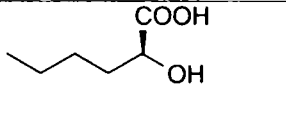
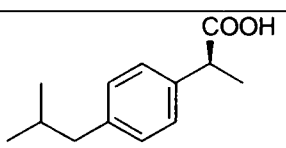
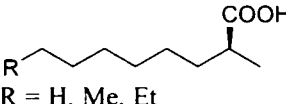
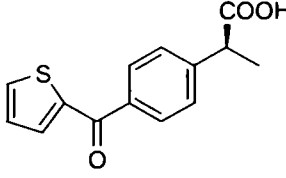
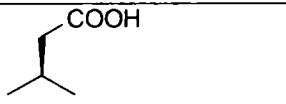
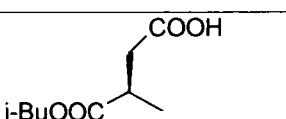
1.6.3.4. Esterificarea acizilor carboxilici

Esterificarea directă a acizilor carboxilici racemici are loc în solvenți organici, în prezența a diferite tipuri de lipaze. În Tabelul 23 se pot observa câteva exemple, selectivitatea fiind foarte bună.



Schema 30

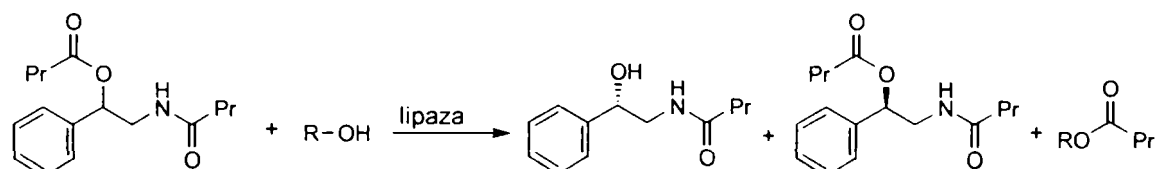
Tabelul 23. Esterificarea enantioselectivă a acizilor carboxilici în prezență de lipază din *Candida rugosa* (CRL) și lipaza B din *Candida antarctica* (CAL-B)

Acidul	Alcoolul	Lipaza	Selectivitatea E	Bibliografie
 R = H sau R = n-C ₆ H ₁₃	heptanol	CRL	5 40	Holmberg și colab., 1992
	butanol	CRL	>300	Persichetti și colab., 1996
	butanol	CRL	88	Persichetti și colab., 1996
	alcool amilic	CRL	>100	Mustranta, 1992
 R = H, Me, Et	n-alcooli	CRL	3-50	Berglund și colab., 1994
	propanol	CAL-B	2-13	Mertoli și colab., 1996
	n-butanol	CRL	>50	Chattapadhyay și Mamdapur, 1993
 i-BuOOC	i-butanol	CAL-B	7-10	Ozegowski și colab., 1995

1.6.3.5. Transesterificarea alcoolilor acilați

Transesterificarea enantioselectivă catalizată de lipaze a esterilor alcoolilor racemici cu alcooli achirali în solvenți organici cu conținut redus de apă este o altă posibilitate de obținere a compușilor optic activi. Alcoolizele enantioselective inter- și intramoleculare catalizate de lipaze ale alcoolilor acilați și lactonelor în solvenți organici se pot utiliza în mod avantajos în locul hidrolizelor în cazurile în care se observă o stabilitate insuficientă, solubilitate crescută în apă sau selectivitate de grupă funcțională mică. Ca alcooli se folosesc propanol și butanol iar ca solvenți hexanul, diizopropileterul, *terț*-pentanolul și toluenul. În multe cazuri enantioselectivitatea și randamentul sunt mai mari pentru alcoolize decât pentru hidroliză în reacții catalizate de aceeași lipază, cu condiția utilizării unui mare exces de alcool.

În Tabelul 24 sunt prezentate valorile exceselor enantiomerice și randamentelor obținute la transesterificarea cu 1-alcooli alifatici a unor 1,2-aminoalcooli diacilați, în mediu de solvent organic, catalizată de lipaza din *Pseudomonas cepacia* (Kanerva și colab., 1992).



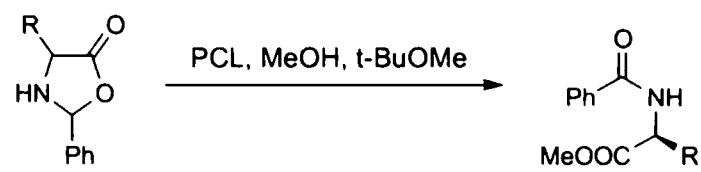
Schema 31

Tabelul 24. Rezoluția optică prin transesterificare cu lipază a 1,2-aminoalcoolilor diacilați

Solvent	Alcool	ee ester (%)	Randament ester (%)	ee alcool (%)	Randament alcool (%)
<i>t</i> -Pentanol	butanol	>95	33	>95	34
Toluen	butanol	>95	40	>95	39
Toluen	hexanol	>95	46	>95	42
Toluen	octanol	>95	41	>95	43
Dibutileter	butanol	>95	39	>95	45
Dibutileter	hexanol	>95	41	>95	36
THF	butanol	>79	45	>95	44
Acetonitril	butanol	>85	46	>95	43

1.6.3.6. Transesterificarea oxazolin-2-onelor

Alcooliza enantiomerică catalizată de lipaze poate fi aplicată și esterilor acizilor carboxilici, și oxazolin-2-onelor. Un exemplu în acest sens se poate observa în Schema 32. Excesele enantiomerice și randamentele obținute au valori mari (Tabelul 25).



Schema 32

Tabelul 25. Transesterificarea oxazolinonelor cu lipaza din *Pseudomonas cepacia* (PCL) (Crich și colab., 1993; Bevinakatti și colab., 1990, 1992)

R	ee (%)	Randament (%)
(CH ₃) ₂ CH	77	47
(CH ₃) ₂ CH CH ₂	78	82
CH ₃ SCH ₂ CH ₂	82	31
2-naftilmetil	75	90
p-CH ₃ C ₆ H ₄ CH ₂	66	86
C ₆ H ₅	75	46
C ₆ H ₅ CH ₂	69	93
C ₆ H ₅ CH ₂ CH ₂	93	61
C ₆ H ₅ (CH ₂) ₃	84	91

2. CONTRIBUȚII ORIGINALE

2.1. STUDIUL ACTIVITĂȚII BIOCATALIZATORILOR IMOBILIZAȚI ÎN REACȚII DE HIDROLIZĂ ȘI ESTERIFICARE

Datorită chemo-, regio- și stereoselectivității lipazelor, a condițiilor blânde de reacție, utilizarea acestora ca biocatalizatori în aplicații industriale este un domeniu de larg interes. Biocatalizatorii pot fi folosiți în chimia organică fie pentru sinteza unor compuși care sunt intermediari în fabricarea unor produse chimice, fie pentru obținerea unor produse finite ca atare. Cele mai multe aplicații ale biocatalizei sunt în industria farmaceutică și în industria alimentară pentru obținerea de exemplu a unor esteri naturali (Peter și colab., 2002). Mai nou, în scopul obținerii unor catalizatori cu calitate îmbunătățite față de enzimele libere, s-au studiat o varietate largă de metode de imobilizare a enzimelor. Performanțele acestor catalizatori se testează în reacții chimice ca esterificare, interesterificare, hidroliză.

S-au imobilizat prin adsorbție, entrapare și entrapare combinată cu adsorbție lipazele din *Candida cylindracea*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia* și lipaza pancreatică (Vezi capitolul 3.1.). Aceste lipaze imobilizate au fost testate ca biocatalizatori în reacții de hidroliză și esterificare, determinându-se activitățile hidrolitice respectiv esterificare ale acestora pentru evaluarea eficienței diferitelor metode de imobilizare.

2.1.1. Studiul imobilizării lipazelor și activității lipazelor imobilizate în reacții de hidroliză

2.1.1.1. Determinarea activității hidrolitice a enzimelor libere

Pentru determinarea activității hidrolitice s-a preparat o soluție enzimatică prin ampastarea enzimei libere cu apă distilată, la o concentrație corespunzătoare pentru ca eliberarea acizilor grași în urma hidrolizei enzimatică să aibă loc cu o viteză care poate fi urmărită prin titrare. A fost determinată activitatea hidrolitică a lipazelor din *Candida cylindracea* (două loturi diferite notate cu Cc^I și Cc^{II}), *Pseudomonas fluorescens* (AK), *Pseudomonas cepacia* (PS) și a lipazei din pancreas de porc (PPL, obținută în laborator) în reacția de hidroliză a uleiului de măsline emulsionat.

Tabelul 26. Activitatea hidrolitică a enzimelor libere

Lipaza	Activitatea hidrolitică (U/mg)
Cc ^I	0.39
Cc ^{II}	0.30
AK	11.90
PPL	11.05
PS	11.40

2.1.1.2. Studiul influenței pH-ului de imobilizare și suportului asupra activității hidrolitice a PPL imobilizată prin adsorbție (Peter și colab., 1996; Burian și colab., 1997)

Pentru acest studiu s-a imobilizat lipaza pancreatică pe suport de carbonat de calciu folosindu-se soluție tampon de diferite valori de pH și pe suport Celite la pH=7.0. Rezultatele obținute la testarea preparatelor sunt prezentate în Tabelul 27.

Tabelul 27. Reacții de hidroliză catalizate de PPL imobilizată prin adsorbție

Enzima	pH imob	Suport	Activitatea hidrolitică (U/mg)	Randament imobilizare (%)	Randament regăsire activitate (%)	Activitate specifică (U/mg _{prot.})
PPL liber	-	-	11.05	-	-	-
PPL ₁	7.0	Carbonat de calciu	2.02	19.19	39.56	70.68
PPL ₂	8.0		1.90	20.94	36.36	56.92
PPL ₃	9.0		0.98	8.17	18.46	95.22
PPL ₄	7.0	Celite	3.02	36.20	70.56	68.39

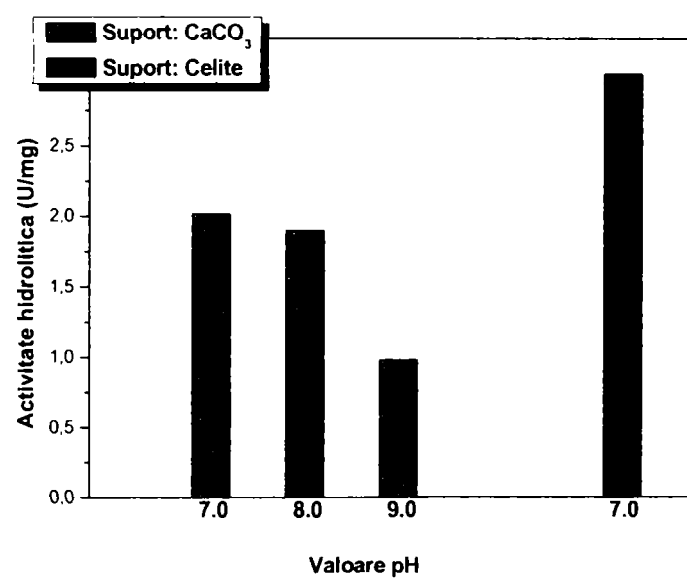


Figura 4. Dependența activității de hidroliză de pH și natura suportului utilizat

Adsorbția enzimei pe suport este o metodă de imobilizare care implică legarea fizică a enzimei de suport, prin legături slabe, de tip van der Waals, legături de hidrogen, interacțiuni hidrofobe. Adsorbția la suprafața suportului nu determină modificări conformaționale ale proteinei enzimice sau distrugerea centrului activ, lucru care se reflectă în activitatea preparatelor enzimice imobilizate. Dezavantajul acestei metode constă în stabilitatea redusă a preparatului enzimatic imobilizat explicată prin desorbția ușoară a enzimei de pe suport.

Dintre cele două suporturi utilizate, rezultate mai bune se obțin cu Celite, care are o suprafață specifică mare (Figura 4). În acest caz se obține un randament de fixare al enzimei de 36.2%. Dacă se utilizează carbonatul de calciu ca suport randamentul de fixare al enzimei este de maxim 20.94%. Așa cum se observă în

Figura 4. pH-ul influențează adsorbția enzimei pe suport, astfel la pH=7.0 și pH=8.0 imobilizarea conduce la aproximativ aceleași rezultate, în timp ce la pH=9.0 se obțin rezultate mai slabe.

2.1.1.3. Entraparea lipazelor în sol-gel și dependența activității hidrolitice a enzimei imobilizate de tipul aditivului utilizat (Peter și colab., 2005)

În cercetări efectuate până acum (Reetz și colab., 2003) s-a demonstrat că alcoolul izopropilic are un efect benefic în timpul procesului de gelifiere iar aditivi ca esterii de sorbitan etoxilați, ciclodextrine sau eteri tip coroană pot duce la o creștere a activității lipazice și a enantioselectivității. Mecanismul prin care acționează acești aditivi este foarte complex și nu în întregime lămurit. Se știe că unii pot interacționa cu enzima prin intermediul unor legături de hidrogen, iar alții pot preveni contractarea rapidă și colapsarea porilor în timpul procesului de uscare și pierderea activității enzimei (de exemplu polietilenglicolul cu diferite mase moleculare). Există un număr mare de asemenea substanțe care pot avea rol de aditiv, dintre care în studiile noastre au fost utilizate următoarele:

- alcoolul etilic, cu rolul de a asigura omogenitatea sistemului de reacție în timpul procesului de formare a sol-gelului, deoarece silanii nu sunt solubili în apă.
- alcoolul izopropilic, care are în principiu același rol și în plus este indicat în literatură ca având efect favorabil în cazul lipazei (Soares și colab., 2004).
- polietilenglicolul, care are rol în creșterea diametrului porilor ce se formează și evitarea distrugerii lor în timpul uscării, dar și pentru a favoriza reacțiile unor substraturi hidrofobe prin creșterea afinității enzimei față de acestea.

Rezultatele obținute în studiul utilizării diferiților aditivi în procesul de încapsulare în sol-gel a lipazei din *Candida cylindracea* (Cc) sunt prezentate în Tabelul 28 și Figura 5. Silanii precursori folosiți au fost tetraetoxisilan (TEOS) și metiltrietoxisilan (MTEOS) în diferite rapoarte molare, solul a fost preformat iar gelifierea a avut loc în cataliză bazică. Activitatea lipazei imobilizate s-a determinat în reacții de hidroliză.

Tabelul 28. Efectul aditivilor asupra activității lipazei din Cc imobilizată în sol-gel la diferite rapoarte molare de TEOS/MTEOS

Enz.	Aditiv	Met. de imob.	Raport molar TEOS/MTEOS	Rand. imob. (%)	C _{prot. filtrat} (mg/ml)	Act. hidrol. x10 ³ (U/mg)	Act. totală după imob. (U)
Cc ^{II} ₁	Alc.etic	10	3:1	72	Nedet.	16.65	5.54
Cc ^{II} ₃	Alc.izopropilic	10	3:1	53	Nedet.	12.88	4.08
Cc ^{II} ₄	Alc.izopropilic și PEG 8000	10	3:1	39	Nedet.	7.77	2.98
Cc ^{II} ₇	Alc.izopropilic și PEG 20000	10	3:1	60	Nedet.	8.20	4.35
Cc ^I ₂	Alc.etic	10	1:1	7	0.099	2.40	0.69
Cc ^I ₅	Alc.izopropilic	10	1:1	10	0.198	3.39	0.98
Cc ^I ₆	Alc.izopropilic și PEG 8000	10	1:1	9	0.178	2.47	0.83
Cc ^I ₉	Alc.izopropilic și PEG 20.000	11	1:1	5	0.467	3.41	1.66

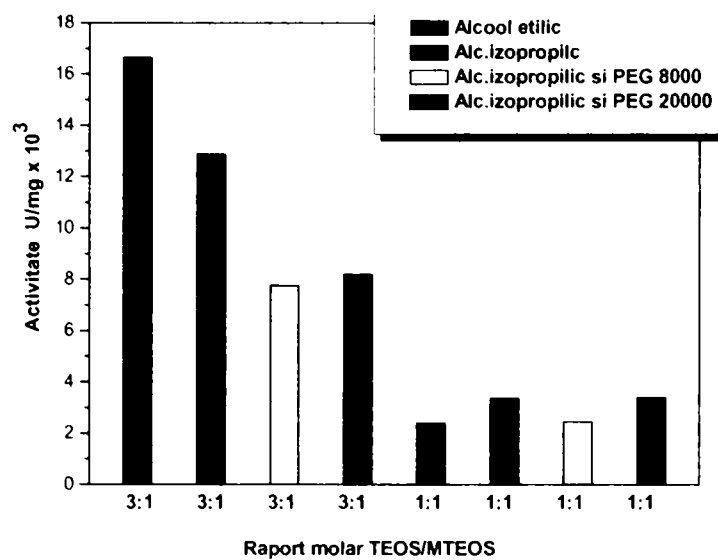


Figura 5. Dependența activității lipazei din Cc immobilizate de tipul aditivului

Ținând cont de faptul că toate aceste preparate immobilizate au fost obținute din soluții apoase de sol cu un anumit grad de hidroliză realizat înaintea gelifierii și immobilizării, este explicabil că la raport molar TEOS/MTEOS mai mare (3: 1) alcoolul etilic are efectul activator mai pronunțat, deoarece omogenitatea sistemului de reacție în care are loc gelifierea este mai bună. În cazul unui raport molar de 1: 1 al silanilor precursori, diferențele de activitate ale preparatelor obținute sunt mai mici, iar activitățile de asemenea sunt mai reduse, dar acest lucru se poate datora și faptului că au fost două loturi diferite de enzimă tip Candida. Se mai poate observa că creșterea masei moleculare a polietilenglicolului folosit ca aditiv are de asemenea un efect favorabil asupra activității enzimei immobilizate.

2.1.1.4. Studiul dependenței activității hidrolitice a enzimei immobilizate prin entrapare de raportul molar al silanilor precursori (Peter și colab., 2005)

Natura silanului precursor are o influență importantă asupra caracteristicilor matricei polimere care se obține și implicit asupra enzimei immobilizate. Așa cum s-a arătat, lipaza este o enzimă a cărei activitate este favorizată de existența unui micromediu hidrofob în jurul său, fapt care explică și activitatea mare a acestor enzime în mediu de solvenți organici nepolari. Incorporarea unor grupări hidrofobe în structura matricii polisiloxanice este de așteptat să aibă un efect favorabil, care să crească odată cu creșterea hidrofobității acestor grupări. Pe de altă parte însă, prezența unor grupări hidrofobe voluminoase va afecta formarea gelului și este de așteptat ca gelifierea în aceste condiții să aibă loc mai greu sau chiar să fie împiedicată.

Din datele de literatură (Reetz, 1997) rezultă că activitatea preparatelor de lipază immobilizată prin tehnica sol-gel poate fi îmbunătățită dacă matricea polisiloxanică se obține pe baza unor precursori silanici conținând și grupări alchil hidrofobe. Explicația acestui fapt este că activarea lipazelor are loc printr-un mecanism hidrofob, iar un caracter hidrofîl prea puternic al zonei în care se găsește enzima immobilizată duce la activități mai reduse.

Primul studiu s-a realizat utilizând metiltrietoxisilan (MTEOS) drept componentă cu grupare hidrofobă, în diferite rapoarte molare față de tetraetoxisilan (TEOS). S-a lucrat cu sol preformat, cu un raport ridicat apă/silan (44/1), în cataliză bazică (NH_3), iar ca aditiv s-a utilizat alcoolul izopropilic. S-au efectuat imobilizări pentru două lipaze, din *Candida cylindracea* (Cc) (două loturi diferite, notate cu I și II) și din *Pseudomonas fluorescens* (AK). Activitatea enzimelor s-a determinat în reacții de hidroliză. Contrar datelor din literatură, se obțin activități mai mari în cazul utilizării componentei cu grupare hidrofobă din matricea sol-gel în cantitate mai mică așa cum se poate observa în Tabelul 29 și în Figura 6. Aceste rezultate se referă însă la activitatea în reacția de hidroliză a uleiului de măsline, o trigliceridă cu masă moleculară destul de mare, iar valoarea activității este afectată de posibile limitări difuzionale cât și de necesitatea ca reacția să aibă loc la interfața ulei-apă, unde aducerea enzimei imobilizate este realizată mult mai greu decât cea a enzimei libere.

Tabelul 29. Reacții de hidroliză catalizate de lipaza AK și Cc imobilizate prin entrapare (sol preformat).

Enzima	Metoda de imobilizare	Raport molar TEOS/MTEOS	Activitatea hidrolitică (U/mg)	Activitatea totală după imobilizare (U)
Cc ^{II} ₃	10	3:1	$12.88 \cdot 10^{-3}$	4.08
AK ₄	14	3:1	$9.91 \cdot 10^{-3}$	3.08
Cc ^I ₅	10	1:1	$3.39 \cdot 10^{-3}$	0.97
AK ₅	14	1:1	$3.21 \cdot 10^{-3}$	0.95

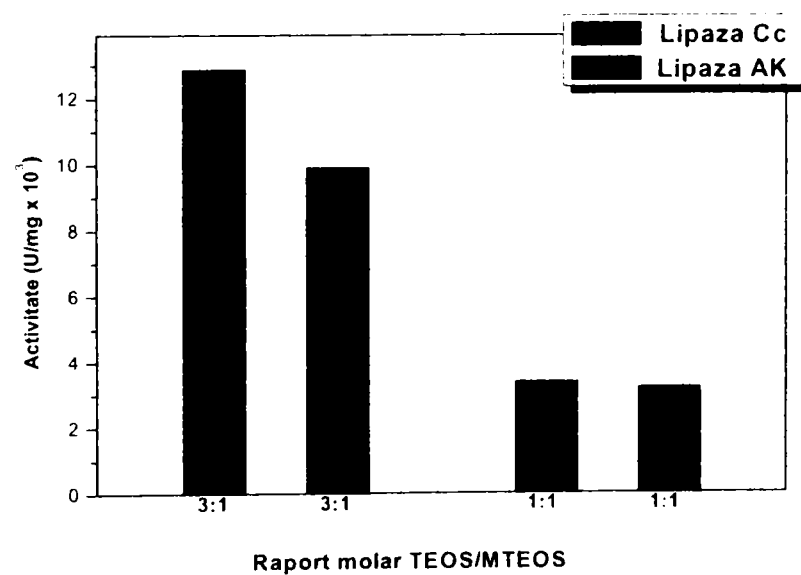


Figura 6. Dependența activității hidrolitice de raportul molar al silanilor precursori – studiul I

Al doilea studiu s-a realizat pe aceleași lipaze și cu aceiași silani precursori, dar cu sol obținut *in situ* deci reacțiile de hidroliză și polimerizare au avut loc concomitent cu încapsularea enzimei. S-a lucrat cu catalizator NaF, alcool izopropilic

și polietilenglicol cu masa moleculară 20.000. De asemenea, cantitatea de apă din sistemul de reacție a fost considerabil redusă, deci raportul molar silan/apă a fost mai mare (1/10). S-a determinat activitatea hidrolitică și activitatea totală a enzimelor imobilizate precum și conținutul în proteine al filtratelor obținute la prelucrarea enzimelor după imobilizare (C). Rezultatele obținute în acest studiu se pot observa în Tabelul 30. Pe baza datelor din tabel s-a reprezentat grafic (Figura 7) dependența activității hidrolitice de raportul molar al silanilor precursori.

Tabelul 30. Reacții de hidroliză catalizate de lipaza AK și Cc imobilizate prin entrapare (sol obținut *in situ*).

Enzima	Metoda de imob.	Raport molar TEOS/MTEOS	Activitate hidrolitică X 10 ³ (U/mg)	Activitatea totală după imobilizare (U)	C _{proteine filtrat} (mg/ml)
Cc ₁₃	12	1:1	4.12	1.64	1.177
Cc ₁₄	12	1:3	8.20	3.34	1.048
Cc ₁₅	12	1:5	3.34	0.76	0.572
AK ₁₇	17	1:1	16.31	3.41	0.367
AK ₁₈	17	1:3	28.15	3.75	0.388
AK ₁₆	17	1:5	39.30	4.82	0.411

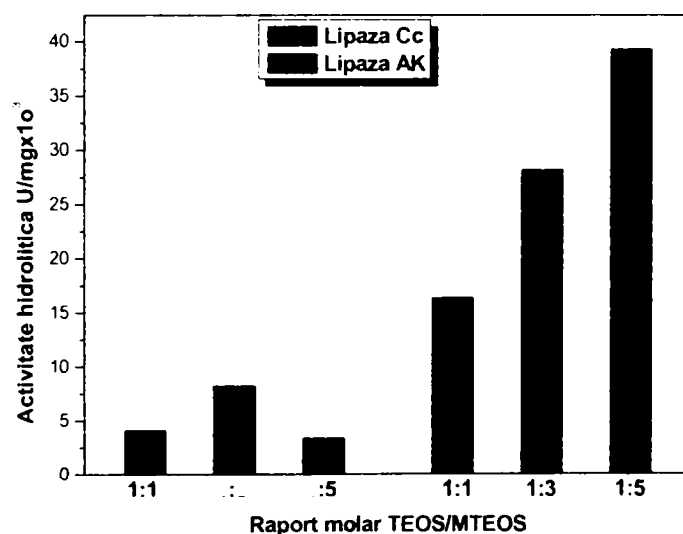


Figura 7. Dependența activității hidrolitice de raportul molar al silanilor precursori – studiul II

Se observă că de data aceasta activitatea de hidroliză a enzimelor imobilizate este favorizată de creșterea hidrofobității matricei polisiloxanice (creșterea raportului molar dintre silanul cu rest hidrofob și tetraetoxisilan), activitatea maximă fiind în cazul lipazei Cc la un raport TEOS/MTEOS de 1/3, iar în cazul lipazei AK la un raport de 1/5. În acest din urmă caz s-a obținut o enzimă imobilizată cu o activitate mult mai mare decât în celelalte cazuri în care s-a entrapat aceeași enzimă. S-a presupus că hidrofobitatea acestei enzime este mai pronunțată și deci creșterea

caracterului hidrofob al matricii polisiloxanice favorizează obținerea unei activități ridicate.

S-a studiat și variația activității hidrolitice funcție de natura și raportul molar al silanilor precursori pentru un set de lipaze din *Candida cylindracea* (Cc), immobilizate prin entrapare. S-au utilizat silani cu grupări alchil scurte, metiltrietoxisilan (MTEOS), etiltrietoxisilan (EtTEOS) și un silan cu grupare aril și anume feniltrietoxisilan (PhTEOS), în rapoarte molare diferite față de tetraetoxisilan (TEOS). Catalizatorul utilizat a fost NaF, aditivi - alcool izopropilic și PEG 20000.

Rezultatele obținute sunt prezentate Tabelul 31 și Figura 8.

Tabelul 31. Reacții de hidroliză catalizate de Cc immobilizată prin entrapare

Enz.	Metoda de imob.	Silan II	Raport molar TEOS/SilanII	Raport molar silan/apă	Rand. imob. (%)	C _{proteine filtrat} (mg/ml)	Activit. hidrol. x 10 ³ (U/mg)
Test	11	TEOS 6mmoli		1:20	5	0.995	3.88
Cc ₈	11	MTEOS	1:1	1:20	7	0.628	5.14
Cc ₇	11	EtTEOS	1:1	1:20	8	0.903	5.89
Cc ₁₀	11	PhTEOS	1:1	1:20	-	1.220	6.33
Cc ₁₄	12	MTEOS	1:3	1:10	11	1.049	8.20
Cc ₁₂	12	EtTEOS	1:3	1:10	1	0.743	3.67
Cc ₁₁	12	PhTEOS	1:3	1:10	2	0.955	4.99

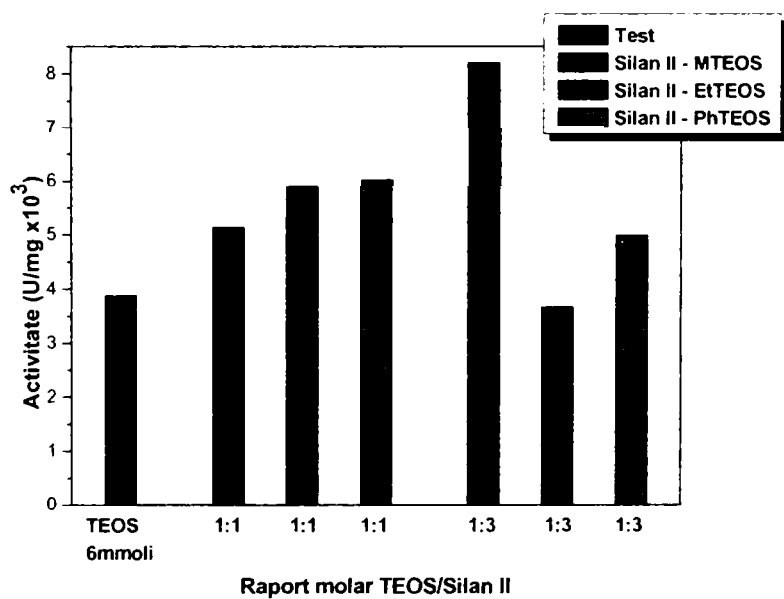


Figura 8. Dependența activității hidrolitice de natura și raportul molar al silanilor precursori

Utilizarea unui amestec echimolecular de silani precursori are un efect benefic asupra activității și se observă că nu apar diferențe importante în ce privește activitatea preparatelor immobilizate în funcție de natura silanului utilizat. La creșterea

proporției de grupări hidrofobe (raport molar 3:1). formarea gelului a fost mult îngreunată în cazul EtTEOS și PhTEOS comparativ cu MTEOS, în sensul că timpul de gelificare a fost mult mai mare și s-a obținut o cantitate mai mică de enzimă immobilizată. De asemenea, activitatea lipazei entrapate a scăzut odată cu creșterea numărului de moli de EtTEOS și PhTEOS. Se presupune că lipaza nu s-a immobilizat în totalitate și a fost pierdută la spălare. Doar în cazul creșterii raportului molar de MTEOS/TEOS de la 1:1 la 3:1 se obține o mărire a activității hidrolitice a enzimei așa cum se poate observa în Figura 8.

2.1.1.5. Dependența activității hidrolitice a enzimei immobilizate prin entrapare de raportul molar silan/apă și modul de obținere al solului

Raportul molar silan/apă și modul de obținere al solului prepolimer sunt doi parametri care pot avea un rol important în procesul de obținere a biopolimerilor încapsulați prin metoda sol-gel, existând în general o valoare optimă a acestui raport. În studiile efectuate nu s-a urmărit determinarea acestei valori optime, întrucât au fost modificați concomitent și alți parametri și este dificil de apreciat care dintre aceștia a exercitat efectul mai important. Studiul realizat asupra acestor doi parametri ia în discuție două lipaze immobilizate și anume lipaza din *Candida cylindracea* (Cc) și lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (AK). Immobilizările au fost realizate cu tetraetoxisilan și metiltrietoxisilan în raport molar 1:1 iar solul a fost preformat sau obținut *in situ*. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 32 iar în Figura 9 s-a reprezentat grafic dependența activității hidrolitice de raportul molar silani : apă.

Tabelul 32. Reacții de hidroliză catalizate de Cc și AK immobilizate prin entrapare

Enz.	Metoda de imob.	Mod de obținere al solului	Raport molar silan/apă	Rand. imob. (%)	C _{proteine filtrat} (mg/ml)	Activitate hidrolitică x10 ³ (U/mg)
Cc ₁₃	12	<i>In situ</i>	1:10	5	1.177	4.12
Cc ₈	11	Sol preformat	1:20	7	0.628	5.14
Cc ₅	10	Sol preformat	1:44	10	0.198	3.39
AK ₂₆	17	<i>In situ</i>	1:10	<1	0.667	16.31
AK ₆	15	Sol preformat	1:20	<1	0.640	12.57
AK ₅	14	Sol preformat	1:44	<1	0.113	3.21

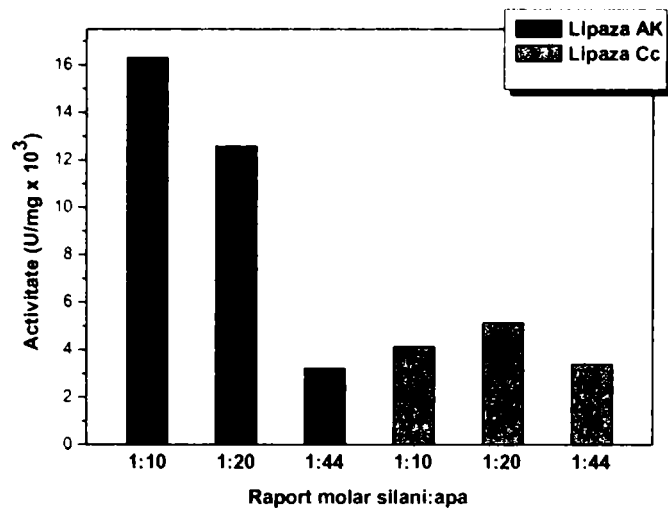


Figura 9. Variația activității hidrolitice de raportul molar silani:apă

Se poate observa că creșterea raportului molar apă/silan peste o anumită valoare determină scăderea activității enzimei imobilizate. Raportul molar optim se situează între 1:20 și 1:10 și nu poate fi estimat mai exact deoarece metoda de obținere a solului a fost diferită. În cazul lipazei AK, scăderea drastică a activității la creșterea raportului apă/silan se datorește probabil hidrofobicității mai pronunțate a acestei enzime, despre care s-a mai discutat.

2.1.1.6. Influența timpului de hidroliză al solului asupra activității hidrolitice a enzimei imobilizate prin entrapare (Peter și colab., 2005)

Pentru acest studiu s-au făcut imobilizări prin entrapare ale lipazei din *Pseudomonas fluorescens* (AK) și lipazei din *Pseudomonas cepacia* (PS). S-a lucrat cu catalizator bazic (NH₃) pentru inițierea reacției de policondensare, cu alcool etilic ca aditiv și pentru asigurarea omogenității amestecului. Timpul de hidroliză al solului se poate observa în Tabelul 33. Solul preformat a fost obținut doar cu tetraetoxisilan (TEOS, 6 mmoli). S-a determinat activitatea hidrolitică a enzimelor imobilizate, randamentul de imobilizare și randamentul de regăsire a activității enzimatică după imobilizare.

Tabelul 33. Reacții de hidroliză catalizate de AK și PS imobilizate prin entrapare

Enz.	Met. imob.	Cant. enzimă utilizată (mg/g silan)	Timp de hidroliză sol (h)	Activitate hidrolitică x 10 ³ (U/mg)	Rand. imobilizare (%)	Rand. regăsire activitate (%)
AK ₈	16	60	24	17.8	50.7	1.90
PS ₈	19	60	24	12.4	36.1	1.44
AK ₇	16	30	24	32.7	27.1	6.27
PS ₇	18	30	24	26.9	42.0	6.12
AK ₉	16	30	48	13.8	68.4	3.15
PS ₉	19	30	48	13.9	28.8	3.12
AK ₁₀	16	30	168	12.2	46.2	1.78
PS ₁₀	19	30	168	8.9	21.9	1.73

Creșterea timpului de hidroliză conduce la obținerea unei rețele mai ramificate și a unei configurații diferite a solului prepolimer în momentul adăugării soluției enzimice și a catalizatorului care inițiază reacția de policondensare. Așa cum se observă în Figura 10, activitatea enzimei imobilizate scade odată cu creșterea timpului de hidroliză al solului. Cea mai mare activitate s-a obținut cu sol prepolimer de 24 h iar cu sol de 48 h activitatea are o valoare înjumătățită pentru ambele lipaze studiate.

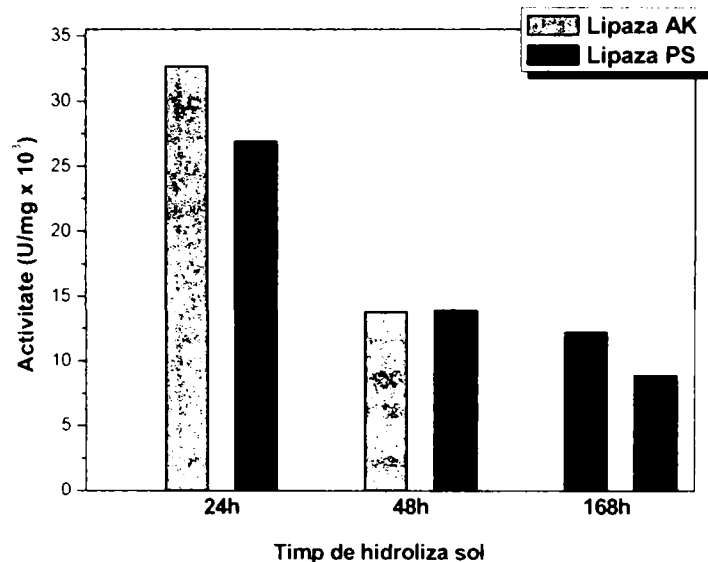


Figura 10. Dependența activității hidrolitice de timpul de hidroliză al solului

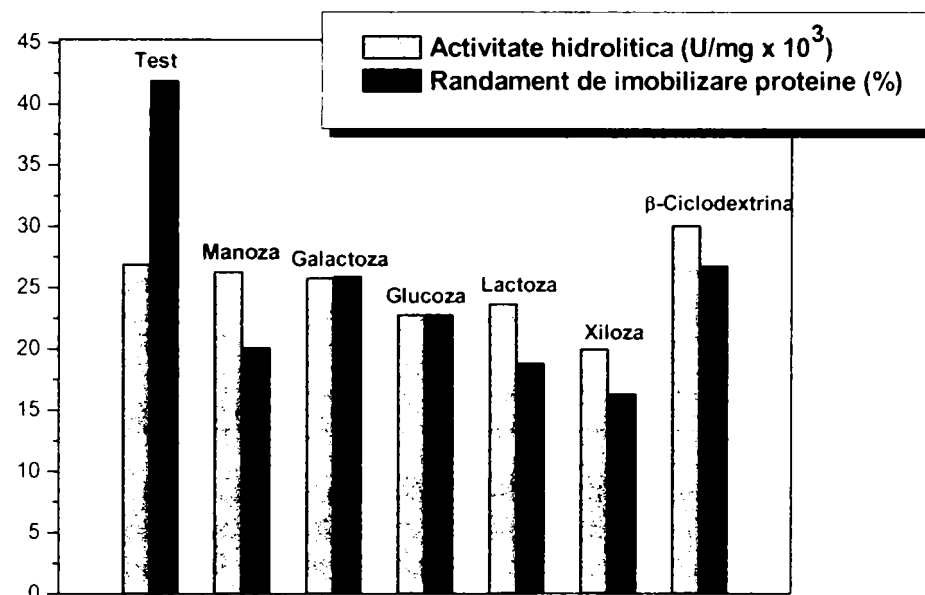
2.1.1.7. Influența hidraților de carbon asupra activității enzimelor imobilizate și randamentului de imobilizare (Peter și colab., 2005)

S-a studiat variația activității enzimelor imobilizate la adăugarea unei cantități de hidrați de carbon (18% față de cantitatea de enzimă luată pentru imobilizare) în soluția enzimatică preparată înaintea imobilizării. Aceștia ar putea acționa ca și compuși șablon, pentru a imprima rețelei formate o anumită conformație sterică, după care să fie eliminați la spălarea gelului. Compușii șablon mai pot influența anumite proprietăți ale enzimelor încapsulate, ca de exemplu enantioselectivitatea, prin modificarea microclimatului local în zona centrului activ. De asemenea, ei ar putea participa la anumite reacții de condensare cu grupările silanice libere și astfel să influențeze proprietățile gelului.

În acest studiu s-a utilizat lipază din *Pseudomonas cepacia* (PS), imobilizată prin metoda 18, solul preformat conține doar tetraetoxisilan, catalizatorul folosit a fost NH_3 , iar aditivul alcool etilic. S-au calculat activitatea hidrolitică a enzimelor imobilizate, randamentul de imobilizare precum și activitatea și conținutul de proteine al filtratelor obținute în urma prelucrării preparatelor imobilizate.

Tabelul 34. Reacții de hidroliză catalizate de PS imobilizată prin entrapare cu adaos de hidrați de carbon

Enzima	Compus șablon	Cant. enzimă obținută (mg)	Activitate hidrolitică x 10 ³ (U/mg)	Randament imobilizare (%)
PS- test	-	652.9	26.9	41.9
PS ₃	Manoză	671.5	25.6	20.1
PS ₁	Galactoză	661.5	25.8	25.9
PS ₂	Glucoză	686.3	22.8	22.8
PS ₄	Lactoză	676.7	23.7	18.8
PS ₅	Xiloză	675.3	20	16.3
PS ₆	β-Ciclodextrină	372.7	30	26.8

**Figura 11.** Influența hidraților de carbon din preparatele de PS imobilizate prin entrapare asupra activității hidrolitice și randamentului de imobilizare a proteinelor

Așa cum se poate observa în Figura 11 adaosul de monozaharide (glucoză, manoză, galactoză) sau dizaharide (lactoză) nu influențează semnificativ activitatea lipazei PS imobilizate. Adăția de β-ciclodextrină conduce la preparatul imobilizat cu activitatea cea mai mare în timp ce xiloza se pare că are un efect inhibitor asupra activității. Se poate concluziona că hidrații de carbon, în special hexozele pot fi utilizate în procesele de încapsulare în sol-gel fără ca acestea să afecteze activitatea enzimei imobilizate obținute.

2.1.2. Studiul imobilizării lipazelor și activității lipazelor imobilizate în reacții de esterificare

2.1.2.1. Studiul activității de esterificare a PPL imobilizată prin adsorbție (Kiss și colab., 1997)

Lipaza din pancreas de porc s-a imobilizat prin adsorbție pe un suport solid, anorganic, neporos - Celite, care este mult utilizată în imobilizările de enzime și care conform unor studii anterioare s-a dovedit a fi un adsorbent mai bun decât carbonatul de calciu. S-a lucrat după trei metode diferite de imobilizare descrise în Capitolul 3.1. iar preparatele obținute s-au testat în reacția de esterificare dintre acidul lauric și 1-octanol. Metoda 5 a constat în depunerea enzimei pe suport prin amestecarea soluției enzimatică cu Celite. La metoda 6 enzima imobilizată s-a precipitat cu acetonă răcită, iar la metoda 7 s-a lucrat ca la metoda 5 cu diferența ca la prepararea soluției enzimatică s-a adăugat zahăr. În toate cazurile pH-ul soluției tampon utilizate a fost 8.0. Valorile obținute pentru randamentele de ester, activitățile de esterificare și randamentele de regăsire a activității enzimatică se pot observa în Tabelul 35.

Tabelul 35. Reacții de esterificare a acidului lauric cu 1-octanol, catalizate de lipază pancreatică PPL imobilizată prin adsorbție.

Lipaza	Metoda imobilizare	Randament ester (%)	Activitate de esterificare ($\mu\text{moli/h} \cdot \text{mg}_{\text{enz}}$)	Randament regăsire act. (%)
PPL ₇	Metoda 7	11	0.046	114
PPL ₅	Metoda 5	77	0.162	349
PPL ₆	Metoda 6	98	0.237	465

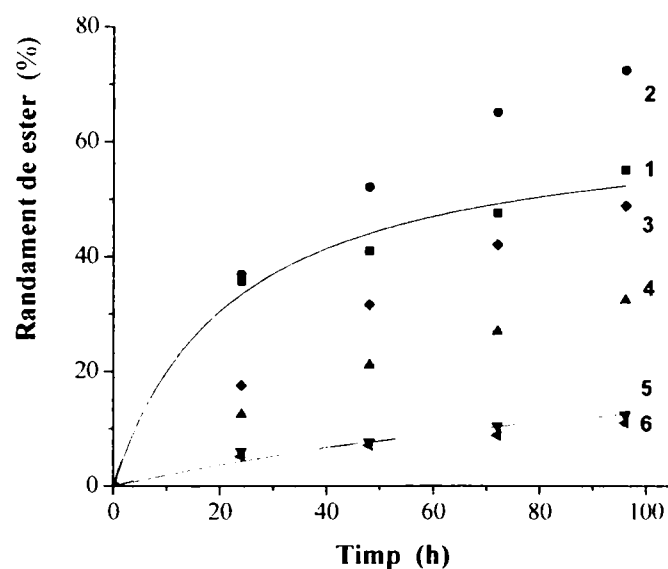
Adsorbția reprezintă o metodă simplă și mult folosită pentru imobilizarea enzimelor, însă are dezavantajul că enzima imobilizată se desoarbe ușor de pe suport și preparatul nu poate fi folosit de mai multe ori cu aceeași eficiență. Din cele trei metode studiate cele mai bune rezultate s-au obținut în cazul în care enzima imobilizată prin adsorbție s-a precipitat cu acetonă răcită la -15°C , în acest caz randamentul de ester după 24 h, activitatea de esterificare și randamentul de regăsire a activității enzimatică au avut cele mai mari valori.

2.1.2.2. Studiul influenței raportului molar și naturii silanilor precursori asupra randamentului de ester și activității în reacții catalizate de Cc imobilizată prin entrapare

În aceste cercetări s-a urmărit evoluția în timp a randamentului de ester în reacții de esterificare a acidului lauric cu 1-octanol, catalizate de preparate imobilizate prin entrapare a lipazei din *Candida cylindracea* (Cc). La imobilizare s-au folosit diferiți silani în diferite rapoarte molare așa cum se poate observa în Tabelul 36. S-au luat probe la intervale de 24 h care s-au analizat gaz-cromatografic iar pe baza analizelor obținute s-au calculat randamentele de ester. De asemenea s-au calculat activitatea de esterificare și randamentul de regăsire a activității enzimatică după 24 h.

Tabelul 36. Reacții de esterificare catalizate de lipaza din *Candida cylindracea* imobilizată prin entrapare

Nr.	Lipaza	Raport molar silani	Randament ester (%)				Activitate esterificare ($\mu\text{moli}/\text{h}_{\text{enz}}$)	Rand. regăsire (%)
			24h	48h	72h	96h		
1.	Cc liberă	-	36	41	48	55	297.5	-
2.	Cc ¹¹	PhTEOS/TEOS 3:1	37	52	65	73	56.1	33.4
3.	Cc ¹⁵	MTEOS/TEOS 5:1	18	32	42	49	36.6	68.3
4.	Cc ¹⁴	MTEOS/TEOS 3:1	13	21	27	33	26.1	37.6
5.	Cc ⁷	EtTEOS/TEOS 1:1	6	8	11	13	12.9	24.1
6.	Cc ¹³	MTEOS/TEOS 1:1	5	7	9	11	11.0	20.5
7.	Cc ¹²	EtTEOS/TEOS 3:1					< 1	< 1

**Figura 12.** Variația randamentului de ester în timp în reacții de esterificare cu Cc imobilizată

Preparatele enzimice obținute prin metoda de entrapare în sol-gel a lipazei din *Candida cylindracea* s-au dovedit a fi biocatalizatori activi în reacții de esterificare, indiferent de natura precursorului folosit pentru obținerea gelului (Tabelul 36). Cea mai mare activitate a avut-o enzima imobilizată Cc¹¹, cu activitatea de esterificare de $56.1 \mu\text{moli}/\text{h}_{\text{enz}}$, în care gruparea hidrofobă prezentă în structura gelului este gruparea fenil (raport molar PhTEOS:TEOS = 3:1). Acest preparat se obține însă greu, din cauza dificultăților care apar la procesul de gelificare, motiv pentru care se poate afirma că pentru reacții de esterificare se recomandă lipaza încapsulată care se obține pe bază de metiltietoxisilan (MTEOS) și tetraetoxisilan (TEOS) în raport molar de 5:1. Randamentele de regăsire ale activităților enzimice

după imobilizare sunt mult mai mari decât în cazul reacțiilor de hidroliză, ceea ce indică faptul că acest tip de imobilizare este recomandat în special pentru a obține biocatalizatori activi în procesele de transformare ale unor substraturi cu mase moleculare relativ mici.

2.1.2.3. Studiul reacțiilor de esterificare catalizate de PPL imobilizată prin entrapare (Kiss și colab., 2004)

În acest studiu s-a urmărit variația activității de esterificare a lipazei pancreatice (PPL) imobilizată prin entrapare în sol-gel (metoda 13 : PEG cu $M=20000$, NaF și alcool izopropilic) în funcție de precursorii silanici utilizați în diferite rapoarte molare și de timpul de maturare al gelului așa cum se poate observa în Tabelul 37. Activitățile de esterificare au fost calculate pentru reacția de esterificare a acidului lauric cu 1-octanol, pe baza randamentului de ester după 24 h de reacție, obținut în urma analizelor cromatografice, iar randamentul de regăsire a activității enzimatică s-a calculat prin raportarea activității totale a enzimei imobilizate la activitatea totală a enzimei libere la 24 h de reacție.

Tabelul 37. Reacții de esterificare catalizate de PPL imobilizată prin entrapare

Lipaza	Raport molar SilanII / TEOS	Timp de maturare (zile)	Rand. ester (%)	Activitate de esterificare $\times 10^3$ ($\mu\text{moli/h} \cdot \text{mg}_{\text{enz}}$)	Rand. regăsire activitate (%)
PPL liber	-	-	21	349	-
PPL ₈	PhTEOS: TEOS 1:1	1	11	23	25
PPL ₉	PhTEOS: TEOS 2:1	1	98	228	62
PPL ₁₀	PhTEOS: TEOS 3:1	1	98	231	88
PPL ₁₁	PhTEOS: TEOS 3:1	2	58	125	77
PPL ₁₃	MTEOS:TEOS 3:1	1	-	-	-
PPL ₂₈	MTEOS:TEOS 5:1	1	11	24	66

Se observă din Tabelul 37 că dintre preparatele enzimatică obținute prin încapsularea lipazei pancreatice prin metoda sol-gel nu toate au fost active ca biocatalizatori în reacția de esterificare iar această activitate a fost influențată de natura și raportul molar al silanilor precursori. Preparatul imobilizat obținut pe bază de metiltrietoxisilan și tetraetoxisilan raport molar 3:1 a avut o activitate foarte mică, întrucât s-a format doar o cantitate foarte mică de ester după un timp de reacție foarte lung.

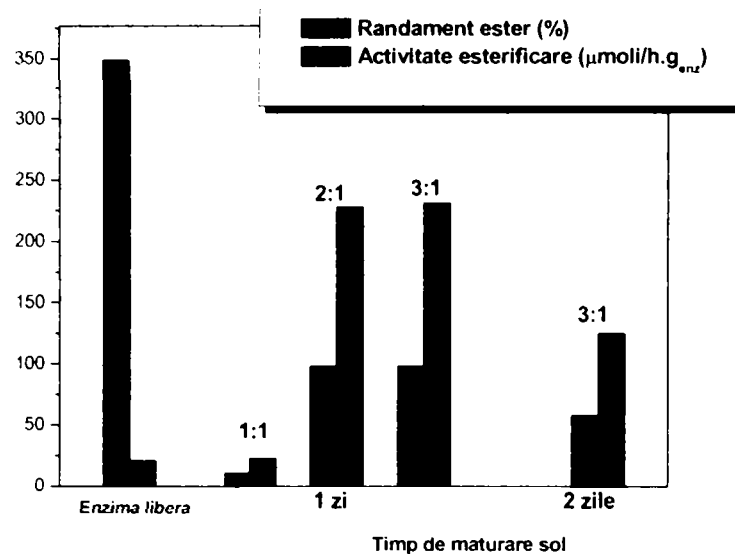


Figura 13. Dependența activității și randamentului de ester de timpul de maturare al solului format din precursori PhTEOS și TEOS

În Figura 13 se poate observa că preparatele în care gruparea hidrofobă prezentă în structura gelului a fost gruparea fenil au avut activitate de esterificare cea mai mare în cazul în care raportul molar PhTEOS:TEOS a fost mai mare de 1. Cele mai bune rezultate s-au obținut prin folosirea unui raport molar PhTEOS:TEOS de 3:1, deci la un conținut ridicat de grupări fenil în matricea de silice. Aceste preparate se obțin însă greu, din cauza dificultăților care apar la procesul de gelificare și drept urmare cantitatea de enzima obținută în urma imobilizării a fost mai mică decât în cazul folosirii altor precursori.

2.1.2.4. Studiul activității de esterificare a PPL imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție (Zarcuța și colab., 2005)

În scopul obținerii unor preparate enzimice imobilizate cu proprietăți îmbunătățite și activități ridicate s-a încercat combinarea metodei de entrapare cu adsorbția. Astfel rețeaua de sol-gel se va depune uniform pe suprafața adsorbentului și stabilitatea preparatului obținut va fi mult mai bună decât a celui obținut prin simplă adsorbție. Variantele de imobilizare încercate au diferit prin natura și raportul molar al silanilor precursori, natura catalizatorului, cât și prin utilizarea sau nu a unui adaos de alcool etilic. Preparatele de PPL imobilizate prin această metodă au fost testate în reacții de esterificare a acidului lauric cu 1-octanol, iar pe baza analizelor cromatografice s-a calculat randamentul de ester, activitatea de esterificare și randamentele de regăsire a activității enzimice după 24 h.

În Tabelul 38 se poate remarca faptul că majoritatea preparatelor imobilizate au avut activități mari, ceea ce înseamnă că randamentul de regăsire a activității enzimice totale a fost foarte mare, în condițiile în care cantitatea de preparat imobilizat a fost de cel puțin 7 ori mai mare decât cantitatea de enzimă supusă imobilizării, datorită Celitei adăugate.

Tabelul 38. Reacții de esterificare a acidului lauric cu 1-octanol, catalizate de lipază pancreatică immobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție (metoda 20)

Enz.	Raport molar SilanII /TEOS	Sol	Catalizator	Rand. ester (%)	Activitate de esterificare ($\mu\text{moli/h} \cdot g_{enz}$)	Rand. regăsire activitate (%)
PPL liber	-	-	-	21	349	-
PPL ₁₄	MTEOS: TEOS 3:1	1	NH ₃	-	-	-
PPL ₁₅	MTEOS: TEOS 3:1	1	NaF	25	51	151
PPL ₁₆	PhTEOS: TEOS 1:1	1	NH ₃	58	120	357
PPL ₁₇	PhTEOS: TEOS 1:1	1	NaF	11	23	75
PPL ₁₈	MTEOS: TEOS 3:1	2	-	38	31	74
PPL ₁₉	PhTEOS: TEOS 1:1	2	-	99	117	265
PPL ₂₀	MTEOS: TEOS 1:1	2	NH ₃	82	170	418
PPL ₂₁	MTEOS: TEOS 2:1	2	NH ₃	77	161	401
PPL ₂₂	MTEOS: TEOS 3:1	2	NH ₃	58	122	328
PPL ₂₃	MTEOS: TEOS 4:1	2	NH ₃	75	156	368
PPL ₂₄	MTEOS: TEOS 5:1	2	NH ₃	48	99	245
PPL ₂₅	MTEOS: TEOS 3:1	2	NaF	12	24	66
PPL ₂₆	PhTEOS: TEOS 1:1	2	NH ₃	71	148	318
PPL ₂₇	PhTEOS: TEOS 2:1	2	NH ₃	67	141	308

Sol 1 : silani, apă, alcool etilic, acid clorhidric

Sol 2 : silani, apă, acid clorhidric

2.1.2.5. Studiul activității de esterificare în funcție de metoda de immobilizare a PPL

Valorile cele mai ridicate ale activităților preparatelor immobilizate prin entrapare combinată cu adsorbție, au fost reprezentate în Figura 14, în comparație cu cele ale enzimei libere și preparatelor obținute numai prin adsorbție. Se poate remarca faptul că activitatea cea mai mare a avut-o preparatul obținut prin adsorbție urmată de precipitarea cu acetonă a enzimei, însă stabilitatea mai mare a preparatelor obținute folosind metoda de entrapare combinată cu adsorbție face această metodă mai avantajoasă chiar dacă activitatea este ceva mai mică. Se mai poate observa că nu

există deosebiri semnificative între activitățile de esterificare obținute folosind ca precursor MTEOS sau PhTEOS.

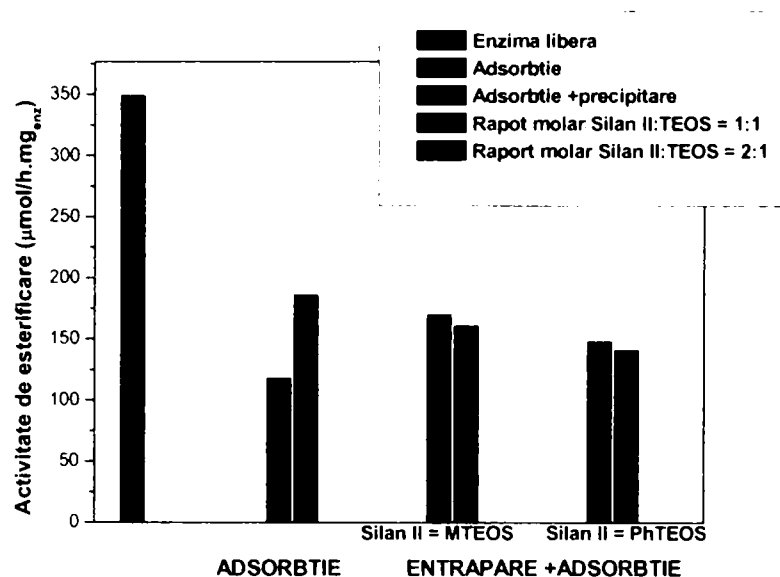


Figura 14. Variația activității de esterificare în funcție de metoda de imobilizare a PPL

2.1.2.6. Studiul activității de esterificare în funcție de rețeta de imobilizare a PPL

Studiul metodei de imobilizare combinate, entrapare și adsorbție, a presupus încercarea mai multor rețete, ținând cont de faptul că formarea rețelei de sol-gel este cea care are influența hotărâtoare asupra activității preparatului imobilizat. Astfel, pentru faza de policondensare care determină gelifierea s-a lucrat în 3 variante:

- fără catalizator, pH-ul bazic necesar acestei faze fiind asigurat de soluția tampon TRIS introdusă odată cu enzima
- cu catalizator NH_3
- cu catalizator tip acid Lewis (NaF)

Pentru a mări omogenizarea soluției în faza de formare a gelului și entrapare a enzimei s-a adăugat în alcool etilic unele rețete.

Din rezultatele prezentate în Figura 15 se poate observa că în cazul utilizării metiltrietoxisilanului cele mai bune randamente de regăsire a activității enzimice au fost obținute cu catalizator NH_3 , dar fără etanol. Chiar fără a se utiliza un catalizator propriu-zis, activitatea enzimică regăsită a fost mai mare decât cea introdusă la imobilizare, în timp ce adăugarea de etanol în cazul folosirii NH_3 drept catalizator a condus la pierderea activității. Folosind drept catalizator NaF activitățile au fost mai mici decât în cazul amoniacului, însă de data aceasta introducerea ca aditiv a etanolului a avut efect pozitiv, randamentul de regăsire înregistrând o creștere ușoară.

Dacă s-a utilizat ca precursor feniltrietoxisilanul, prezența etanolului în sistem nu a influențat randamentul de regăsire a activității enzimice.

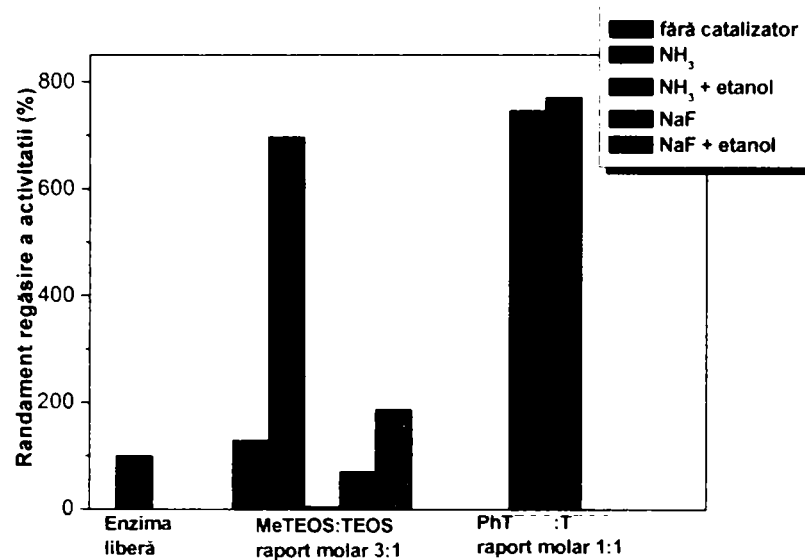


Figura 15. Dependența randamentului de regăsire a activității PPL immobilizate prin entrapare combinată cu adsorbție, de rețeta de obținere a sol-gelului.

2.1.2.7. Studiul influenței raportului molar MTEOS:TEOS asupra randamentului de regăsire a activității enzimatică

Pentru acest studiu s-au utilizat preparate enzimatică immobilizate prin entrapare combinată cu adsorbție ale lipazei pancreatice. S-a urmărit influența raportului molar MTEOS/TEOS asupra activității de esterificare și asupra randamentului de regăsire a activității lipazei și s-au comparat cu valorile obținute în cazul enzimei libere și în cazul enzimei immobilizate doar prin adsorbție (Tabelul 39).

Tabelul 39. Reacții de esterificare catalizate de PPL immobilizată prin metoda combinată

Lipaza	Raport molar SilanII/TEOS	Metoda immobilizare	Activitate de esterificare ($\mu\text{moli/h} \cdot \text{g}_{enz}$)	Rand. regăsire activitate (%)
PPL _{liber}	-	-	349	-
PPL ₆	-	Adsorbție cu precipitare Met.6	237	465
PPL ₂₀	MTEOS: TEOS 1:1	Entrapare combinată cu adsorbție Met.20	170	418
PPL ₂₁	MTEOS: TEOS 2:1		161	401
PPL ₂₃	MTEOS: TEOS 4:1		156	368
PPL ₂₄	MTEOS: TEOS 5:1		99	245

Așa cum se observă din Figura 16 valoarea randamentului de regăsire a activității enzimatică cea mai ridicată în cazul PPL immobilizată prin metoda combinată s-a obținut la un raport molar MTEOS/TEOS de 1:1, dar activitatea rămâne ridicată și în cazul creșterii acestui raport. Se poate face observația că în cazul esterificării nu se confirmă ideea generală că creșterea proporției de grupări hidrofobe în matricea de silice determină creșterea activității enzimei.

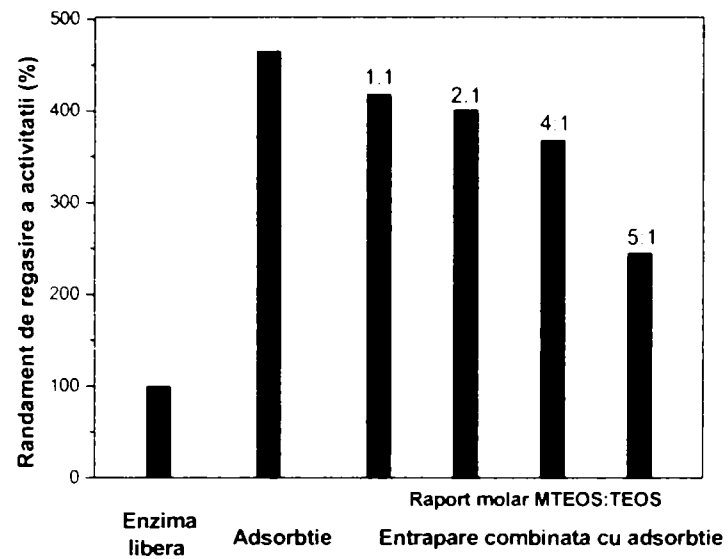
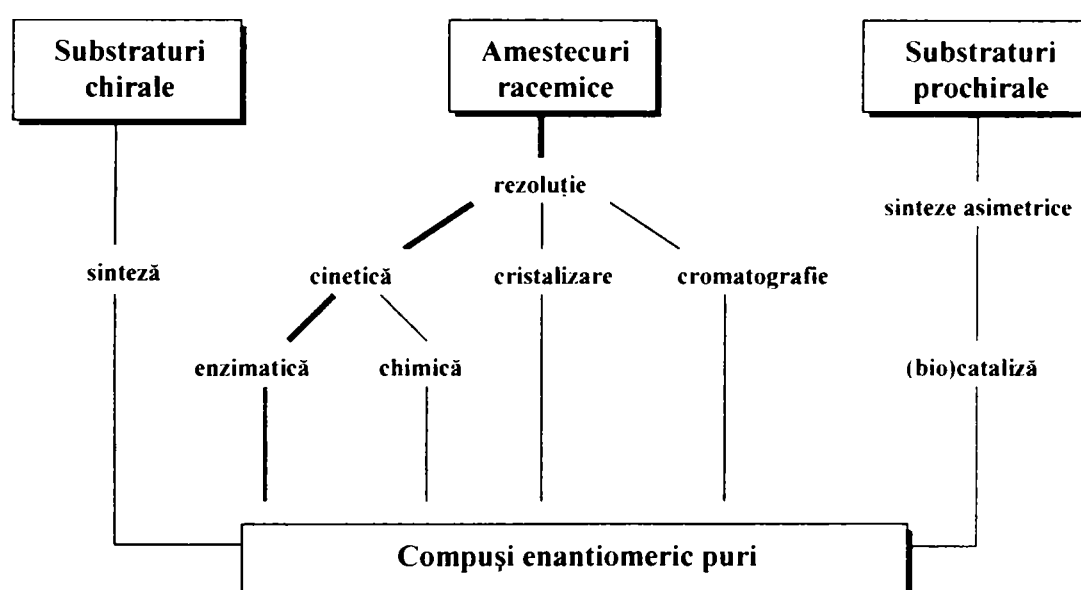


Figura 16. Variația randamentului de regăsire a activității enzimatică în reacții catalizate de PPL immobilizată diferite metode

2.2. STUDIUL UNOR REACȚII ENANTIOSELECTIVE CATALIZATE DE LIPAZE PRIN REZOLUȚIE CINETICĂ

Cererea în continuă creștere de compuși optic activi puri, în industria farmaceutică, agrochimică și alimentară a fost unul din motivele care au determinat studierea intensă a reacțiilor catalizate de lipaze, cunoscută fiind înalta enantioselectivitate a acestora. Toate evenimentele biochimice majore care au loc într-un organism sunt guvernate de enzime. Datorită faptului că majoritatea dintre ele sunt înalt selective cu privire la chiralitatea substratului, este evident că enantiomerii unui anumit compus bioactiv cum ar fi produșii farmaceutici sau agrochimici, produc diferite efecte fiziologice și biologice. În consecință aceștia trebuie priviți ca două specii distincte. De exemplu (*S*)-fenilalanina este amară în timp ce izomerul (*R*) este dulce; (*R*)-talidomida este un sedativ bun iar izomerul (*S*) este teratogen; (*S*)-verapamilul este utilizat în controlul aritmiei cardiace iar (*R*)-verapamilul este un agent antitumoral (Ghanem și Aboul-Enein, 2005).

Metodele utilizate pentru obținerea compușilor optic activi pot fi împărțite în trei categorii în funcție de materia primă utilizată. Două dintre metode utilizează enzime în vederea obținerii enantiomerilor și anume sintezele stereoselective și rezoluția amestecurilor racemice.



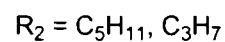
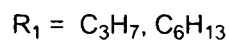
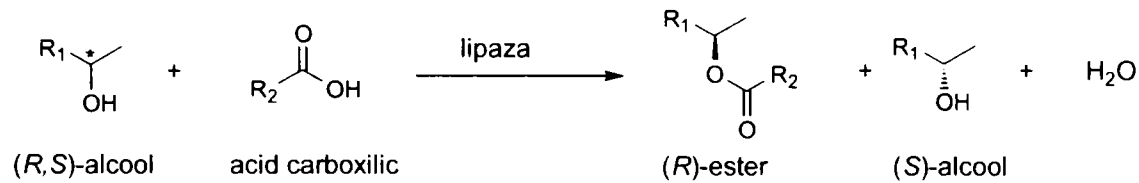
Rezoluția amestecurilor racemice prin rezoluție cinetică catalizată de lipaze este una din cele mai atractive metode utilizate în obținerea compușilor enantiomeric puri. Din toate metodele folosite în rezoluția cinetică, transesterificarea în solvenți organici catalizate de lipaze este cea dominantă. Astfel în prezența unui donor acil corespunzător, a unei enzime și a unui solvent potrivit, la o temperatură optimă unul din enantiomerii amestecului racemic este selectiv transformat în esterul corespunzător, în cazul ideal lăsând enantiomerul nereacționat în forma enantiomeric pură. Cea mai bună metodă pentru a obține o reacție ireversibilă este atunci când se utilizează un ester enolic, reacția inversă fiind în acest fel împiedicată prin tautomerizarea alcoolului rezultat, la acetaldehidă sau acetonă depinzând de acil donorul utilizat : ester vinilic sau izopropenil ester. Alcoolii secundari sunt de departe

cei mai utilizați ca substrat în rezoluțiile catalizate de lipaze. Aceasta datorită importanței lor în sintezele organice dar și datorită faptului că în mod normal lipazele manifestă față de aceștia cea mai mare enantioselectivitate comparativ cu alcoolii primari și terțiari (Ghanem și Aboul-Enein, 2005).

Esterificarea alcoolilor secundari

Una din metodele de obținere a compușilor optic activi este esterificarea enantioselectivă a alcoolilor secundari cu acizi carboxilici catalizată de lipaze. S-a studiat reacția de esterificare a unor alcoolii secundari alifatici (2-pentanol și 2-octanol) cu acizi carboxilici saturați (acid n-hexanoic, acid n-butiric).

Reacția generală de esterificare catalizată de o lipază (*R*)-selectivă este:



Schema 33

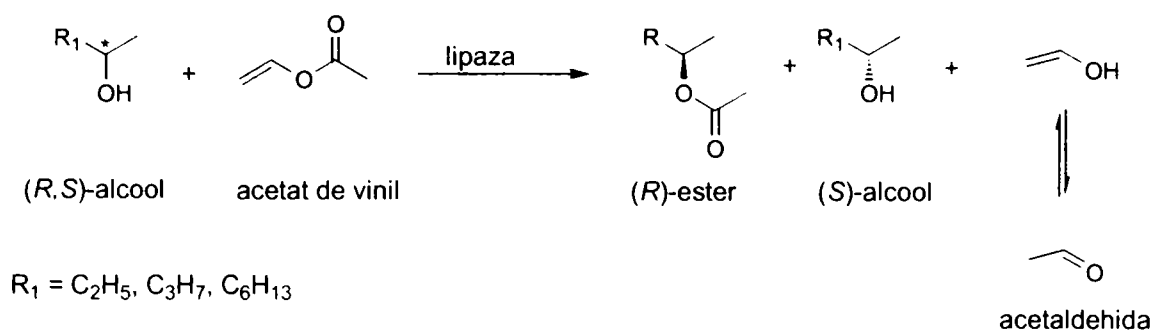
Preparatele enzimatică utilizate au fost din lipaza de pancreas de porc (PPL, obținută în laborator) imobilizată prin adsorbție pe CaCO_3 la două valori de pH: 8.0 și 9.0 (PPL₂ și PPL₃), lipaza din *Candida cylindracea* imobilizată prin adsorbție pe Celite și preparatul comercial de lipază din *Mucor miehei*- LipozymeTM. Reacțiile s-au desfășurat în solvent organic – n-hexan. S-au realizat și experimente cu concentrații mici de apă în mediul de reacție (0.03% și 0.05%) pentru observarea influenței apei asupra reacției.

Acilarea alcoolilor secundari

Dintre variantele de sinteză a unor compuși optic activi, transesterificarea/acilarea enantioselectivă a unor alcoolii secundari, în solvent organic, catalizată de lipaze ocupă locul cel mai important. Scopul acestui studiu a fost utilizarea unor lipaze imobilizate prin diferite metode în reacții de acilare enantioselectivă a unor alcoolii secundari.

Cei trei alcoolii secundari utilizați în studii au fost 2-butanolul, 2-pentanolul și 2-octanolul iar reactivul de acilare ales pentru a obține o reacție ireversibilă a fost acetatul de vinil. Așa cum a rezultat din studiul documentar desfășurarea acestor reacții este recomandată a avea loc în mediu de solvent organic cu un conținut cât mai mic de apă pentru a nu favoriza reacțiile de hidroliză, dar în același timp suficient pentru a menține conformația catalitic activă a lipazei. Solventul ales a fost n-hexanul.

Reacția generală de transesterificare catalizată de o lipază (*R*)-selectivă este:



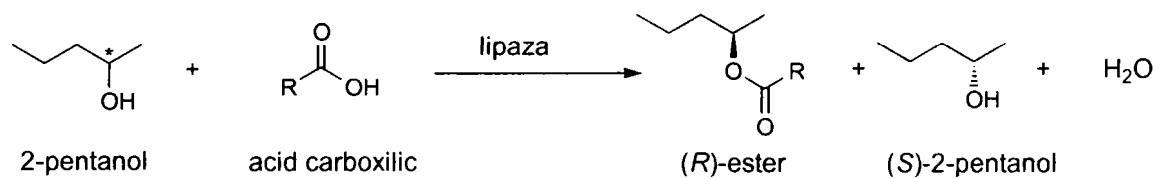
Schema 34

Preparatele enzimatic utilizate au fost obținute prin imobilizarea prin diverse metode a lipazei din *Pseudomonas fluorescens* (AK) și lipazei BUTE-3b. Metodele de imobilizare au fost: entrapare în sol-gel, adsorbție și entrapare combinată cu adsorbție. De asemenea a fost realizată și câte o reacție cu enzima liberă pentru fiecare enzimă și respectiv pentru fiecare substrat, necesară pentru calcularea randamentului de regăsire a activității lipazelor.

2.2.1. Reacții de esterificare enantioselectivă

2.2.1.1. Studiul dependenței excesului enantiomeric de tipul enzimei utilizate în reacțiile de esterificare a 2-pentanolului (Kiss și colab., 1998)

În acest studiu, enantioselectivitatea unor lipaze imobilizate prin adsorbție pe suport de carbonat de calciu, respectiv Celite a fost comparată cu cea a enzimei comerciale Lipozyme (obținută din *Mucor miehei*), care are un preț ridicat ce împiedică utilizarea sa la nivel industrial, exceptând aplicațiile unde valoarea produsului este foarte ridicată. Ca reacție model a fost aleasă esterificarea enantioselectivă a 2-pentanolului care pentru o lipază (*R*)-selectivă este:



R = C₅H₁₁, C₃H₇

Schema 35

S-a lucrat în prima fază cu acid hexanoic (raport molar acid : alcool 1:2) și cu patru enzime imobilizate. În urma rezultatelor obținute s-a mai făcut un set de reacții cu acid hexanoic, și acid butiric în diferite rapoarte molare, cu conținut diferit de apă dar doar cu Lipozyme. Conversia alcoolului a fost calculată pe baza analizelor gaz-cromatografice și ea a fost considerată egală cu randamentul reacției de esterificare întrucât nu este posibilă obținerea vreunui produs secundar în aceste condiții. Rezultatele obținute se pot observa în Tabelul 40 și Tabelul 41.

Esterificare enantioselectivă a 2-pentanolului cu acid hexanoic (raport molar alcool : acid 2:1) în hexan la 37°C a fost catalizată de patru lipaze diferite imobilizate. După separarea produșilor s-a determinat excesul enantiomeric de (*R*)-ester prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară.

Tabelul 40. Reacții de esterificare enantioselectivă a 2-pentanolului

Tipul lipazei imobilizate	Timp de reacție, zile	Conversie alcool (%)	ee (%)
<i>Candida cylindracea</i> Celite	7	36	-
PPL/CaCO ₃ pH ⁸	3	60	21
PPL/CaCO ₃ pH ⁹	3	42	18
Lipozyme	6	43	>99

Din datele Tabelului 40 se poate observa că în cazul lipazei pancreatice imobilizate pe CaCO₃ pH-ul la care se face imobilizarea reprezintă un parametru important ce influențează activitatea enzimei imobilizate. Lipaza imobilizată la pH 8 s-a dovedit a fi mai eficientă decât cea imobilizată la pH 9. Lipaza din *Candida cylindracea* nu s-a dovedit a fi un catalizator enantioselectiv în condițiile date, în timp ce lipaza comercială Lipozyme a demonstrat o stereoselectivitate remarcabilă, doar enantiomerul (*R*) fiind detectat prin analiza ¹H-RMN a produsului.

2.2.1.2. Studiul influenței unor parametri de reacție asupra conversiei în reacțiile de esterificare a 2-pentanolului și 2-octanolului (Kiss și colab., 1998)

În acest studiu s-a lucrat cu Lipozyme, care s-a demonstrat anterior ca duce la formarea (*R*)-esterului cu un exces enantiomeric >99%. Reacțiile studiate au fost esterificările 2-pentanolului și 2-octanolului cu acid hexanoic și acid butiric, în funcție de raportul molar alcool : acid și conținutul inițial de apă din sistemul de reacție.

Tabelul 41. Reacții de esterificare enantioselectivă catalizate de Lipozyme

Alcool	Acid	Raport molar alcool:acid	% apă în sistem	Timp de reacție (zile)	Randament esterificare (%)
2-pentanol	hexanoic	1:1	-	8	41
2-pentanol	hexanoic	1:1	0.03	6	46
2-pentanol	hexanoic	1:1	0.05	7	42
2-pentanol	butiric	1:1	-	9	48
2-pentanol	butiric	1:1	0.03	9	40
2-pentanol	butiric	1:1	0.05	6	33
2-pentanol	hexanoic	2:1	-	6	85
2-pentanol	hexanoic	2:1	0.03	7	84
2-pentanol	hexanoic	2:1	0.05	10	84
2-pentanol	butiric	2:1	-	7	88
2-pentanol	butiric	2:1	0.03	7	80
2-pentanol	butiric	2:1	0.05	7	84
2-octanol	hexanoic	2:1	-	7	46
2-octanol	butiric	2:1	-	7	72

Pe baza analizelor gaz-cromatografice s-a putut calcula conversia alcoolului, din care s-a calculat randamentul de esterificare, considerat față de acidul carboxilic, reactantul limitativ.

Se observă că la rapoarte echimolare molare alcool : acid, s-au obținut randamente de esterificare mai mici de 50 %, ceea ce confirmă enantioselectivitatea pronunțată a enzimei, reflectată de vitezele de esterificare foarte mici ale izomerului (S). Pentru a favoriza deplasarea echilibrului și conversia cât mai avansată a acidului, care ar impurifica produsul de reacție s-a lucrat cu un exces de alcool (raport molar 2:1). În acest caz randamentele obținute au depășit 85%, ceea ce demonstrează o esterificare avansată a izomerului (R).

În sintezele în care s-a introdus o concentrație inițială mică de apă în mediul de reacție valoarea conversiei nu s-a modificat semnificativ, deci se poate considera că nici apa formată în reacție nu influențează defavorabil desfășurarea procesului. De asemenea, nu s-au înregistrat diferențe semnificative între conversiile realizate utilizând acid butiric în loc de acid hexanoic, în timp ce creșterea lungimii lanțului hidrocarbonat al alcoolului a determinat scăderea conversiei în cazul 2-octanolului comparativ cu 2-pentanolul.

2.2.1.3. Studiul influenței temperaturii și timpului de reacție asupra conversiei acidului hexanoic în reacțiile de esterificare cu 2-pentanol (Kiss și colab., 1998)

Studiul influenței temperaturii s-a bazat pe rolul foarte important al acesteia în reacțiile enzimatiche, pe de o parte pentru că și viteza acestor reacții crește în mod normal odată cu creșterea temperaturii, iar pe de altă parte pentru că o temperatură prea ridicată poate duce la inactivarea enzimei prin denaturarea termică a proteinei enzimatiche. În aceste condiții, este important să se stabilească temperatura optimă la care aceste procese au loc cu viteză suficient de mare, fără a fi periclitat însă catalizatorul enzimatic. În cazul proceselor relativ lente, cum este cel studiat de noi, este și mai important să se lucreze în condiții în care viteza de reacție este cât mai mare și reacția poate fi finalizată în timp cât mai scurt.

Studiul a fost realizat pentru reacția de esterificare a acidului hexanoic cu 2-pentanol (raport molar 1:2), catalizată de Lipozyme în mediu de n-hexan, la temperaturi cuprinse între 30°C și 50°C. Reacția a fost urmărită timp de 6 zile, prelevându-se probe la intervale de 2 zile.

Așa cum se poate observa din rezultatele prezentate, în general se observă o creștere a conversiei cu temperatura. Această creștere este însemnată în intervalul 30-40°C și mai puțin concludentă în intervalul 40-50°C. În aceste condiții se poate afirma că reacția a avut loc cu viteză suficientă la temperatura de 40°C, la care nu există nici un pericol al degradării termice a enzimei și în consecință ea poate fi considerată temperatura optimă pentru procesul studiat.

Tabelul 42. Influența temperaturii asupra reacției de esterificare catalizată de Lipozyme

Temperatura (°C)	Conversia acidului (%)		
	2 zile	4 zile	6 zile
30	9	30	44
40	26	72	85
45	36	76	87
50	40	80	90

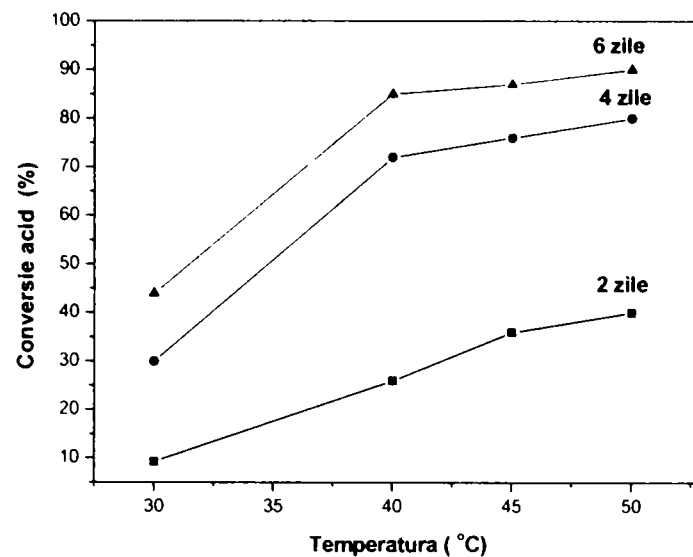
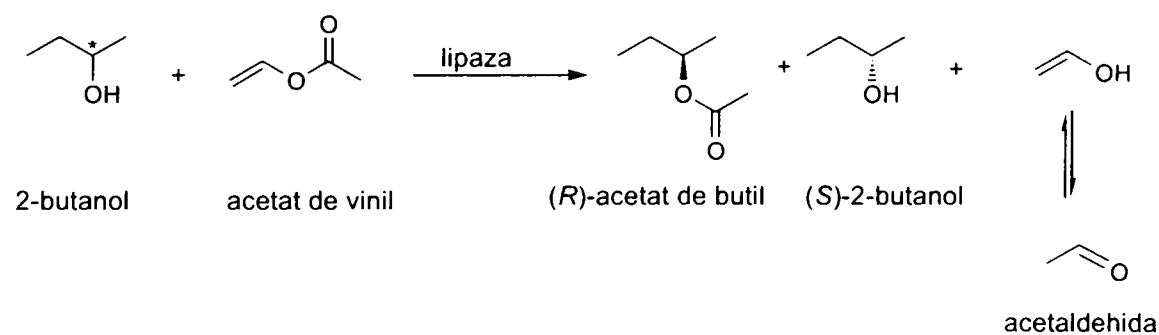


Figura 17. Graficul dependenței conversiei de temperatură, la diferite intervale de timp, pentru esterificarea acidului hexanoic cu 2-pentanol, catalizată de Lipozyme.

2.2.2. Reacții de transesterificare enantioselectivă

2.2.2.1. Studiul dependenței activității de transesterificare și a selectivității reacției de raportul și natura silanilor precursori, în reacțiile de acilare a 2-butanolului

Reacția generală de acilare a 2-butanolului pentru o enzimă (*R*)-selectivă este:



Schema 36

- **Catalizator : lipaza AK imobilizată prin entrapare în sol-gel**

Pentru acest studiu s-au luat în discuție zece reacții de transesterificare ale 2-butanolului, nouă reacții cu preparate enzimactice obținute prin imobilizarea lipazei AK prin entrapare și o reacție cu lipaza AK liberă. Pe baza analizelor cromatografice ale probelor luate după 24 h de reacție s-au determinat activitatea de transesterificare, randamentul de regăsire a activității enzimactice, excesul enantiomeric (ee) și factorul enantiomeric (E). Rezultatele obținute se pot observa în Tabelul 43.

Tabelul 43. Reacții de acilare a 2-butanolului catalizate de lipaza AK imobilizată

Lipaza	Raport molar silani precursori	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Rand. regăsire (%)	ee	E
AK liber	-	75	7.220	-	0.085	1.4
AK ₁₁	PhTEOS:TEOS 1:1	66	0.619	34	0.100	1.4
AK ₁₂	PhTEOS:TEOS 2:1	80	0.927	16	0.085	1.5
AK ₁₃	PhTEOS:TEOS 3:1	80	0.737	17	0.070	1.4
AK ₁₄	EtTEOS:TEOS 1:1	11	0.190	8	0.014	1.1
AK ₁₅	EtTEOS:TEOS 2:1	35	0.321	10	0.077	1.2
AK ₁₆	EtTEOS:TEOS 3:1	64	0.493	10	0.077	1.3
AK ₁₇	MTEOS:TEOS 1:1	16	0.288	22	0.026	1.1
AK ₁₈	MTEOS:TEOS 2:1	20	0.403	29	0.046	1.1
AK ₁₉	MTEOS:TEOS 3:1	24	0.378	27	0.066	1.2

Pe baza rezultatelor din acest tabel s-a reprezentat grafic activitatea de transesterificare și factorul enantiomeric în funcție de natura și raportul molar al silanilor precursori.

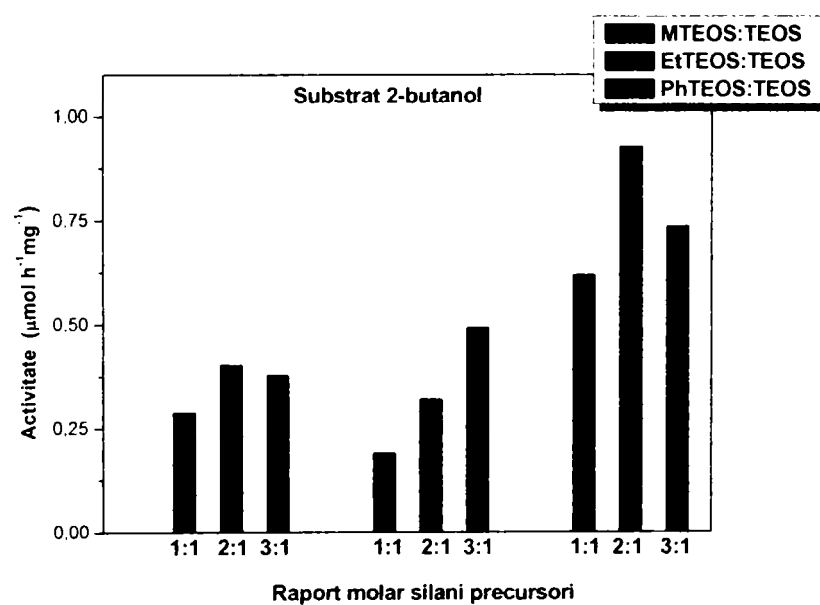


Figura 18. Dependența activității de transesterificare de natura și raportul molar al silanilor precursori. Activitatea enzimei AK libere pe substratul 2-butanol a fost $7.22 \mu\text{mol}/\text{h}\cdot\text{mg}$.

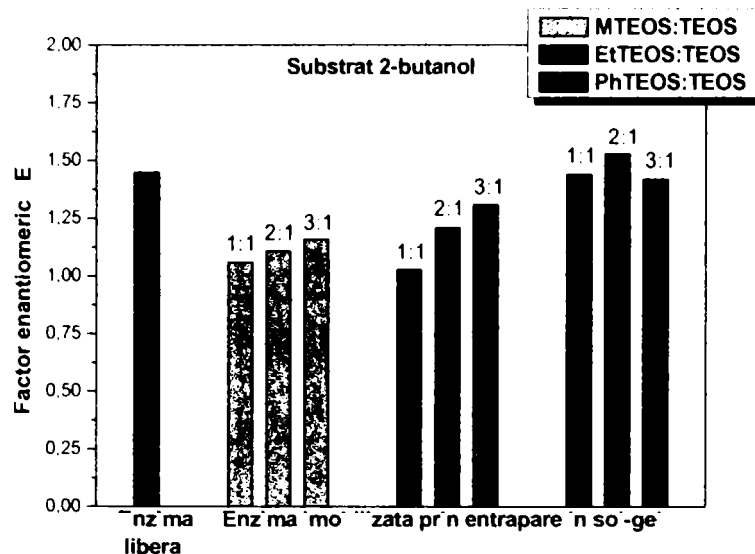


Figura 19. Dependența factorului enantiomeric de natura și raportul molar al silanilor precursori, în reacții catalizate de lipaza AK imobilizată prin entrapare

Din Figura 19 se poate observa că cele mai mari activități s-au obținut în cazul utilizării PhTEOS alături de TEOS ca silani precursori în acest caz activitatea maximă obținându-se la un raport molar PhTEOS/TEOS de 2:1. Comparativ cu enzima liberă, activitățile după imobilizare sunt mai mici, ceea ce înseamnă că randamentele de regăsire a activității enzimatică totale sunt cuprinse între 10-35%, așa cum rezultă din Tabelul 43. Selectivități mari s-au obținut de asemenea în cazul utilizării PhTEOS, valoarea maximă a factorului enantiomeric înregistrându-se tot la raportul molar PhTEOS/TEOS de 2:1. Comparativ cu reacția care utilizează drept catalizator enzima liberă, selectivitatea reacțiilor catalizate de enzimele imobilizate nu diferă foarte mult, existând preparate care în urma imobilizării conduc la o creștere a factorului enantiomeric. Cu toate acestea excesele enantiomerice obținute sunt foarte mici și utilizarea preparatelor imobilizate nu duc la creșterea selectivității reacției, deci această enzimă nu este potrivită pentru separarea izomerilor 2-butanolului.

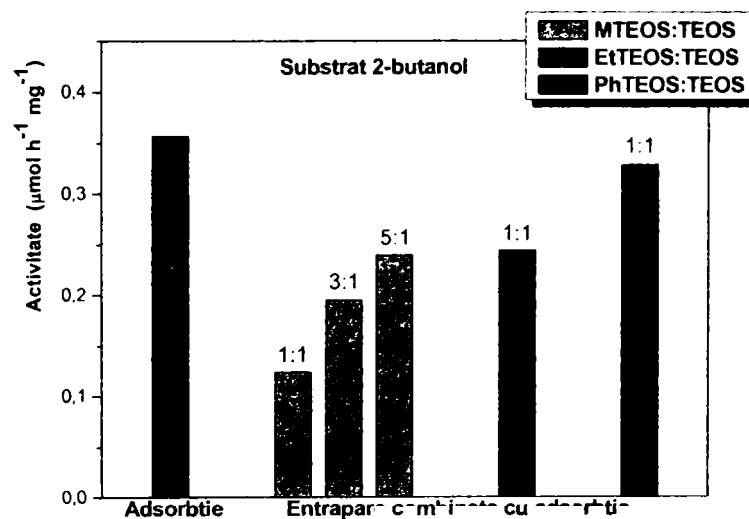
- **Catalizator: lipaza AK imobilizată prin adsorbție și entrapare combinată cu adsorbție**

Pentru realizarea acestui studiu s-a lucrat cu șase preparate enzimatică obținute prin imobilizarea lipazei AK prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție, raportul molar al silanilor precursori fiind trecut în Tabelul 44. Pentru compararea rezultatelor s-au efectuat și reacții cu enzima liberă și cu enzima imobilizată doar prin adsorbție pe Celite. Rezultatele obținute în urma calculelor au fost trecute în Tabelul 44.

Tabelul 44. Reacții de acilare a 2-butanolului cu lipaza AK imobilizată prin metoda combinată

Lipaza	Raport molar silani precursori	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Rand. regăsire (%)	ee	E
AK liber	-	75	7.220		0.085	1.9
AK ₂₀	MTEOS:TEOS 1:1	9.7	0.124	18	0.014	1.0
AK ₂₁	MTEOS:TEOS 3:1	38	0.195	27	0.054	1.2
AK ₂₂	MTEOS:TEOS 5:1	54	0.239	33	0.061	1.2
AK ₂₃	TEOS 6mmoli	-	-	-	-	-
AK ₂₄	PhTEOS:TEOS 1:1	79	0.328	48	0.058	1.3
AK ₂₅	EtTEOS:TEOS 1:1	62	0.244	34	0.060	1.3
AK ₁	Adsorbție	>99	0.357	49	0.036	1.3

Pe baza rezultatelor din tabel s-au reprezentat grafic activitatea de transesterificare în funcție de raportul molar și natura silanilor precursori utilizați la imobilizare prin metoda combinată. Se poate observa în Figura 20 prin comparație cu reacția catalizată de enzima imobilizată doar prin adsorbție, că cele mai bune activități s-au obținut cu PhTEOS ca precursor silanic alături de TEOS. Rezultate bune au fost obținute și în cazul utilizării EtTEOS : TEOS 1:1 respectiv MTEOS : TEOS 3:1.

**Figura 20.** Dependența activității de transesterificare de natura și raportul molar al silanilor precursori. Activitatea enzimei AK libere a fost $7.22 \mu\text{mol}/\text{h}\cdot\text{mg}$.

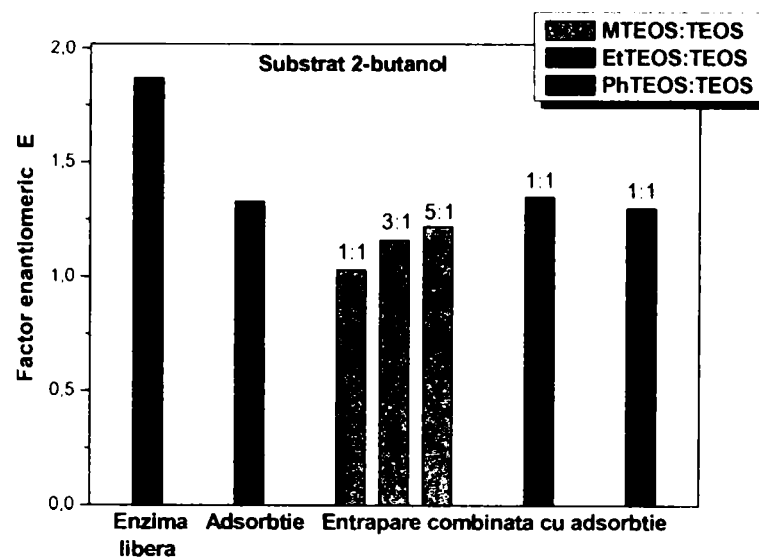


Figura 21. Dependența factorului enantiomeric de natura și raportul molar al silanilor precursori.

Selectivitatea reacțiilor catalizate de lipaza AK imobilizată prin metoda combinată în reacțiile de acilare a 2-butanolului nu este semnificativ influențată de natura și raportul molar al silanilor precursori, așa cum se poate observa în Figura 21, valorile factorului enantiomeric fiind apropiate și de cele ale reacției catalizate de enzima imobilizată prin adsorbție.

- **Catalizator: lipaza BUTE-3b imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție**

Cele șapte preparate enzimatică obținute prin imobilizarea lipazei BUTE-3b prin metoda combinată, au fost testate în reacții de acilare a 2-butanolului. De asemenea s-au efectuat reacții și cu enzima liberă și cu cea imobilizată doar prin adsorbție.

Tabelul 45. Acilarea 2-butanolului cu acetat de vinil, în prezență de lipază BUTE-3b imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție.

Lipaza	Raport molar silani precursori	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Rand. regăsire (%)	ee	E
BUTE-3b liber	-	66	2.374	-	0.46	7.6
BUTE-3b ₂	MTEOS:TEOS 1:1	14	0.056	24	0.48	3.2
BUTE-3b ₃	MTEOS:TEOS 3:1	18	0.074	31	0.47	3.5
BUTE-3b ₄	MTEOS:TEOS 5:1	35	0.145	60	0.46	3.5
BUTE-3b ₅	EtTEOS:TEOS 1:1	16	0.063	26	0.44	4.2
BUTE-3b ₆	PhTEOS:TEOS 1:1	16	0.136	49	0.49	3.6
BUTE-3b ₇	PhTEOS:TEOS 2:1	16	0.184	60	0.47	3.9
BUTE-3b ₈	PhTEOS:TEOS 3:1	20	0.184	60	0.46	3.6
BUTE-3b ₁	adsorbție	34	0.202	61	0.46	4.2

Pe baza datelor din Tabelul 45 s-a reprezentat grafic dependența activității de transesterificare de natura și raportul molar al silanilor precursori, și s-a comparat cu rezultatul obținut în reacția catalizată de enzima imobilizată prin adsorbție (Figura 22). De asemenea s-a reprezentat grafic dependența factorului enantiomeric E de natura și raportul molar al silanilor precursori (Figura 23).

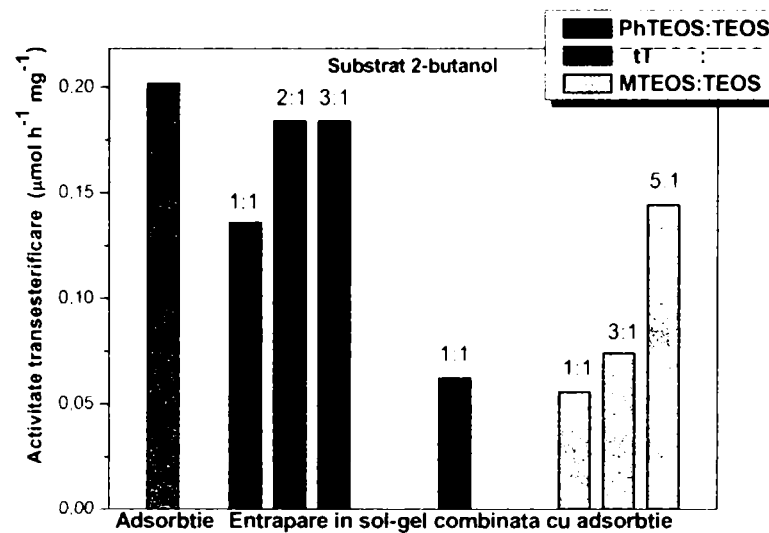


Figura 22. Dependența activității de transesterificare de natura și raportul molar al silanilor precursori în reacții catalizate de lipaza BUTE-3b imobilizată. Activitatea enzimei libere a fost 2.374 μmol·h⁻¹·mg⁻¹.

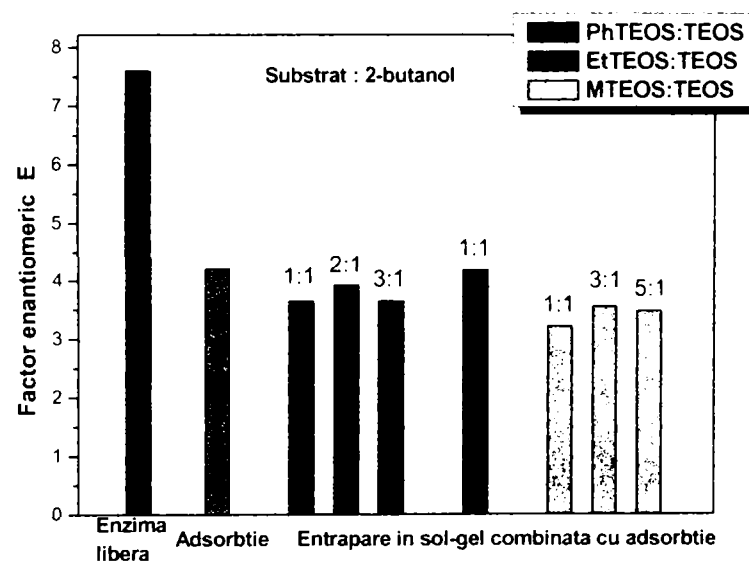


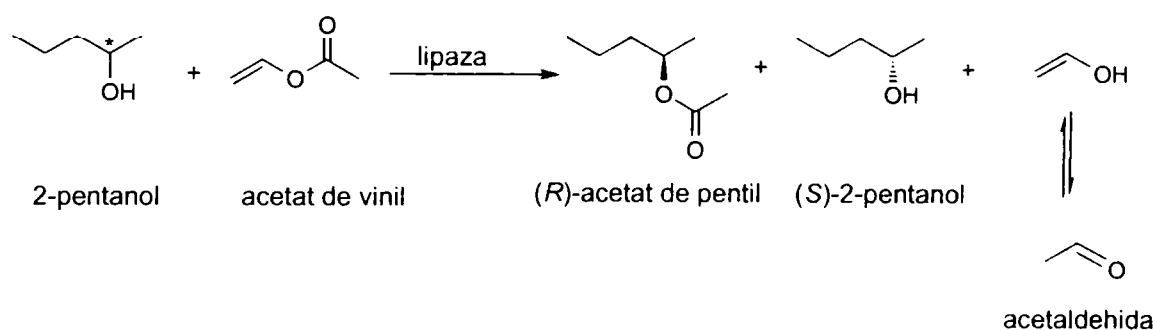
Figura 23. Dependența factorului enantiomeric de natura și raportul molar al silanilor precursori în reacții catalizate de lipaza BUTE-3b imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție.

Acilarea 2-butanolului cu enzima BUTE-3b imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție a decurs după 24 h cu randamente cuprinse între 14-35 %, așa cum se poate observa din Tabelul 45. În cazul utilizării MTEOS cea mai mare valoare a activității de transesterificare s-a înregistrat la un raport molar MTEOS/TEOS de 5:1. Cele mai bune rezultate în acest studiu s-au obținut în cazul utilizării PhTEOS ca precursor silanic alături de TEOS așa cum se poate observa și în Figura 22.

Pentru acest substrat selectivitatea reacției nu a prezentat diferențe semnificative în funcție de silanii precursori utilizați. Cea mai mare valoare înregistrată a fost în cazul utilizării preparatului enzimatic imobilizat obținut cu EtTEOS/TEOS în raport molar de 1:1. Valorile factorului enantiomeric scad însă în cazul utilizării lipazei imobilizate prin metoda sol-gel, atât comparativ cu enzima liberă, cât și față de cea imobilizată numai prin adsorbție.

2.2.2.2. Studiul dependenței activității de transesterificare și a selectivității reacției de raportul și natura silanilor precursori, în reacțiile de acilare a 2-pentanolului

Reacția generală de acilare a 2-pentanolului catalizată de o enzimă (*R*)-selectivă este:



Schema 37

- **Catalizator : lipaza AK imobilizată prin entrapare în sol-gel (Zarcula și colab., 2005)**

Pentru acest studiu s-au luat în discuție zece reacții de transesterificare ale 2-pentanolului, unde pe baza analizelor cromatografice ale probelor luate după 24 h de reacție s-au determinat activitatea de transesterificare, randamentul de regăsire a activității enzimatică, excesul enantiomeric (ee) și factorul enantiomeric (E). Rezultatele obținute se pot observa în Tabelul 46.

Tabelul 46. Reacții de acilare a 2-pentanolului catalizate de lipaza AK imobilizată

Lipaza	Raport molar silani precursori	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Rand. regăsire (%)	ee	E
AK liber	-	48	4.940	-	0.49	4.5
AK ₁₁	PhTEOS:TEOS 1:1	59	0.394	32	0.47	5.3
AK ₁₂	PhTEOS:TEOS 2:1	84	0.601	15	0.17	3.3

Tabelul 46 – continuare

AK ₁₃	PhTEOS:TEOS 3:1	88	0.616	20	0.14	4.7
AK ₁₄	EtTEOS:TEOS 1:1	14	0.077	5	0.53	3.5
AK ₁₅	EtTEOS:TEOS 2:1	52	0.451	20	0.46	4.3
AK ₁₆	EtTEOS:TEOS 3:1	57	0.511	15	0.40	3.8
AK ₁₇	MTEOS:TEOS 1:1	14	0.118	13	0.63	4.9
AK ₁₈	MTEOS:TEOS 2:1	25	0.230	24	0.65	5.8
AK ₁₉	MTEOS:TEOS 3:1	19	0.200	21	0.69	6.3

Din Tabelul 46 se observă că după 24 h s-au obținut randamente de ester cuprinse între 14-88%. ceea ce înseamnă că activitatea preparatelor obținute a diferit și de această dată mult în funcție de natura și raportul molar al silanilor precursori. Acest lucru se poate observa în Figura 24, confirmându-se că preparatul care a fost obținut cu PhTEOS a fost cel mai activ și față de acest substrat. Însă și cele obținute cu EtTEOS au avut activități de transesterificare ridicate.

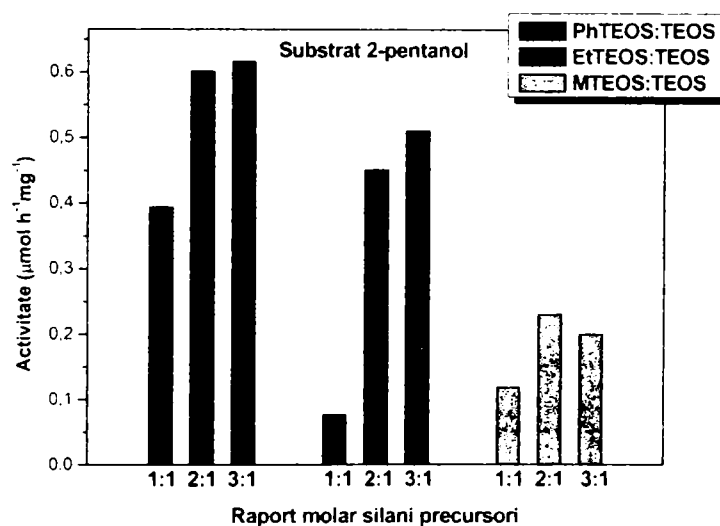


Figura 24. Dependența activității de transesterificare de natura și raportul molar al silanilor precursori. Activitatea de transesterificare a enzimei libere pe 2-pentanol a fost $4.94 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Comparând valorile randamentelor și cele ale exceselor enantiomerice se observă că cu cât valoarea randamentului de ester depășește 50%, cu atât excesele enantiomerice devin mai mici. Fiind vorba despre o rezoluție cinetică, acest lucru este normal, pentru că reacționând ambii enantiomeri rezultă că puritatea optică a produsului va scădea.

Dacă se consideră cromatogramele amestecurilor de reacție la 24 h ale reacțiilor de acilare catalizate de lipaza AK liberă și ce a imobilizată prin entrapare

AK₁₉ (Figura 25), se poate observa creșterea excesului enantiomeric în cazul enzimei imobilizate justificând astfel unul din motivele imobilizării enzimelor libere.

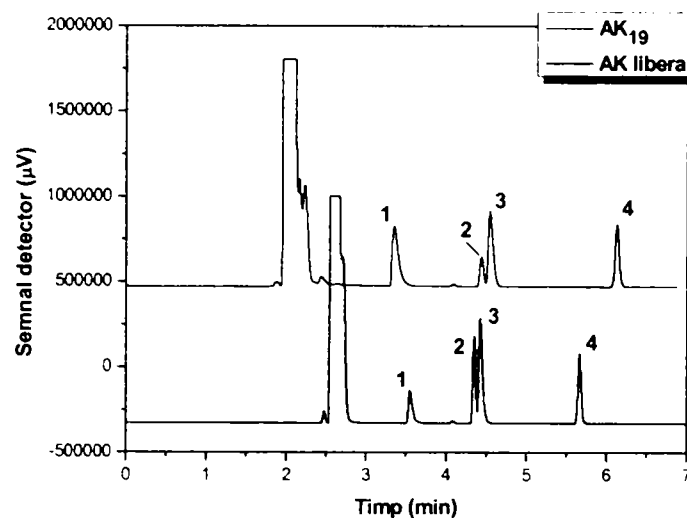


Figura 25. Cromatogramele amestecurilor de reacție la 24h, din reacția de acilare a 2-pentanolului cu lipaza AK liberă și AK₁₉
1 – 2-pentanol, 2 – (*S*)-acetat de pentil, 3 – (*R*)-acetat de pentil, 4 – n-decan

În Figura 26 sunt prezentate cromatogramele amestecului de reacție la diferite intervale de timp, ale reacției catalizate de lipaza AK₁₂. Se observă scăderea picului de alcool în timp concomitent cu creșterea picurilor de izomeri de ester.

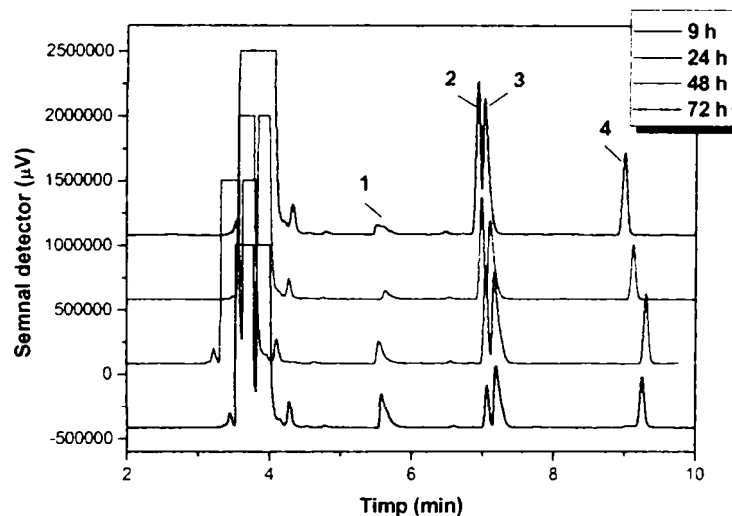


Figura 26. Cromatogramele amestecurilor de reacție la diferite intervale de timp, ale reacției de transesterificare 2-pentanol cu acetat de vinil catalizate de lipaza AK₁₂
1 – 2-pentanol, 2 – (*S*)-acetat de pentil, 3 – (*R*)-acetat de pentil, 4 – n-decan

Figura 27 confirmă că selectivitatea reacției a fost cea mai mare utilizând preparatul obținut cu MeTEOS/TEOS în raport molar de 3:1. Deși activitatea de transesterificare este mai mică, randamentul de regăsire a activității este bun (21%), deci se poate spune că acest preparat este cel mai potrivit pentru rezoluția optică a 2-pentanolului. Se observă că în urma imobilizării prin sol-gel valorile factorului

enantiomeric crește comparativ cu enzima liberă cu aproximativ 40%. Excesele enantiomerice în cazul 2-pentanolului sunt mult mai mari decât în cazul 2-butanolului, ajungând până aproape de 70%.

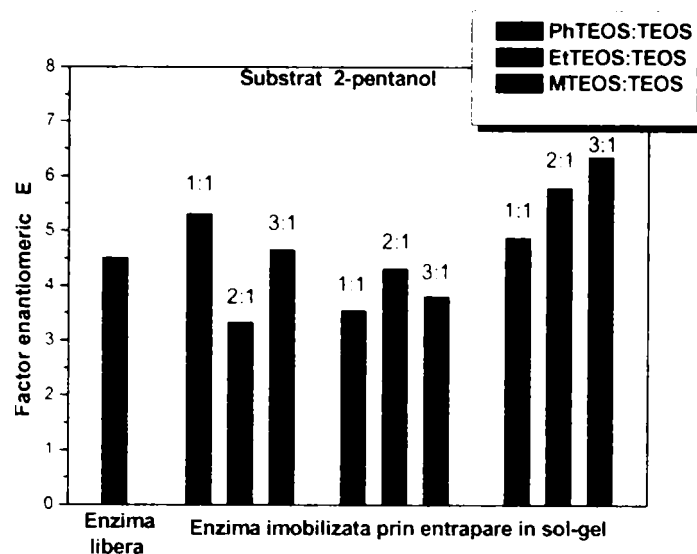


Figura 27. Dependența factorului enantiomeric de silanii precursori

- **Catalizator: lipaza AK immobilizată prin adsorbție și entrapare combinată cu adsorbție** (Zarcuța și colab., 2005)

Au fost sintetizate șase preparate enzimatic prin immobilizarea lipazei AK prin metoda entrapării în sol-gel combinată cu adsorbție, raportul molar al silanilor precursori fiind trecut în Tabelul 47. Pentru compararea rezultatelor s-au efectuat reacții și cu enzima liberă și cu enzima immobilizată doar prin adsorbție pe Celite. Rezultatele obținute în urma calculelor au fost trecute în Tabelul 47.

Tabelul 47. Acilarea 2-pentanolului cu acetat de vinil, în prezență de lipază AK immobilizată prin adsorbție și entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție

Lipaza	Raport molar silani precursori	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Rand. regăsire (%)	ee	E
AK liber	-	48	4.940	-	0.49	4.5
AK ₂₀	MTEOS:TEOS 1:1	13	0.033	7	0.70	6.1
AK ₂₁	MTEOS:TEOS 3:1	47	0.200	40	0.53	5.5
AK ₂₂	MTEOS:TEOS 5:1	55	0.207	41	0.48	5.0
AK ₂₃	TEOS 6mmoli	-	-	-	-	-
AK ₂₄	PhTEOS:TEOS 1:1	50	0.202	43	0.36	3.0
AK ₂₅	EtTEOS:TEOS 1:1	52	0.210	43	0.45	6.3
AK ₁	adsorbție	82	0.303	60	0.13	2.1

Se observă că randamentele de regăsire a activității enzimatică pentru lipaza AK imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție au fost în jur de 40% pentru majoritatea preparatelor, mai mari decât în cazul imobilizării numai prin entrapare, așa cum rezultă din Tabelul 47. Doar în cazul utilizării unui raport molar de silani precursori MTEOS/TEOS de 1:1 s-a obținut un preparat cu activitate mai mică. Randamentul de ester a fost mai mare când reacția a fost catalizată de lipaza imobilizată prin adsorbție dar acest preparat prezintă dezavantajul unei enantioselectivități mai reduse. În Figura 28 este reprezentată dependența activității de transesterificare de natura și raportul molar al silanilor precursori. Dintre enzimele imobilizate prin metoda combinată cele care conțin MTEOS au condus la rezultate mai bune, în acest caz excesele enantiomeric și selectivitatea reacției fiind chiar mai mari ca în cazul enzimei libere așa cum se poate observa din Figura 29.

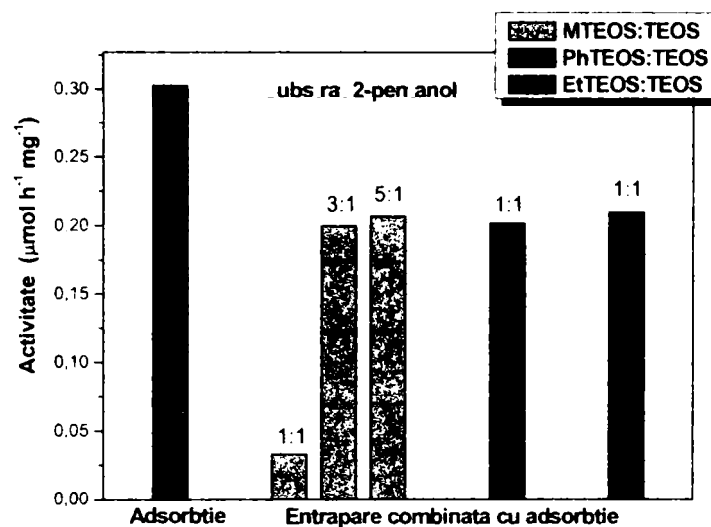


Figura 28. Dependența activității de transesterificare de natura și raportul molar al silanilor precursori. Activitatea enzimei libere a fost $4.94 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

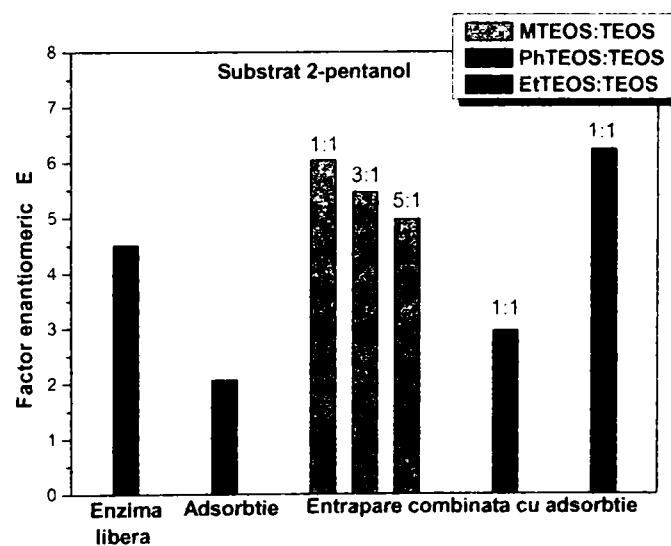


Figura 29. Dependența factorului enantiomeric de natura și raportul molar al silanilor precursori în reacții catalizate de lipaza AK imobilizată.

• **Catalizator: lipaza BUTE-3b imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție**

Pentru acest studiu s-a lucrat cu șapte preparate imobilizate prin entrapare combinată cu adsorbție, care s-au comparat cu rezultatele obținute în cazul utilizării enzimei libere și enzimei imobilizate prin adsorbție pe Celite. Randamentul și activitatea de transesterificare, randamentul de regăsire a activității enzimatică, excesul enantiomeric și factorul enantiomeric pentru fiecare reacție au fost și în acest caz calculate pe baza analizelor cromatografice ale probelor luate la 24 h de reacție. Rezultatele sunt redate în Tabelul 48.

Tabelul 48. Acilarea 2-pentanolului cu acetat de vinil, în prezență de lipază BUTE-3b imobilizată prin adsorbție și entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție.

Lipaza	Raport molar silani precursori	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Rand. regăsire (%)	ee	E
BUTE-3b liber	-	46	1.811	-	0.88	37
BUTE-3b ₂	MTEOS:TEOS 1:1	9	0.033	19	0.92	28
BUTE-3b ₃	MTEOS:TEOS 3:1	22	0.090	50	0.91	31
BUTE-3b ₄	MTEOS:TEOS 5:1	24	0.101	55	0.90	29
BUTE-3b ₅	EtTEOS:TEOS 1:1	13	0.055	30	0.89	21
BUTE-3b ₆	PhTEOS:TEOS 1:1	14	0.053	25	0.92	32
BUTE-3b ₇	PhTEOS:TEOS 2:1	13	0.050	22	0.89	22
BUTE-3b ₈	PhTEOS:TEOS 3:1	21	0.080	34	0.89	24
BUTE-3b ₁	adsorbție	32	0.119	48	0.90	32

Se poate observa în Tabelul 48 că în reacțiile care utilizează lipază BUTE-3b imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție s-au obținut randamente în ester cuprinse între 9 și 24% după 24 de ore de reacție, comparativ cu 46% în cazul enzimei libere și 32 % în cazul enzimei imobilizate numai prin adsorbție fizică. De asemenea excesele enantiomerice obținute au fost sensibil mai mari în toate cazurile studiate.

Reprezentarea grafică din Figura 30 ne arată activitatea de transesterificare variază în funcție de natura și raportul molar al silanilor precursori utilizați la imobilizare. Enzima imobilizată cea mai activă a fost cea obținută din precursori MTEOS și TEOS în raport molar de 5:1.

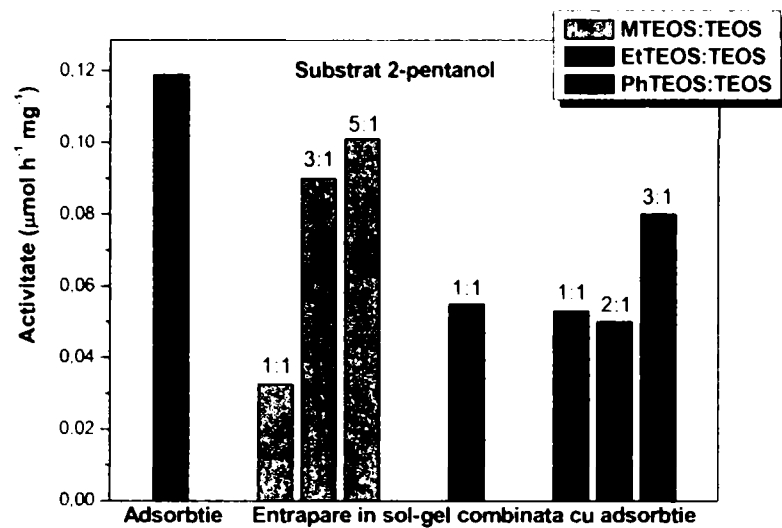


Figura 30. Dependența activității de transesterificare a lipazei BUTE-3b imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție de natura și raportul molar al silanilor precursori. Activitatea enzimei libere a fost $1.81 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

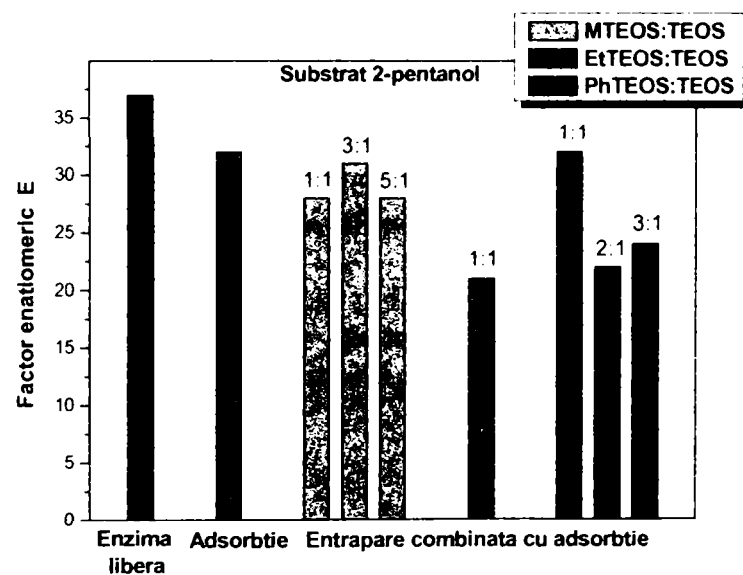


Figura 31. Dependența factorului enantiomeric de natura și raportul molar al silanilor precursori în reacții catalizate de lipaza BUTE-3b imobilizată prin adsorbție și entrapare combinată cu adsorbție.

Folosind metoda de imobilizare de entrapare combinată cu adsorbție s-au realizat valori ridicate ale factorului enantiomeric, apropiate de cele înregistrate cu enzima liberă și cea imobilizată numai prin adsorbție. Cele mai bune rezultate s-au obținut când s-a utilizat preparatul cu raportul molar PhTEOS : TEOS de 1:1 și MTEOS : TEOS de 3:1.

Dacă se consideră cele două enzime folosite drept catalizator în reacțiile de acilare a 2-pentanolului, AK și BUTE-3b, imobilizate prin aceeași metodă, și anume entrapare combinată cu adsorbție, se poate observa în Figura 32 că lipaza BUTE-3b

conduce la un exces enantiomeric mult mai mare decât lipaza AK, deci această lipază este mai potrivită pentru rezoluția optică a acestui substrat.

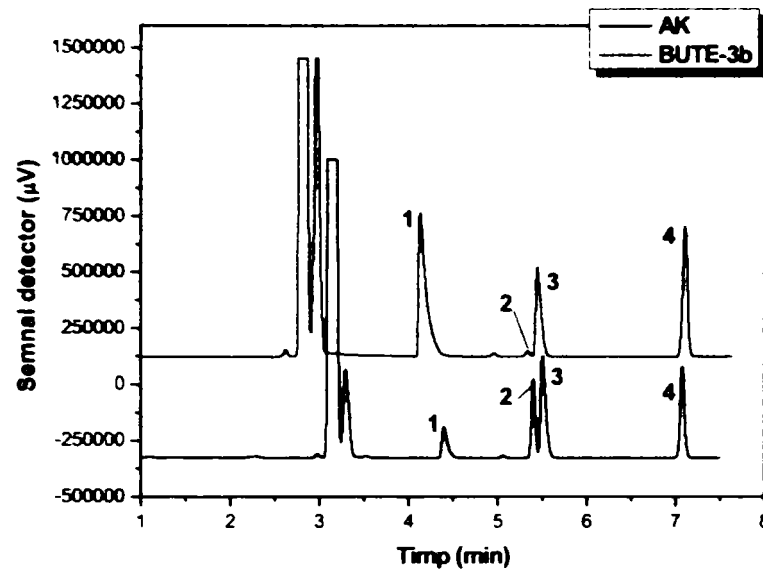
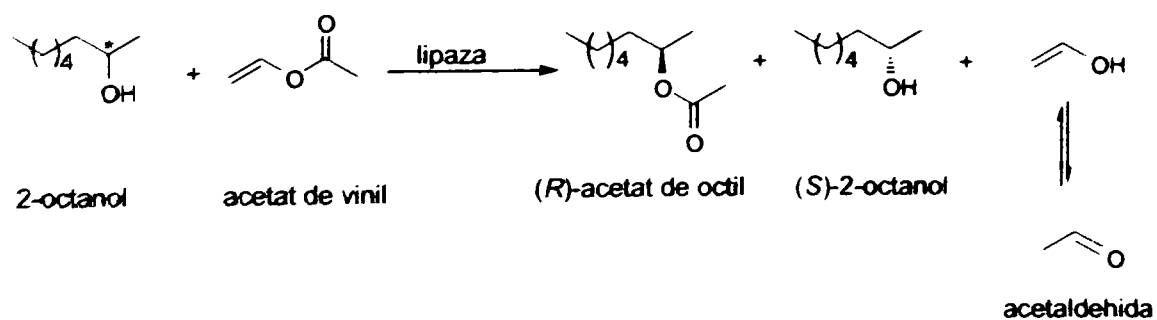


Figura 32. Cromatogramele amestecurilor de reacție la 24h. din reacția de acilare a 2-pentanolului cu lipaza AK și BUTE-3b imobilizate cu aceeași metodă (entrapare combinată cu adsorbție, raport molar MTEOS:TEOS=5:1)
1 – 2-pentanol, 2 – (*S*)-acetat de pentil, 3 – (*R*)-acetat de pentil, 4 – n-decan

2.2.2.3. Studiul dependenței activității de transesterificare și a selectivității reacției de raportul și natura silanilor precursori, în reacțiile de acilare a 2-octanolului

Substratul utilizat pentru acest studiu a fost 2-octanolul iar agentul de acilare acetatul de vinil, conform următoarei reacții catalizate de o lipază (*R*)-selectivă:



Schema 38

- **Catalizator: lipaza AK imobilizată prin entrapare în sol-gel**

Și pentru acest studiu s-au considerat opt reacții de transesterificare ale 2-octanolului catalizate de lipaze AK imobilizate prin entrapare, care au fost comparate cu reacția catalizată de enzima liberă. Pe baza analizelor cromatografice ale probelor luate după 24h de reacție s-au determinat activitatea de transesterificare, randamentul

de regăsire a activității enzimaticе, excesul enantiomeric (ee) și factorul enantiomeric (E).

Tabelul 49. Reacția de acilare a 2-octanolului cu lipaza AK imobilizată prin entrapare

Lipaza	Raport molar silani precursori	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Rand. regăsire (%)	ee	E
AK liber	-	59	6.110	-	0.48	5.4
AK ₁₁	PhTEOS:TEOS 1:1	66	0.412	27	0.58	7.0
AK ₁₃	PhTEOS:TEOS 3:1	80	0.497	13	0.48	6.4
AK ₁₄	EtTEOS:TEOS 1:1	-	0.005	<1	-	-
AK ₁₅	EtTEOS:TEOS 2:1	24	0.163	6	0.53	3.7
AK ₁₆	EtTEOS:TEOS 3:1	48	0.309	7	0.53	4.4
AK ₁₇	MTEOS:TEOS 1:1	10	0.075	7	0.55	3.7
AK ₁₈	MTEOS:TEOS 2:1	16	0.119	10	0.59	4.3
AK ₁₉	MTEOS:TEOS 3:1	17	0.125	11	0.62	4.7

Se observă că pe acest substrat cele mai active au fost preparatele obținute cu PhTEOS. însă și cele obținute cu EtTEOS au avut activități ridicate. În Figura 33 este reprezentată grafic dependența activității de natura și raportul silanilor precursori pe substratul 2-octanol.

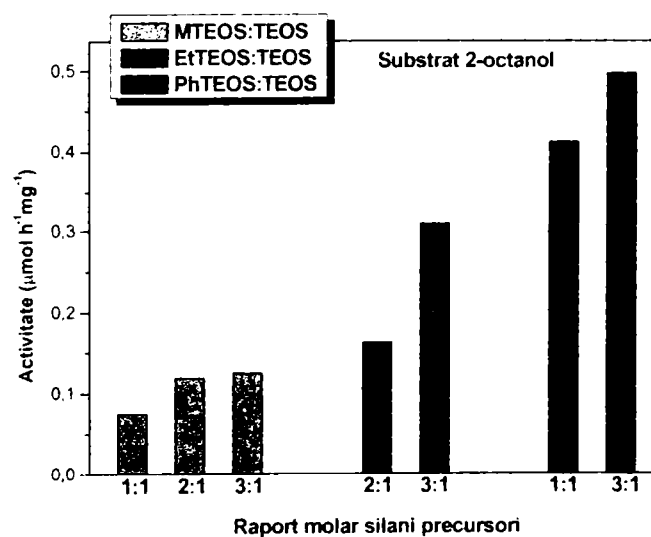


Figura 33. Dependența activității de transesterificare de natura și raportul molar al silanilor precursori în reacții catalizate de lipaza AK imobilizată prin entrapare. Activitatea enzimei libere a fost $6.11 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

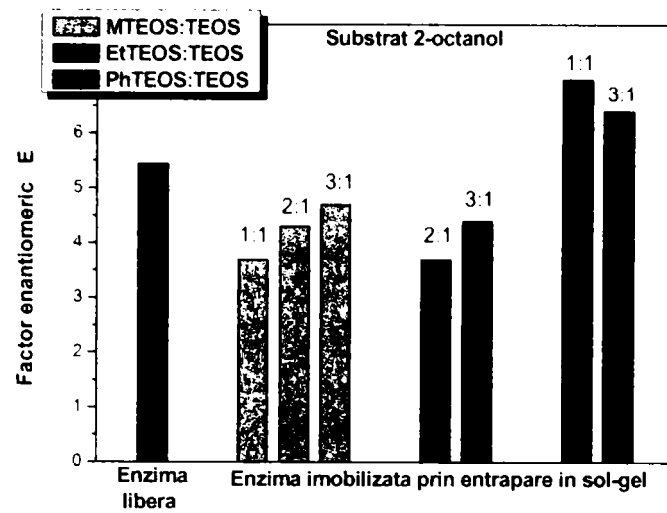


Figura 34. Dependența factorului enantiomeric de natura și raportul molar al silanilor precursori în reacții catalizate de lipaza AK immobilizată prin entrapare

Se poate observa din aceste date că în reacția de acilare a 2-octanolului preparatele care au prezentat cea mai mare activitate și selectivitate au fost cele obținute pe bază de PhTEOS. Astfel, la raport molar PhTEOS/TEOS de 1:1 factorul de enantioselectivitate E a fost 7, mai mare cu 30% decât în cazul enzimei libere, excesul enantiomeric de 58%, iar randamentul de regăsire a activității 27%.

- **Catalizator : lipaza AK immobilizată prin adsorbție și entrapare combinată cu adsorbție**

Cele șase preparate enzimice obținute prin immobilizarea Lipazei AK prin metoda combinată au fost testate și pe substratul 2-octanol. S-au efectuat și reacții cu lipaza liberă și cu cea immobilizată prin adsorbție iar rezultatele obținute au fost trecute în Tabelul 50.

Tabelul 50. Reacții de acilare a 2-octanolului catalizate de lipază AK immobilizată

Lipaza	Raport molar silani precursori	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Rand. regăsire (%)	ee	E
AK liber	-	59	6.110	-	0.48	5.4
AK ₂₀	MTEOS:TEOS 1:1	4	0.041	7	0.60	4.3
AK ₂₁	MTEOS:TEOS 3:1	26	0.103	17	0.60	4.8
AK ₂₂	MTEOS:TEOS 5:1	30	0.104	17	0.60	4.8
AK ₂₃	TEOS 6mmoli	-	-	-	-	-
AK ₂₄	PhTEOS:TEOS 1:1	62	0.247	43	0.54	6.2
AK ₂₅	EtTEOS:TEOS 1:1	67	0.303	50	0.52	5.6
AK ₁	adsorbție	88	0.337	54	0.31	7.3

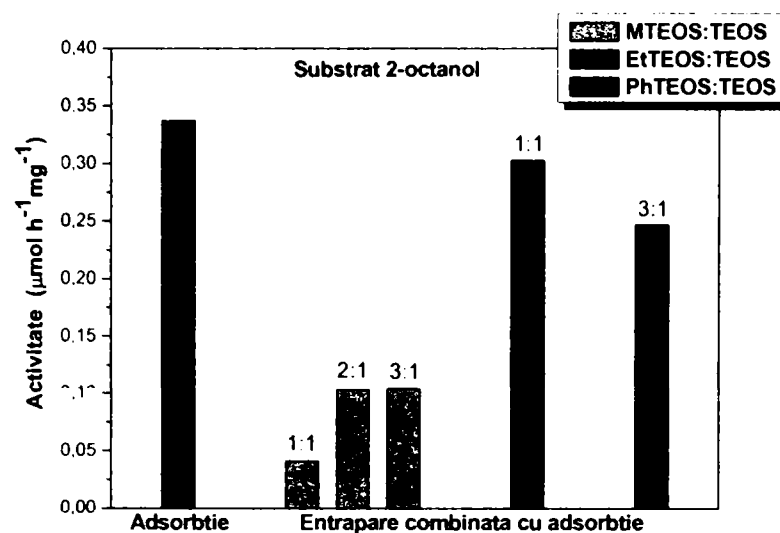


Figura 35. Dependența activității de reacție de natura și raportul molar al silanilor precursori.

Dintre preparatele enzimatic testate cele mai bune rezultate s-au obținut atunci când s-a folosit EtTEOS respectiv PhTEOS alături de TEOS la imobilizare (Figura 35).

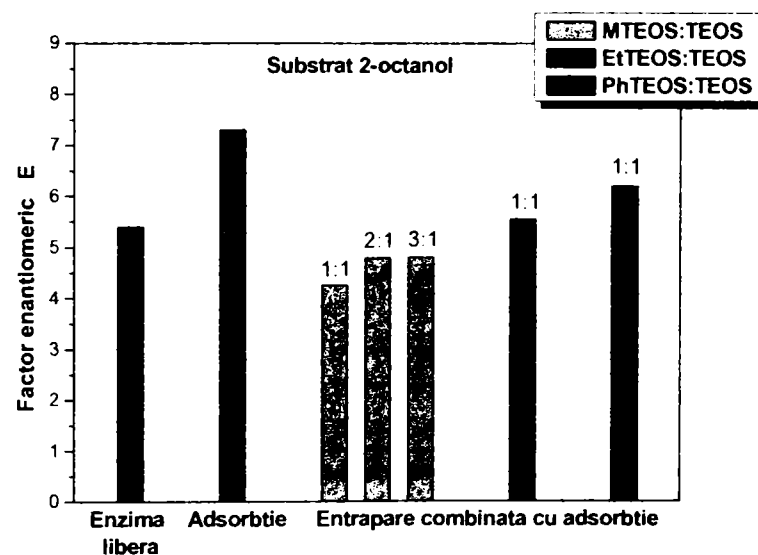


Figura 36. Dependența factorului enantiomeric de natura și raportul molar al silanilor precursori

Spre deosebire de 2-pentanol, în cazul 2-octanolului se înregistrează o creștere a enantioselectivității în urma imobilizării prin metoda combinată doar în comparație cu enzima liberă în timp ce rezultatele cele mai bune se observă la enzima imobilizată prin adsorbție. Excesul enantiomeric este însă mai mic la enzima adsorbită, deci pe ansamblu și în acest caz entraparea combinată cu adsorbție duce la rezultate mai bune.

- **Catalizator: lipaza BUTE-3b imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție**

În acest studiu s-a lucrat cu șapte preparate obținute prin imobilizarea lipazei BUTE - 3b prin metoda combinată, cu enzima liberă și cu enzima imobilizată prin adsorbție. Pe baza analizelor cromatografice ale probelor luate la 24 h de reacție, s-au calculat randamentul de ester, activitatea de transesterificare, randamentul de regăsire a activității enzimatică, excesul enantiomeric și factorul enantiomeric pentru fiecare reacție. Rezultatele obținute sunt trecute în Tabelul 51.

Tabelul 51. Acilarea 2-octanolului cu acetat de vinil, în prezență de lipază BUTE-3b imobilizată prin adsorbție și entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție.

Lipaza	Raport molar silani precursori	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare ($\mu\text{moli/h} \cdot \text{mg}_{\text{enz}}$)	Rand. regăsire (%)	ee	E
BUTE-3b liber	-	63	2.59	-	0.85	29
BUTE-3b ₂	MTEOS:TEOS 1:1	4	0.017	7	0.88	16
BUTE-3b ₃	MTEOS:TEOS 3:1	14	0.068	26	0.89	19
BUTE-3b ₄	MTEOS:TEOS 5:1	21	0.092	35	0.87	19
BUTE-3b ₅	EtTEOS:TEOS 1:1	11	0.050	19	0.82	11
BUTE-3b ₆	PhTEOS:TEOS 1:1	9	0.026	9	0.90	20
BUTE- BUTE-3b ₇	PhTEOS:TEOS 2:1	12	0.029	9	0.88	17
BUTE-3b ₈	PhTEOS:TEOS 3:1	16	0.049	15	0.90	21
BUTE-3b ₁	adsorbție	27	0.093	26	0.89	22

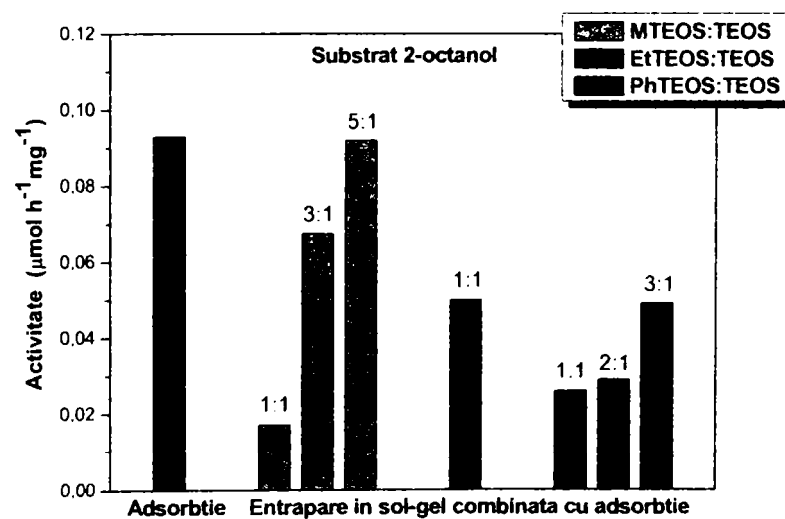


Figura 37. Dependența activității de transesterificare de natura și raportul molar al silanilor precursori. Activitatea enzimei libere a fost $2.59 \mu\text{moli/h} \cdot \text{mg}_{\text{enz}}$

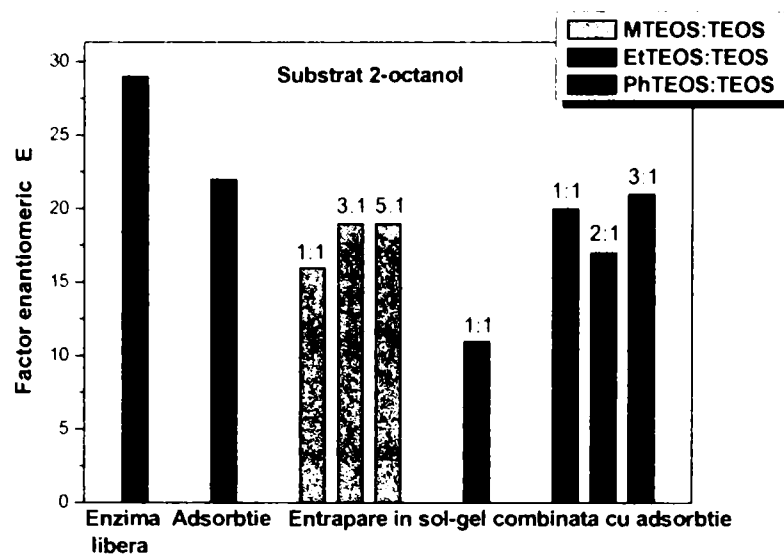


Figura 38. Dependența factorului enantiomeric de natura și raportul molar al silanilor precursori.

Și în cazul substratului 2-octanol, preparatele cele mai active din enzima BUTE-3b s-au obținut folosind MTEOS ca al doilea silan precursor. Creșterea proporției grupării hidrofobe a dus la formarea unui preparat mai activ, randamentul de regăsire a activității fiind 35% la preparatul obținut cu un raport molar MTEOS/TEOS de 5:1. Enantioselectivitatea ridicată a enzimei libere în raport cu acest substrat s-a menținut și chiar a crescut puțin în urma imobilizării. Însă randamentele mai scăzute ale reacției de transesterificare au afectat valorile factorului de enantioselectivitate E.

2.2.2.1. Studiul dependenței factorului enantiomeric și a excesului enantiomeric de natura substratului

Pentru realizarea acestui studiu s-au considerat reacțiile de acilare ale celor trei alcooli secundari : 2-butanol, 2-pentanol și 2-octanol cu acetatul de vinil, catalizate de lipaza AK imobilizată prin entrapare și prin entrapare combinată cu adsorbție și lipaza BUTE-3b imobilizată prin metoda combinată (entrapare și adsorbție).

Pentru a exemplifica diferențele în ce privește enantioselectivitatea reacției de acilare a celor trei alcooli secundari menționați, în figurile 39-41 sunt prezentate cromatogramele amestecurilor de reacție după 24 h catalizate de aceeași lipază (BUTE-3b₄) pe substraturi diferite: 2-butanol, 2-pentanol, 2-octanol. Așa cum se poate remarca, numai izomerii optici ai esterilor formați s-au separat pe faza staționară chirală utilizată, nu și cei ai alcoolilor. Atribuirea picurilor pentru izomerii optici ai esterilor s-a făcut pe baza specificității acestei lipaze pentru enantiomerul (*R*) al alcoolilor secundari în reacțiile de acilare (Bodai, 2004). Se observă că în cazul 2-butanolului excesul enantiomeric este mic, (*R*)- și (*S*)-esterul având picuri de arie aproape egală. În cazul celorlalți doi alcooli, picul corespunzător izomerului (*S*) este foarte mic, deci se poate afirma că acest preparat enzimatic duce la formarea unor produși de puritate enantiomerică ridicată dacă se folosește ca substrat 2-pentanol sau 2-octanol.

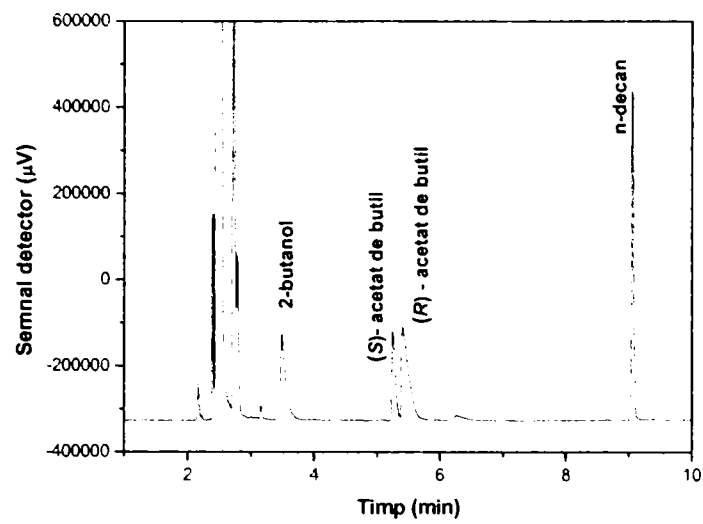


Figura 39. Cromatograma amestecului de reacție după 24 h, din reacția de acilare a 2-butanolului cu lipaza BUTE-3b₃ (imobilizată prin metoda combinată, raport molar MTEOS:TEOS=5:1)

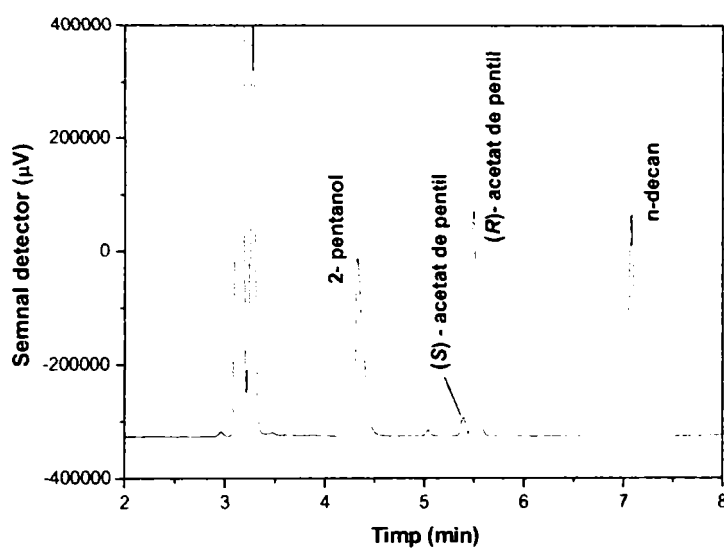


Figura 40. Cromatograma amestecului de reacție după 24 h, din reacția de acilare a 2-pentanolului cu lipaza BUTE-3b₄

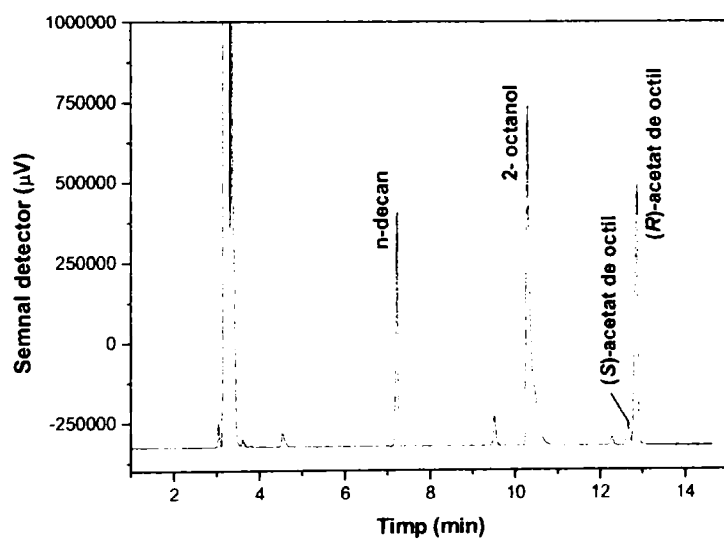


Figura 41. Cromatograma amestecului de reacție după 24 h, din reacția de acilare a 2-octanolului cu lipaza BUTE-3b₄

Creșterea însemnată a enantioselectivității la trecerea de la 2-butanol la 2-pentanol a fost raportată în literatura de specialitate pentru o altă lipază, cea din *Candida antarctica* B (Rottici și colab., 1998). Explicația pentru această comportare oarecum surprinzătoare rezidă în orientarea diferită a celor doi enantiomeri ai alcoolului secundar atunci când aceștia se leagă de centrul activ pentru a interacționa cu intermediarul acil-enzimă. În condițiile în care enzima respectă regula lui Kazlauskas, s-a demonstrat că enantiomerul care reacționează cu viteză mai mare se poziționează cu substituentul de mărime medie (gruparea metil în cazul nostru) într-o cavitate mică aflată în partea inferioară a centrului activ, în timp ce substituentul mare este orientat spre suprafața enzimei. Această cavitate reprezintă zona de stereoselectivitate a centrului activ al enzimei. În cazul enantiomerului care reacționează cu viteză mai mică orientarea este inversă, adică cu substituentul mare în zona de stereoselectivitate și cu substituentul de mărime mijlocie spre suprafața enzimei (Figura 42). Acest lucru înseamnă că un substituent cu volum mai mare trebuie să fie orientat steric într-o zonă relativ restrânsă ca volum, ceea ce duce la împiedicare sterică și scăderea vitezei de reacție a enantiomerului respectiv.

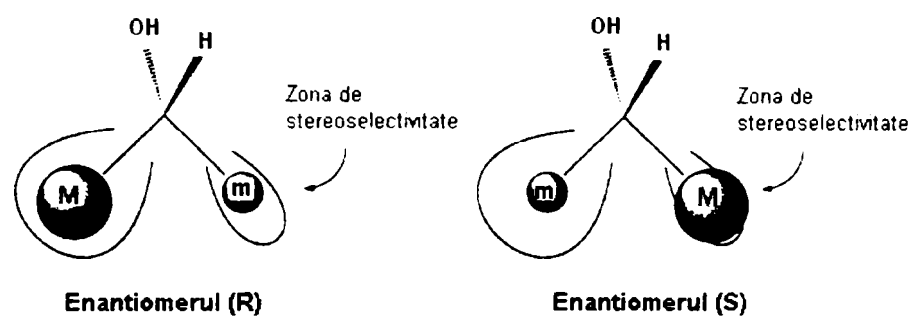


Figura 42. Orientarea celor doi enantiomeri ai unui alcool secundar prin poziționarea substituentului mijlociu (m) și mare (M) în centrul activ al enzimei

S-a reprezentat grafic selectivitatea reacției în funcție de natura și raportul molar al silanilor precursori, pentru cei trei alcooli utilizați ca substrat (Figurile 43, 44, 45). Se confirmă și aici diferența mare în ce privește enantioselectivitatea reacției în raport cu 2-butanolul și ceilalți alcooli secundari care au catenă mai lungă. Cele mai mari selectivități s-au obținut în majoritatea cazurilor pentru 2-pentanol, existând însă și cazuri în care enantioselectivitatea față de 2-octanol a fost cea mai mare. Conform regulii Kazlauskas, ar fi trebuit ca enantioselectivitatea față de 2-octanol să fie mai mare, ținând cont de faptul că acesta posedă un substituent mai voluminos. Faptul că acest lucru nu se întâmplă în toate cazurile ne arată că fenomenul este în realitate mai complicat și intervin și alți factori în afară de cei menționați. Din Figurile 42 și 43 mai rezultă că nu s-au înregistrat modificări semnificative ale enantioselectivității în funcție de metoda de imobilizare utilizată, entrapare simplă sau combinată cu adsorbție.

Ca valoare absolută a enantioselectivității, comparând cele trei grafice între ele se observă că lipaza BUTE-3b pe substratul 2-pentanol a condus la valorile cele mai mari ale enantioselectivității, de peste 20, reacțiile cu $E \geq 20$ fiind considerate suficiente pentru ca sinteza respectivă să poată fi utilizată industrial (Bornscheuer și Kaslauskas, 1999).

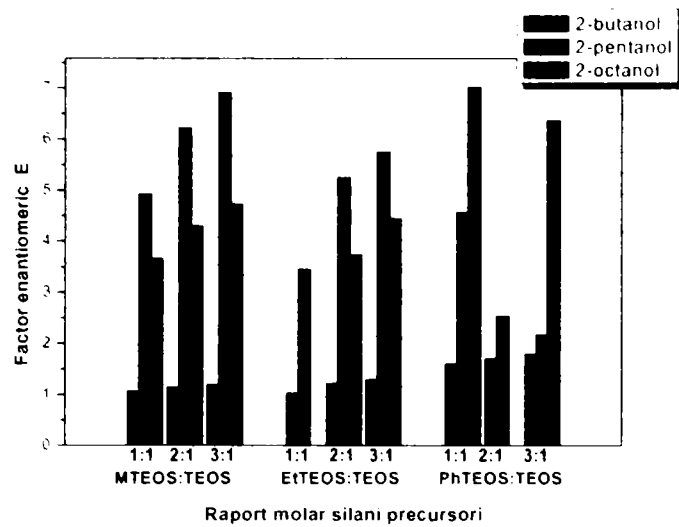


Figura 42. Dependența factorului enantiomeric de natura și raportul molar al silanilor precursori în reacții de acilare ale alcoolilor secundari catalizate de lipaza AK imobilizată prin entrapare

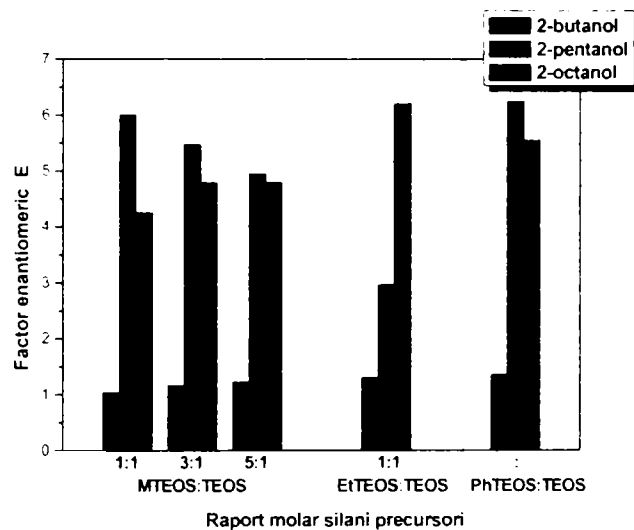


Figura 43. Dependența factorului enantiomeric de natura și raportul molar al silanilor precursori în reacții de acilare ale alcoolilor secundari catalizate de lipaza AK imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție

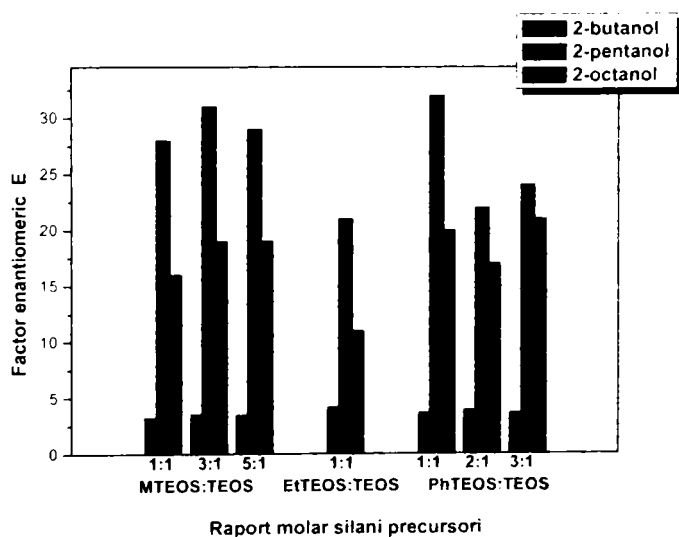


Figura 44. Dependența factorului enantiomeric de natura și raportul molar al silanilor precursori în reacții de acilare ale alcoolilor secundari catalizate de lipaza BUTE-3b imobilizată

Deoarece lipaza BUTE-3b imobilizată determină obținerea unor valori mai mari ale excesului enantiomeric comparativ cu lipaza AK imobilizată, se poate afirma că această lipază este cea potrivită dacă scopul urmărit este obținerea unor compuși

enantiomeric puri. În Figura 45 s-au reprezentat grafic excesele enantiomerice în reacțiile de acilare a celor trei alcooli secundari studiați pentru mai multe lipaze BUTE-3b imobilizate, în comparație cu enzima liberă. Preparatele imobilizate diferă prin natura și raportul molar al silanilor precursori. Se poate remarca faptul că excesul enantiomeric nu suferă decât modificări neînsemnate dacă se schimbă natura sau raportul molar al silanilor precursori, ceea ce arată că imobilizarea nu produce modificări semnificative la nivelul centrului activ al enzimei. De asemenea se observă că enantioselectivitatea ridicată pe care o manifestă enzima liberă față de 2-pentanol și 2-octanol se menține și după imobilizarea ei prin metoda sol-gel, în timp ce aceeași selectivitate față de 2-butanol rămâne mult mai mică. În consecință, nici specificitatea de substrat în reacțiile de acilare enantioselectivă nu este influențată de imobilizare.

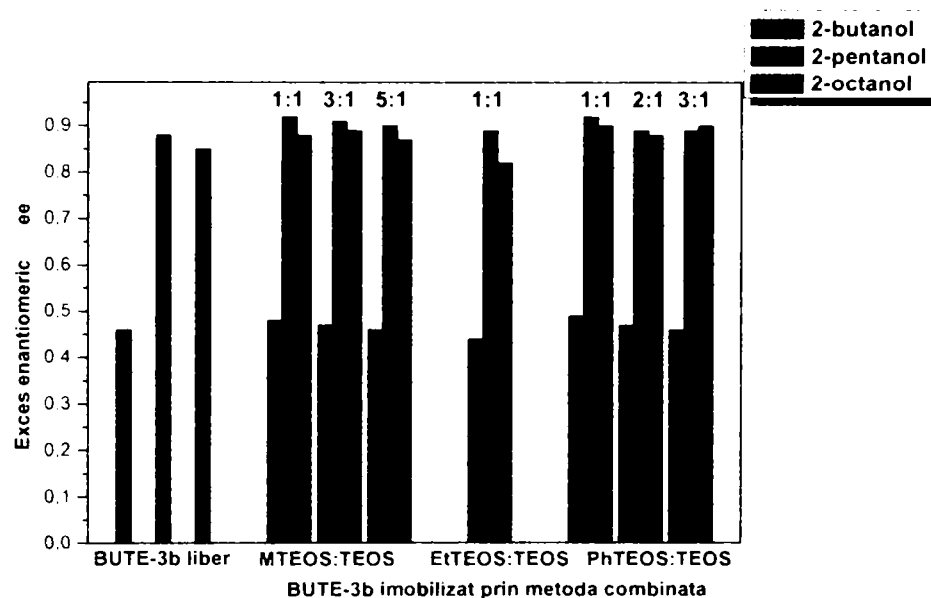


Figura 45. Dependența excesului enantiomeric de silanii precursori pentru reacțiile de acilare ale alcoolilor secundari catalizate de lipaza BUTE-3b

2.2.3.5. Studiul termostabilității lipazelor imobilizate prin metoda entrapării în sol-gel combinată cu adsorbție

Mentținerea activității enzimelor la temperaturi ridicate este un obiectiv important al catalizei enzimatică, deoarece pierderea activității la temperaturi de peste 40-50°C este unul dintre motivele principale care împiedică aplicarea industrială a biocatalizatorilor, în condițiile în care la temperaturi mai scăzute viteza reacțiilor este de multe ori nesatisfăcătoare. Imobilizarea poate fi o metodă de creștere a termostabilității enzimelor, așa cum s-a demonstrat în mai multe cazuri. Pierderea activității catalitice a enzimelor la temperaturi ridicate se datorează unor modificări conformaționale ireversibile care au loc la nivelul structurii terțiare. Imobilizarea determină blocarea unor posibilități de modificare a structurii terțiare, ceea ce poate fi una dintre explicațiile creșterii termostabilității în urma imobilizării (Martinek și Berezin, 1977).

Și în cazul lipazelor imobilizate prin entrapare în geluri obținute pe bază de tetrametoxisilan și metiltrietoxisilan s-a observat o stabilitate termică mai mare decât pentru lipaza imobilizată prin simplă adsorbție (Reetz și colab., 1995; Kawakami și Yoshida 1994, 1995). Un alt studiu s-a referit la stabilitatea termică a lipazelor

imobilizate prin entrapare într-un gel hibrid format pe suprafața exterioară a particulelor unui adsorbant cum ar fi Celite. S-a urmărit influența tipului silanilor organici, raportul molar al acestora și cantitatea de gel formată pe suport în vederea obținerii celei mai termostabile lipaze immobilizate (Kawakami și Yoshida, 1996).

În acest studiu s-a urmărit comportarea unor enzime immobilizate prin metoda de entrapare combinată cu adsorbție în reacții de transesterificare, la diferite temperaturi. Reacția urmărită a fost acilarea 2-pentanolului cu acetat de vinil, în solvent organic la temperatura de 30°C, 40°C, 50°C, 60°C și 70°C. S-au ales două lipaze immobilizate din *Pseudomonas fluorescens* (AK) și două lipaze immobilizate BUTE-3b. Pentru compararea rezultatelor s-a făcut și o reacție cu fiecare enzimă liberă la cele cinci temperaturi. Modul de lucru este prezentat în capitolul 3.3.3. Rezultatele obținute în urma analizelor cromatografice sunt prezentate în Tabelele 52-57.

Tabelul 52. Acilarea 2-pentanolului cu acetat de vinil, catalizată de lipaza AK liberă

Temperatură (°C)	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare ($\mu\text{moli/h} \cdot \text{mg}_{\text{enz}}$)	ee	E
30	60.5	2.33	0.44	4.9
40	77	2.93	0.24	3.4
50	77	3.10	0.15	2.3
60	78	3.14	0.16	2.2
70	82	3.11	0.11	1.8

În cazul lipazei AK libere, randamentul în ester după 24h și activitatea de transesterificare cresc odată cu creșterea temperaturii în intervalul 30-70°C. Pe de altă parte, excesul enantiomeric și factorul enantiomeric scad în mod pronunțat, deoarece și viteza de reacție a izomerului mai puțin reactiv este mai mare la temperatură mai ridicată (Tab.52). Excesul enantiomeric este de 4 ori mai mic la 70°C decât la 30°C.

În cazul lipazelor AK immobilizate prin metoda combinată se observă aceeași tendință de creștere a randamentului în ester și activității de transesterificare, asociată cu scăderea excesului enantiomeric și selectivității (Tabelele 53 și 54). Creșterea de activitate este însă mai importantă, iar scăderea excesului enantiomeric mai puțin pronunțată decât în cazul enzimei libere, mai ales dacă pentru obținerea sol-gelului s-a utilizat MTEOS. În cazul acestui preparat, activitatea a crescut de 2.5 ori iar excesul enantiomeric s-a redus doar de 1.4 ori în intervalul de temperatură 30-70°C.

Tabelul 53. Acilarea 2-pentanolului catalizată de lipaza AK₂₂ immobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție (metoda 21, raport molar MTEOS:TEOS = 5:1)

Temperatură (°C)	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare ($\mu\text{moli/h} \cdot \text{mg}_{\text{enz}}$)	Rand. regăsire (%)	ee	E
30	19	0.074	31	0.63	5.1
40	23	0.088	30	0.60	4.7
50	37	0.138	44	0.52	4.2
60	40	0.156	49	0.48	3.9
70	47	0.186	59	0.45	3.8

Tabelul 54. Acilarea 2-pentanolului cu acetat de vinil, catalizată de lipaza AK₂₄ imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție (metoda 21 de imobilizare, raport molar PhTEOS:TEOS = 1:1)

Temperatură (°C)	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare (μmoli/h · mg _{enz})	Rand. regăsire (%)	ee	E
30	46	0.182	83	0.57	5.8
40	56	0.212	77	0.48	5.1
50	60	0.222	76	0.36	3.5
60	63	0.242	82	0.36	3.8
70	62	0.247	84	0.25	2.4

Pentru a ilustra aceste afirmații, s-a reprezentat grafic dependența factorului enantiomeric și excesului enantiomeric de temperatură (Figurile 46, 47).

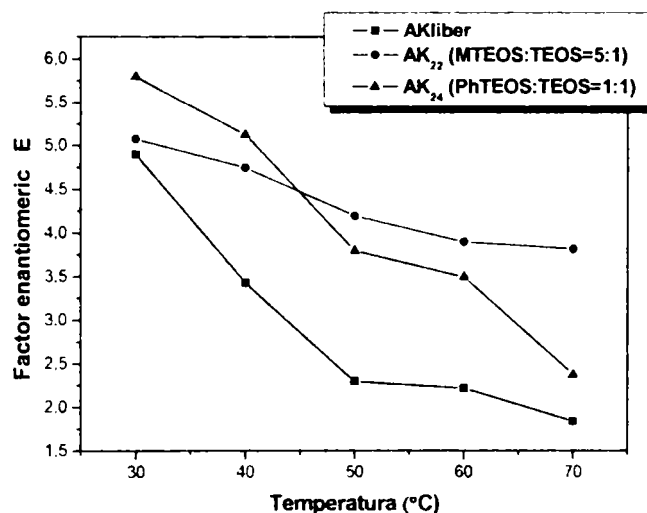


Figura 46. Dependența factorului enantiomeric de temperatură în reacțiile de acilare catalizate de lipaza AK liberă și imobilizată

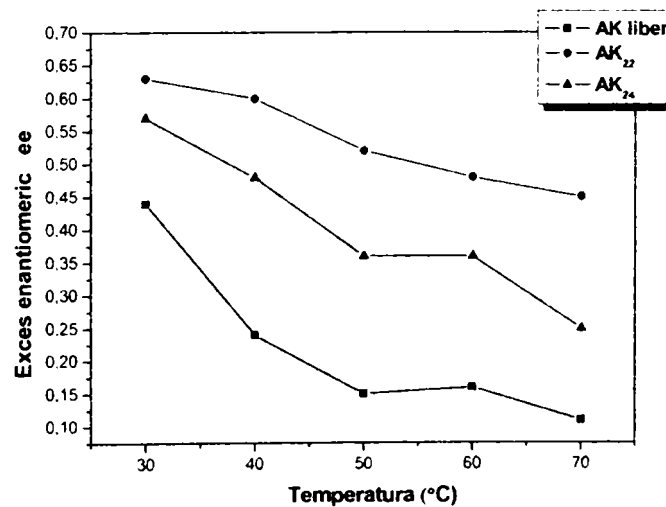


Figura 47. Dependența excesului enantiomeric de temperatură în reacțiile de acilare catalizate de lipaza AK liberă și imobilizată

Se poate observa scăderea selectivității și excesului enantiomeric la creșterea temperaturii, mult mai pronunțată la enzima liberă decât la enzima imobilizată. Scăderea cea mai lentă se înregistrează la lipaza AK imobilizată prin metoda combinată unde raportul molar al silanilor precursori a fost de MTEOS:TEOS = 5:1, deci acest preparat are cea mai mare termostabilitate.

Același studiu a fost efectuat și pentru lipaza BUTE-3b. De data aceasta însă activitatea de transesterificare crește doar până la 60°C, apoi scade pronunțat, probabil datorită denaturării termice a enzimei, care este mai termosensibilă decât lipaza AK (Tabelul 55). Excesul enantiomeric și selectivitatea arată o scădere destul de importantă la creșterea temperaturii.

Tabelul 55. Acilarea 2-pentanolului cu acetat de vinil, catalizată de lipaza BUTE-3b liberă, la diferite temperaturi

Temperatură (°C)	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare ($\mu\text{moli/h} \cdot \text{mg}_{\text{enz}}$)	ee	E
30	43	1.646	0.90	38.6
40	46	1.811	0.88	35.2
50	50	1.955	0.81	23.4
60	51	2.020	0.75	16.4
70	34	1.284	0.74	13.4

În cazul enzimelor imobilizate, s-a înregistrat de asemenea tendința de creștere a activității de transesterificare, dar pe tot domeniul de temperatură studiat, creșterea activității fiind de peste 2 ori la ambele preparate în intervalul 30-70°C (Tabelele 56 și 57). Așadar imobilizarea previne denaturarea termică a enzimei la 70°C. În ce privește enantioselectivitatea, aceasta scade și la enzimele imobilizate, dar mai puțin decât la enzima liberă. Acest lucru se observă mai bine în Figurile 48 și 49 în care s-a reprezentat grafic dependența factorului enantiomeric de temperatură, respectiv excesul enantiomeric de temperatură pentru aceste preparate. Este interesant că ele arată pe intervalul de temperatură 30-40°C chiar o ușoară creștere a valorii ee și factorului enantiomeric și abia după aceea urmează scăderea acestor valori.

Tabelul 56. Acilarea 2-pentanolului cu acetat de vinil, catalizată de lipaza BUTE-3b₁ imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție, raport molar MTEOS:TEOS=5:1, la diverse temperaturi

Temperatură (°C)	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare ($\mu\text{moli/h} \cdot \text{mg}_{\text{enz}}$)	Rand. regăsire (%)	ee	E
30	11	0.042	25	0.88	17.4
40	24	0.102	55	0.90	24.7
50	21	0.080	40	0.86	16.6
60	24	0.093	45	0.85	16.0
70	26	0.099	76	0.80	11.8

Tabelul 57. Acilarea 2-pentanolului cu acetat de vinil, catalizată de lipaza BUTE-3b₆ imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție, raport molar PhTEOS:TEOS=1:1, la diferite temperaturi

Temperatură (°C)	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare (μmoli/h·mg _{enz})	Rand. regăsire (%)	ee	E
30	9	0.034	18	0.92	26.2
40	14	0.053	25	0.92	27.8
50	14	0.053	23	0.89	19.8
60	15	0.056	24	0.87	16.6
70	17	0.068	45	0.85	14.6

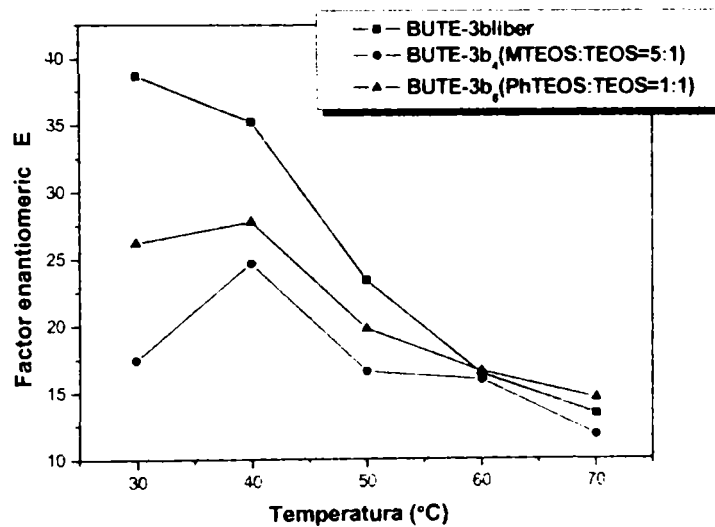


Figura 48. Dependența factorului enantiomeric de temperatură în reacțiile de acilare catalizate de lipaza BUTE-3b liberă și imobilizată

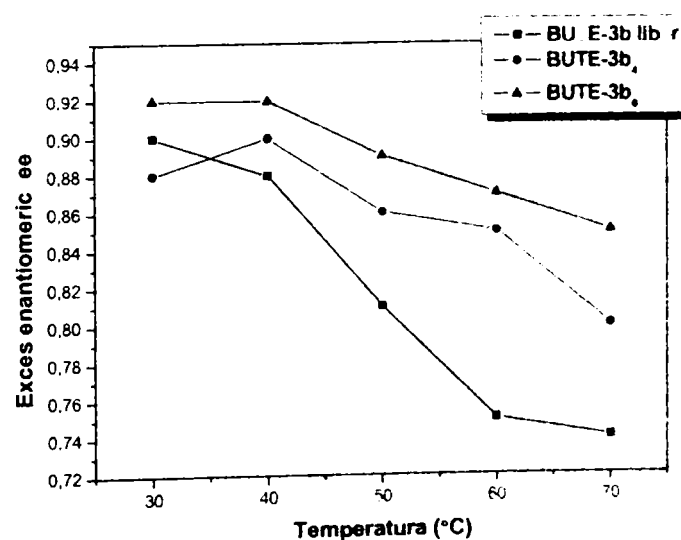


Figura 49. Dependența excesului enantiomeric de temperatură în reacțiile de acilare catalizate de lipaza BUTE-3b liberă și imobilizată

Pe ansamblu, se poate considera că imobilizarea prin metoda de entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție determină creșterea activității de transesterificare la creșterea temperaturii în măsură mai mare decât în cazul enzimei libere, în timp ce scăderea enantioselectivității este mai puțin pronunțată decât cea înregistrată pentru enzima liberă. Se poate alege o valoare optimă a temperaturii la care performanțele enzimei să fie cele mai bune. Această temperatură este 50°C în cazul lipazei AK imobilizate folosind un raport MTEOS/TEOS de 5:1 și 40°C în cazul lipazei BUTE-3b imobilizate folosind un raport PhTEOS/TEOS de 1:1.

2.2.3.6. Studiul reutilizării unor enzime imobilizate prin metoda entrapării combinată cu adsorbția în reacții de acilare a 2-pentanolului

Una dintre cele mai importante argumente în favoarea imobilizării enzimelor este posibilitatea reutilizării lor, care permite creșterea considerabilă a productivității, exprimate prin cantitatea de produs raportată la 1 kg enzimă consumată. În general se consideră că enzima poate fi reutilizată pînă când activitatea sa scade la mai puțin de 25% din cea inițială. Acest aspect este esențial mai ales în cazul enzimelor care au preț ridicat, fiind în majoritatea cazurilor determinant pentru utilizarea industrială a enzimei respective.

Pentru majoritatea enzimelor imobilizate prin diferite metode au fost efectuate și studii de reutilizare. Astfel, Reetz și colaboratorii au făcut un set de experimente de reciclare a unei lipaze din *Candida antarctica* (CALB) imobilizată prin entrapare în sol-gel și nu au constatat pierderi de activitate sau enantioselectivitate în cele 5 cicluri de utilizare a enzimei (Reetz și colab., 2003).

În acest studiu s-a urmărit dependența unor parametri ca randamentul de ester, excesul enantiomeric, factorul enantiomeric, activitatea de transesterificare și randamentul de regăsire a activității în funcție de numărul de reutilizări pentru reacțiile de acilare a 2-pentanolului catalizate de lipaze imobilizate prin metoda sol-gel. Pentru studiu s-au ales lipazele din *Pseudomonas fluorescens* (AK₂₄), și BUTE-3b (3b₈). Metoda de imobilizare a fost entrapare combinată cu adsorbție (Metoda 21 și Metoda 23). S-a făcut și un studiu de reutilizare a enzimei libere AK din *Pseudomonas fluorescens*, deoarece folosindu-se un mediu de reacție organic enzima se găsește în suspensie și poate fi recuperată prin filtrare la terminarea reacției. În cazul enzimei BUTE-3b fiind vorba de o enzimă nouă și nu de una comercială, cantitatea disponibilă nu a fost suficientă pentru a se putea face și un studiu de reutilizare al enzimei libere.

Reacția de acilare a 2-pentanolului cu acetat de vinil s-a desfășurat în hexan, la temperatura de 40°C, iar modul de lucru este cel prezentat la capitolul 3.3.3. Întrucât nu este posibilă recuperarea întregii cantități de enzimă, s-a recalculat rețeta de lucru în funcție de cantitatea de enzimă recuperată astfel încât raportul molar între reactanți să rămână același. Rezultatele s-au calculat pe baza analizelor gaz-cromatografice și sunt prezentate în Tabelele 58-60.

În cazul lipazei libere (Tabelul 58) activitatea de transesterificare scade pronunțat chiar de la prima reutilizare, în timp ce excesul enantiomeric și enantioselectivitatea exprimată prin indicele E cresc. Această creștere oarecum surprinzătoare poate fi explicată prin faptul că scăzând activitatea enzimei, adică viteza de transformare a substratului și fiind vorba de rezoluție cinetică diferența dintre vitezele cu care sunt transformați cei doi enantiomeri se poate accentua.

Tabelul 58. Reutilizarea lipazei AK libere

Număr reutilizare	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare		ee	E
		($\mu\text{moli/h mg}_{enz}$)	relativă		
0	41	3.15	1	0.49	4.0
1	21	1.58	0.50	0.65	5.6
2	15	1.16	0.37	0.60	4.4
3	9	0.73	0.23	0.56	3.7

Aceeași tendință de creștere a excesului enantiomeric și a factorului enantiomeric la reutilizarea enzimei se poate observa și în cazul lipazei AK imobilizate prin entrapare combinată cu adsorbție (Tabelul 59). Lipaza BUTE-3b are o enantioselectivitate foarte ridicată și ca atare ea nu mai crește în timpul reutilizărilor, doar se menține (Tabelul 60).

Tabelul 59. Reutilizarea lipazei AK₂₄ imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție (metoda 21 de imobilizare, raport molar PhTEOS:TEOS = 1:1)

Număr reutilizare	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare		Rand. regăsire (%)	ee	E
		($\mu\text{moli/h mg}_{enz}$)	relativă			
0	50	0.202	1	43	0.36	3.0
1	36	0.135	0.67	29	0.61	5.7
2	29	0.106	0.52	23	0.63	5.6
3	20	0.073	0.36	16	0.64	5.3
4	13	0.053	0.26	11	0.67	5.6
5	8	0.029	0.14	6	0.67	5.3

Tabelul 60. Reutilizarea lipazei BUTE-3b_x imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție (metoda 23 de imobilizare, raport molar PhTEOS:TEOS = 3:1)

Număr reutilizare	Rand. ester (%)	Activitate de transesterificare		Rand. regăsire (%)	ee	E
		($\mu\text{moli/h mg}_{enz}$)	relativă			
0	21	0.080	1	34	0.89	21.6
1	14	0.054	0.67	23	0.90	21.9
2	11	0.040	0.50	17	0.90	21.1
3	7	0.029	0.36	12	0.90	20.4
4	6	0.022	0.28	10	0.90	20.1
5	4	0.017	0.21	7	0.90	19.8

În ce privește activitatea de transesterificare, ea scade destul de pronunțat chiar de la prima reutilizare, atât în cazul enzimei libere cât și a celei reutilizate. Cu toate acestea, enzima imobilizată a dat rezultate mai bune decât enzima liberă în cazul lipazei AK. Numărul de cicluri de reutilizare pentru care activitatea relativă se menține la peste 25% din activitatea inițială este de 4, în timp ce în cazul enzimei libere acest număr este de numai 2. În cazul lipazei BUTE-3b nu s-a putut face această comparație, însă comportarea enzimei imobilizate este similară, adică și aici

activitatea relativă se menține la peste 25% din cea inițială după 4 cicluri de reutilizare. Faptul că rezultatele la reutilizarea enzimei imobilizate nu sunt mai bune se poate explica prin faptul că reacțiile au fost efectuate cu agitare mecanică intensă și această agitare a afectat matricea enzimei imobilizate. Alte studii similare din literatură care au dat rezultate mai bune au fost efectuate folosind sisteme de agitare prin scuturare. Pe baza acestor rezultate se poate totuși afirma că imobilizarea prin metoda sol-gel combinată cu adsorbție dublează numărul de cicluri de reutilizare a enzimei în reacția de transesterificare studiată și productivitatea enzimei.

3. PARTEA EXPERIMENTALĂ

3.1. METODE DE IMOBILIZARE A ENZIMELOR

Utilizarea lipazelor în aplicațiile comerciale ca biocatalizatori în sintezele organice, necesită investigarea metodelor simple dar eficiente de imobilizare a enzimelor, obținându-se în acest fel biocatalizatori cu o înaltă stabilitate și activitate, ușor de recuperat. De asemenea lipazele imobilizate pot constitui o materie primă importantă pentru preparatele enzimatiche farmaceutice (Popoviciu și colab., 1996). Există o varietate mare de metode de imobilizare care au fost aplicate lipazelor, printre care amintim adsorbție pe un suport solid, legarea covalentă sau entraparea în polimeri. În general tehnicile de adsorbție sunt ușor de realizat, dar legătura cu enzima este slabă astfel biocatalizatorii sunt instabili, dezavantaj care poate fi remediat prin imobilizarea enzimei prin entrapare sau prin legare covalentă. Pe de altă parte tehnicile de imobilizare prin legare covalentă sunt deseori lungi și uneori necesită etape chimice. În ultima perioadă un interes deosebit s-a acordat tehnicilor de entrapare a enzimelor în geluri de silice. Această tehnică presupune transformarea sol-gelului într-o matrice de silice formată prin hidroliza acidă sau bazică a unor compuși silanici hidrolizabili cum ar fi tetraetoxisilan (TEOS), metiltrietoxisilan (MTEOS), etiltrietoxisilan (EtTEOS), feniltrietoxisilan (PhTEOS) etc. Un procedeu tipic de imobilizare prin entrapare în sol-gel presupune: o soluție apoasă a lipazei, un catalizator, un aditiv și derivați alcoxisilanici ca precursori de gel (Reetz și colab., 1996).

O metodă nouă de imobilizare care combină avantajele a două din metodele de imobilizare amintite și anume adsorbția și entraparea în sol-gel, presupune formarea gelului în care este entrapată lipaza, pe suprafața unui adsorbent cum ar fi Celite, un material pe bază de pământ de diatomee. Prin această metodă combinată se poate obține îmbunătățirea unor proprietăți ale biocatalizatorului, cum ar fi activitatea în reacții de esterificare (Kawakami și Yoshida, 1996).

S-au studiat trei tipuri de imobilizare a lipazelor: entraparea în sol-gel, adsorbția și metoda nouă – entrapare combinată cu adsorbție.

Materiale

În studiile de imobilizare și în reacții s-au utilizat următoarele enzime: lipaza comercială din *Candida cylindracea* (Cc) de la Sigma Chemical Co.(USA), lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) și lipaza din *Pseudomonas cepacia* (PS) de la Amano Enzyme Inc. Japonia, lipază microbiană BUTE-3b, obținută din fungii termofile la Universitatea Tehnică și Economică din Budapesta și lipază din *Mucor miehei* Lipozyme™ (NOVO). Lipaza din pancreas de porc a fost obținută și purificată în laborator (Peter și colab., 1995).

Pentru imobilizare s-au utilizat: tetraetoxisilan (TEOS) 98% (Fluka), metiltrietoxisilan (MTEOS) (Aldrich), etiltrietoxisilan (EtTEOS) (Aldrich), feniltrietoxisilan (PhTEOS) (Aldrich), alcool etilic absolut 99.2% (Chimopar), alcool izopropilic 99.7% (Chimopar), acid clorhidric 1M (Chimopar), polietilenglicol (PEG, M=8000 și M=20000, Fluka), fluorură de sodiu (Fluka), Celite 545 (Loba Chemie), carbonat de calciu (Loba Chemie), amoniac soluție 25% (Chimopar). Soluțiile tampon de diferite valori ale pH-ului au fost obținute în laborator din reactivi chimici puri.

3.1.1. Imobilizarea prin adsorbție

3.1.1.1. Imobilizarea prin adsorbție a lipazei pancreatice (PPL)

A. Imobilizarea PPL pe carbonat de calciu la diferite valori de pH

Imobilizarea lipazei pancreatice la pH=7.0.

Metoda 1

1 g lipază pancreatică s-a ampastat cu 10 ml tampon TRIS-HCl de pH=7.0. Soluția rezultată s-a centrifugat timp de 10 minute la o turație de 3500 rot./min. Din supernatantul obținut s-au luat 5 ml soluție de lipază, care s-au picurat peste o suspensie de 1 g carbonat de calciu în 5 ml tampon TRIS-HCl de pH=7.0. Amestecul s-a menținut sub agitare magnetică timp de 1h la temperatura camerei, după care s-au adăugat 20 ml de acetonă răcită la -15°C. Preparatul astfel obținut s-a filtrat pe pânză Büchner, apoi s-a spălat cu încă 20 ml acetonă răcită la -15°C în două porțiuni. Preparatul enzimatic imobilizat s-a uscat pe filtru apoi în exicator. S-au obținut 1089.7 mg enzimă imobilizată notată PPL₁.

Imobilizarea lipazei pancreatice la pH=8.0.

Metoda 2

S-a lucrat conform metodei 1, folosindu-se tampon TRIS-HCl de pH=8.0. S-au obținut 1059.1 mg enzimă imobilizată notată PPL₂.

Imobilizarea lipazei pancreatice la pH=9.0.

Metoda 3

S-a lucrat conform metodei 1, folosindu-se tampon TRIS-HCl de pH=9.0. S-au obținut 1065.6 mg enzimă imobilizată notată PPL₃.

B. Imobilizarea PPL prin adsorbție pe Celite în diferite condiții

Imobilizarea PPL la pH=7.0

Metoda 4

0.5032 g lipază s-au ampastat cu 5 ml soluție tampon fosfat 0.2 M de pH=7.0. Soluția obținută s-a picurat într-o suspensie de 1g Celite în 5 ml tampon fosfat 0.2 M de pH=7.0, sub agitare magnetică. Amestecul s-a menținut sub agitare timp de 1 h la temperatura camerei, după care s-au adăugat în picături 20 ml de acetonă răcită la -15°C. Suspensia obținută s-a filtrat pe o pânză Büchner sub vid iar preparatul enzimatic s-a spălat pe filtru cu încă 20 ml acetonă răcită la -15°C în două porțiuni. Preparatul enzimatic s-a uscat pe filtru, apoi o zi în exicator. S-au obținut 1300 mg lipază imobilizată notată PPL₄.

Imobilizarea PPL la pH=8.0

Metoda 5

Într-un pahar Berzelius s-au ampastat 150 mg enzimă cu 3 ml soluție tampon TRIS-HCl de pH=8.0 apoi s-au adăugat sub agitare 1 g Celite. S-a omogenizat totul 1h pe agitatorul magnetic apoi s-a lăsat la uscat la temperatura camerei. S-au obținut 1127.8 mg lipază imobilizată notată PPL₅.

Imobilizarea PPL la pH=8.0 și precipitare cu acetonă

Metoda 6

Într-un pahar Berzelius s-au ampastat 150 mg enzimă cu 3 ml soluție tampon TRIS-HCl, pH=8.0 apoi s-au adăugat sub agitare 1 g Celite. Amestecul s-a omogenizat timp de 1 h pe agitatorul magnetic, apoi s-au adăugat sub agitare magnetică 20 ml acetonă răcită la -15°C. Enzima imobilizată precipitată s-a filtrat pe frită, s-a spălat cu încă 20 ml acetonă răcită la -15°C apoi s-a lăsat la uscat la temperatura camerei. S-au obținut 1028.4 mg lipază imobilizată notată PPL₆.

Imobilizarea PPL la pH=8.0 și cu adaos de zahăr

Metoda 7

S-a preparat o soluție de lipază PPL 100 mg/ 1ml tampon TRIS-HCl de pH=8.0, soluția rezultată a fost filtrată, iar filtratul a fost folosit în continuare pentru imobilizare.

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 0.06 g zahăr, 1 ml soluție de lipază PPL, 0.4 ml tampon TRIS-HCl de pH=8.0 și 2 ml apă distilată. Amestecul s-a omogenizat prin agitare magnetică, după care s-au adăugat 0.34 g Celite continuându-se agitarea încă aproximativ 2 h. Amestecul omogen obținut se golește într-o cutie Petri, și se păstrează o zi la temperatura camerei apoi o zi în exicator. S-au obținut 505.5 mg enzimă imobilizată notată PPL₇.

3.1.1.2. Imobilizarea prin adsorbție pe Celite a lipazei din *Pseudomonas fluorescens* (AK)

Metoda 8

S-a preparat o soluție enzimatică prin ampastarea a 150 mg lipază AK cu 4 ml tampon TRIS-HCl 0.1M de pH = 8.0. S-au adăugat sub agitare continuă 1 g Celite 545. Agitarea s-a menținut timp de 1 h, după care s-au adăugat în picături, tot sub agitare 20 ml acetonă răcită la -15°C. Enzima imobilizată precipitată s-a filtrat pe frită, s-a mai spălat cu 20 ml acetonă răcită la -15°C în două porțiuni, apoi s-a păstrat la temperatura camerei pentru uscare. S-au obținut 1479.3 mg lipază imobilizată notată AK₁.

3.1.1.3. Imobilizarea prin adsorbție pe Celite a lipazei BUTE-3b

Metoda 9

S-a lucrat conform Metodei 8, cu deosebirea că s-au folosit 150 mg lipază BUTE-3b. S-au obținut 1081.5 mg lipază imobilizată notată BUTE-3b₁.

3.1.2. Imobilizarea prin entrapare în sol-gel

3.1.2.1. Imobilizarea prin entrapare a lipazei din *Candida cylindracea* (Cc)

A. Imobilizarea prin entrapare a lipazei Cc cu sol preformat

Metoda 10

Se prepară un sol prepolimer după o rețetă modificată publicată de Preda și colab., 2002, prin amestecarea timp de 4 h pe un agitator magnetic a 8 ml amestec de

precursori silanici în diferite rapoarte molare, 8 ml alcool etilic, 6.5 ml apă distilată, 0.1 ml acid clorhidric 1 M. Solul apos a fost ținut în frigider 24 h sau mai mult.

Obținerea gelului și imobilizarea enzimei: Într-o fiolă s-au introdus 2 ml sol, 2.5 ml alcool etilic sau alcool i-propilic, 1 ml apă distilată sau 1 ml soluție PEG 4% (agent de stabilizare). După omogenizarea amestecului pe agitatorul magnetic s-a adăugat soluția de lipază obținută prin ampastarea a 25 mg lipază Cc cu 1.5 ml tampon TRIS-HCl de pH=8.0 și 100 μl NH₃ (catalizator). Gelul umed obținut a fost păstrat în frigider 24 h pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost spălat cu 15 ml alcool i-propilic, s-a filtrat pe frită și s-a mai spălat cu 5 ml tampon TRIS-HCl de pH=8.0, 10 ml apă distilată, 10 ml alcool i-propilic și 10 ml n-hexan. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei timp de câteva zile, iar filtratul s-a folosit pentru determinarea proteinelor. Raportul molar apă : silani = 40 : 1. S-a lucrat cu două loturi diferite de lipază din *Candida cylindracea* notate în teză cu Cc^I și Cc^{II}. S-au obținut:

- 332.5 mg enzimă imobilizată notată Cc^{II}₁ (alcool etilic, fără PEG)
- 317.1 mg enzimă imobilizată notată Cc^{II}₃ (alcool i-propilic, fără PEG)
- 383 mg enzimă imobilizată notată Cc^{II}₄ (alcool i-propilic, PEG cu M=8000)
- 293.5 mg enzimă imobilizată notată Cc^I₂ (2.5 ml sol, alcool etilic, fără PEG)
- 287.8 mg enzimă imobilizată notată Cc^I₅ (2.5 ml sol, alcool i-propilic, fără PEG)
- 334.8 mg enzimă imobilizată notată Cc^I₆ (2.5 ml sol, alcool i-propilic, PEG cu M=8000)

Metoda 11

Se prepară un sol prepolimer prin amestecarea timp de 4 h pe un agitator magnetic a 8 ml amestec de precursori silanici în diferite rapoarte molare, 8 ml alcool etilic, 3.25 ml apă distilată, 0.1 ml acid clorhidric 1M. Solul apos a fost ținut în frigider 24 h sau mai mult.

Obținerea gelului și imobilizarea enzimei: Într-o fiolă s-au introdus 780 μl soluție enzimatică (100 mg/ml în tampon TRIS-HCl de pH=8.0), 200 μl PEG 4% cu M=20000 (agent de stabilizare), 100 μl NaF 1M sau 100 μl NH₃ (catalizator), 200 μl alcool i-propilic. După o scurtă omogenizare pe agitatorul magnetic s-au adăugat 2ml de sol prepolimer și s-a continuat agitarea până la gelificare, după care gelul umed s-a lăsat la maturare la temperatura camerei până a doua zi. Gelul întărit a fost spălat cu 15 ml alcool i-propilic, s-a filtrat pe frită apoi s-a mai spălat cu 10 ml apă distilată, 10 ml alcool i-propilic și 10 ml n-hexan. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei timp de câteva zile, iar filtratul s-a folosit pentru determinarea proteinelor. S-au obținut:

- 433.2 mg enzimă imobilizată notată Cc^I₇ (catalizator NaF)
- 432.5 mg enzimă imobilizată notată Cc^I₈ (catalizator NaF)
- 487.3 mg enzimă imobilizată notată Cc^I₉ (catalizator NH₃)
- 774.1 mg enzimă imobilizată notată Cc^I₁₀ (catalizator NaF)
- 274.1 mg enzimă imobilizată notată Cc^I₁₆ (catalizator NH₃)
- 494.1 mg enzimă imobilizată notată Cc^I₁₇ (catalizator NH₃)

B. Imobilizarea prin entrapare a lipazei Cc cu sol prepolimer obținut *in situ*

Metoda 12

Într-o fiolă s-au introdus 780 μl soluție enzimatică Cc (100mg/ml în tampon TRIS-HCl de pH=8.0), 200 μl PEG 4% cu M=20000, 100 μl NaF 1M și 200 μl alcool

i-propilic. Amestecul s-a omogenizat pe agitatorul magnetic, după care s-au introdus precursorii silanici în diferite rapoarte molare (total 6mmoli silani) continuând agitarea până la gelifiere. Gelul umed obținut a fost păstrat la temperatura camerei sau în frigider 24 h sau mai mult. Gelul întărit a fost prelucrat conform metodei 11. Prin această metodă de imobilizare s-au obținut:

- 138.1 mg enzimă imobilizată notată Cc¹₁₁
- 97.7 mg enzimă imobilizată notată Cc¹₁₂
- 398.1 mg enzimă imobilizată notată Cc¹₁₃
- 408 mg enzimă imobilizată notată Cc¹₁₄
- 169.8 mg enzimă imobilizată notată Cc¹₁₅

3.1.2.2. Imobilizarea prin entrapare a lipazei pancreatice (PPL)

A. Imobilizarea prin entrapare a PPL cu sol prepolimer obținut *in situ*

Metoda 13

S-a preparat o soluție de lipază PPL 100 mg/ml în tampon TRIS-HCl de pH=8.0, soluția rezultată a fost filtrată, iar filtratul a fost folosit pentru imobilizare. Într-o fiolă de sticlă s-au introdus 780 μl filtrat, 200 μl soluție PEG 4% cu M=20000, 100 μl soluție NaF 1M și 200 μl alcool i-propilic. Amestecul s-a omogenizat pe agitatorul magnetic, după care s-au introdus precursorii silanici în rapoarte molare variabile (total 6 mmoli silani) continuând agitarea până la gelifiere. Gelul umed obținut a fost păstrat la temperatura camerei sau în frigider timp de o zi sau mai mult. Gelul întărit a fost spălat cu 15 ml alcool i-propilic sau cu 5 ml tampon TRIS-HCl de pH=8.0, 10 ml apă distilată, s-a filtrat pe frită și s-a mai spălat cu 10 ml alcool i-propilic și 10 ml n-hexan. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei timp de câteva zile, iar filtratul s-a folosit pentru determinarea proteinelor. S-au obținut prin această metodă :

- 296.6 mg enzimă imobilizată notată PPL₈
- 73.4 mg enzimă imobilizată notată PPL₉
- 103.6 mg enzimă imobilizată notată PPL₁₀
- 167 mg enzimă imobilizată notată PPL₁₁
- 406.6 mg enzimă imobilizată notată PPL₁₂
- 381.8 mg enzimă imobilizată notată PPL₁₃
- 381.2 mg enzimă imobilizată notată PPL₂₈

3.1.2.3. Imobilizarea prin entrapare a lipazei din *Pseudomonas fluorescens* (AK)

A. Imobilizarea prin entrapare a lipazei AK cu sol preformat

Metoda 14

Se prepară un sol prepolimer conform metodei 10.

Într-o fiolă s-au introdus 2.5 ml sol, 2.5 ml alcool etilic sau alcool i-propilic, 1 ml apă distilată. După omogenizarea amestecului pe agitatorul magnetic s-a adăugat soluția de lipază obținută prin ampastarea a 25 mg lipază AK cu 1.5 ml tampon TRIS-HCl de pH=8.0 și catalizatorul 100 μl NH₃. Gelul umed obținut a fost păstrat în frigider 24 h pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost prelucrat conform metodei 11. S-au obținut:

- 283 mg enzimă imobilizată notată AK₂ (alcool etilic)
- 288.5 mg enzimă imobilizată notată AK₃ (alcool etilic)

- 311 mg enzimă imobilizată notată AK₄ (alcool i-propilic)
- 297.5 mg enzimă imobilizată notată AK₅ (alcool i-propilic)

Metoda 15

Se prepară un sol prepolimer conform metodei 10.

Într-o fiolă s-au introdus 50 mg lipază AK, 390 µl tampon TRIS-HCl de pH=8.0 care s-au omogenizat prin agitare magnetică după care s-au adăugat 100 µl PEG 4% M=20000, 50 µl NaF 1M, 100 µl alcool i-propilic. Sub agitare s-au adăugat 3mmoli silani precursori și s-a continuat agitarea până la gelifiere. În continuare gelul a fost prelucrat conform metodei 11. S-au obținut 248.8 mg enzimă imobilizată notată AK₆.

Metoda 16

Conform cercetărilor anterioare făcute cu enzime proteolitice (Preda și colab., 2002) se prepară un sol prepolimer prin amestecarea timp de 4 h pe un agitator magnetic a 8 ml TEOS, 8 ml alcool etilic, 6.5 ml apă distilată, 0.1 ml acid clorhidric 1 M. Solul apos a fost ținut în frigider 24 h sau mai mult.

Imobilizarea enzimei: 5 ml sol, 5 ml alcool etilic, 3.5 ml apă distilată, s-au omogenizat pe un agitator magnetic, după care s-au adăugat 100 µl NH₃ și soluția enzimatică obținută prin amestecarea a 25 mg sau 50 mg enzimă cu 1.5 ml tampon TRIS-HCl de pH=8.0. Gelul umed s-a păstrat la temperatura camerei 24 h pentru polimerizare completă. Gelul întărit s-a spălat cu 10 ml tampon TRIS-HCl de pH=8.0, s-a filtrat și s-a mai spălat cu 10 ml alcool i-propilic și 10 ml hexan. Preparatul obținut s-a uscat la temperatura camerei timp de trei zile. S-au obținut:

- 517.6 mg enzimă imobilizată notată AK₇ (25 mg enzimă, sol de 24 h)
- 634.4 mg enzimă imobilizată notată AK₈ (50 mg enzimă, sol de 24 h)
- 680.6 mg enzimă imobilizată notată AK₉ (25 mg enzimă, sol de 48 h)
- 423.9 mg enzimă imobilizată notată AK₁₀ (25 mg enzimă, sol de 168 h)

B. Imobilizarea prin entrapare a lipazei AK cu sol prepolimer obținut *in situ*

Metoda 17

Într-o fiolă s-au introdus 780µl soluție enzimatică AK (100 mg/ml în tampon TRIS-HCl de pH=8.0), 200µl PEG 4% cu M=20000, 100µl NaF 1M și 200µl alcool i-propilic. Amestecul s-a omogenizat pe agitatorul magnetic, după care s-au introdus precursorii silanici în diferite rapoarte molare (total 6 mmoli silani) continuând agitarea până la gelifiere. Gelul umed obținut a fost păstrat la temperatura camerei timp de 24 h pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost prelucrat conform metodei 11. Prin această metodă de imobilizare s-au obținut:

- 312.8 mg enzimă imobilizată notată AK₁₁
- 97.5 mg enzimă imobilizată notată AK₁₂
- 127.8 mg enzimă imobilizată notată AK₁₃
- 241.2 mg enzimă imobilizată notată AK₁₄
- 171.9 mg enzimă imobilizată notată AK₁₅
- 111.4 mg enzimă imobilizată notată AK₁₆
- 425.5 mg enzimă imobilizată notată AK₁₇
- 403.1 mg enzimă imobilizată notată AK₁₈
- 404.3 mg enzimă imobilizată notată AK₁₉
- 418.2 mg enzimă imobilizată notată AK₂₆
- 245.4 mg enzimă imobilizată notată AK₂₇

3.1.2.4. Imobilizarea prin entrapare a lipazei din *Pseudomonas cepacia* (PS)

A. Imobilizarea prin entrapare a lipazei PS cu sol prefărmă

Metoda 18

Se prepară un sol prepolimer conform metodei 15. Solul apos a fost ținut în frigider 24 h.

Prepararea soluției enzimatică: 4.5 mg zaharoză sau β -Ciclodextrină (18% față de cantitatea de enzimă) s-au dizolvat în 1.5 ml tampon TRIS-HCl de pH=8.0 și s-au ampastat cu 25 mg lipază PS.

Imobilizarea enzimei: 5 ml sol, 5 ml alcool etilic, 3.5 ml apă distilată, s-au omogenizat pe agitator magnetic, după care s-au adăugat 100 μ l NH_3 și soluția enzimatică. Gelul umed s-a păstrat la temperatura camerei 24 h pentru polimerizare completă. Gelul întărit s-a prelucrat în continuare conform metodei 15. S-a făcut și o imobilizare test care nu conține zaharuri. S-au obținut:

- 661.5 mg enzimă imobilizată notată PS₁ (cu Galactoză)
- 686.3 mg enzimă imobilizată notată PS₂ (cu Glucoză)
- 671.5 mg enzimă imobilizată notată PS₃ (cu Manoză)
- 676.7 mg enzimă imobilizată notată PS₄ (cu Lactoză)
- 675.3 mg enzimă imobilizată notată PS₅ (cu Xiloză)
- 372.7 mg enzimă imobilizată notată PS₆ (cu β -Ciclodextrină)
- 652.9 mg enzimă imobilizată notată PS₇ (test)

Metoda 19

S-a lucrat conform metodei 18 cu diferența ca s-au folosit diferite cantități de lipază PS (25 sau 50 mg) iar solul a fost ținut înainte de imobilizare 24 h, 48 h și 168 h. S-au obținut astfel:

- 665.1 mg enzimă imobilizată notată PS₈ (50 mg enzimă, sol de 24 h)
- 643.7 mg enzimă imobilizată notată PS₉ (25 mg enzimă, sol de 48 h)
- 570.2 mg enzimă imobilizată notată PS₁₀ (25 mg enzimă, sol de 168 h)

3.1.3. Imobilizarea prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție

3.1.3.1. Imobilizarea prin metoda combinată a lipazei pancreatice (PPL)

Metoda 20

S-a lucrat după o rețetă publicată de Kawakami și Yoshida, 1996, cu unele modificări. Solul prepolimer a fost obținut prin amestecarea într-o fiolă de sticlă de 4 ml a 6 mmoli precursori silanici în diferite rapoarte molare cu 0.4 ml apă distilată, 1 ml alcool etilic, 11 μ l HCl 0.04 M, timp de o oră pe un agitator magnetic. Solul apos obținut s-a trecut într-o fiolă de sticlă de 8 ml peste care s-au mai introdus sub agitare o soluție de 150 mg lipază PPL ampastată cu 2.2 ml tampon TRIS-HCl de pH=8.0 și 100 μ l soluție de NaF 1M sau 100 μ l NH_3 . În faza inițială de gelifiere s-a adăugat 1 g Celite. Gelul obținut a fost păstrat la temperatura camerei (sau în frigider), o zi sau mai multe zile, pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost spălat cu 15 ml n-hexan, după care s-a filtrat pe frită. Precipitatul obținut s-a uscat la temperatura camerei timp de câteva zile. S-au obținut:

- 1564.3 mg enzimă imobilizată notată PPL₁₄ (catalizator NH_3)
- 1551.3 mg enzimă imobilizată notată PPL₁₅ (catalizator NaF)

- 1557.9 mg enzimă imobilizată notată PPL₁₆ (catalizator NH₃)
- 1713.3 mg enzimă imobilizată notată PPL₁₇ (catalizator NaF)
- 1257.9 mg enzimă imobilizată notată PPL₁₈ (sol fără alcool etilic, fără catalizator, s-au mai adăugat 3 ml tampon TRIS-HCl de pH=8.0 înainte de adăugarea soluției enzimaticice)
- 1645.8 mg enzimă imobilizată notată PPL₁₉ (sol fără alcool etilic, fără catalizator, s-au mai adăugat 3 ml tampon TRIS-HCl de pH=8.0 înainte de adăugarea soluției enzimaticice)
- 1290.1mg enzimă imobilizată notată PPL₂₀ (sol fără alc.etic, cat. NH₃)
- 1307.3 mg enzimă imobilizată notată PPL₂₁ (sol fără alc.etic, cat. NH₃)
- 1407.2 mg enzimă imobilizată notată PPL₂₂ (sol fără alc.etic, cat. NH₃)
- 1234 mg enzimă imobilizată notată PPL₂₃ (sol fără alc.etic, cat. NH₃)
- 1297.6 mg enzimă imobilizată notată PPL₂₄ (sol fără alc.etic, cat. NH₃)
- 1447.9 mg enzimă imobilizată notată PPL₂₅ (sol fără alc.etic, cat. NaF)
- 1123.5 mg enzimă imobilizată notată PPL₂₆ (sol fără alc.etic, cat. NH₃)
- 1144.3 mg enzimă imobilizată notată PPL₂₇ (sol fără alc.etic, cat.NH₃)

3.1.3.2. Imobilizarea prin metoda combinată a lipazei din *Pseudomonas fluorescens* (AK)

Metoda 21

S-a lucrat după metoda 20 cu deosebirea că s-au folosit 150 mg lipază AK, iar catalizatorul a fost NaF. S-au obținut:

- 1588.2 mg enzimă imobilizată notată AK₂₀
- 1482.2 mg enzimă imobilizată notată AK₂₁
- 1482.2 mg enzimă imobilizată notată AK₂₂
- 1614.9 mg enzimă imobilizată notată AK₂₃
- 1594.4 mg enzimă imobilizată notată AK₂₄
- 1512.4 mg enzimă imobilizată notată AK₂₅

3.1.3.3. Imobilizare prin metoda combinată a lipazei BUTE-3b

Metoda 22

S-a lucrat după metoda 20 cu deosebirea că s-au folosit 150 mg lipază BUTE-3b, iar catalizatorul a fost NaF. S-au obținut:

- 1546.4 mg enzimă imobilizată notată BUTE-3b₂
- 1495.4 mg enzimă imobilizată notată BUTE-3b₃
- 1470.8 mg enzimă imobilizată notată BUTE-3b₄
- 1499.5 mg enzimă imobilizată notată BUTE-3b₅

Metoda 23

S-a lucrat după o metodă publicată de Reetz și colab., 2003, modificată. Într-o fiolă de sticlă s-a introdus soluția enzimatică obținută prin ampastarea 150 mg lipază BUTE-3b cu 2.2 ml tampon TRIS-HCl de pH=8.0, 1 ml alcool etilic și 100 μl catalizator NaF 1M. După omogenizare pe agitatorul magnetic s-au adăugat 6 mmoli silani în rapoarte molare variabile. În faza inițială a gelifierii s-au adăugat 1 g Celite. Gelul umed obținut s-a păstrat până a doua zi la temperatura camerei. Prelucrarea gelului s-a făcut conform metodei 20. S-au obținut:

- 1272.3 mg enzimă imobilizată notată BUTE-3b₆
- 1169.3 mg enzimă imobilizată notată BUTE-3b₇
- 1150.4 mg enzimă imobilizată notată BUTE-3b₈

Toate preparatele enzimaticice imobilizate obținute s-au păstrat în frigider.

3.2. METODE DE ANALIZĂ

3.2.1. Metoda Lowry de determinare a proteinelor

Principiul metodei

Dozarea proteinelor (domeniu 25-500 μ g) se bazează pe formarea unui complex cupric în urma reacției proteinei cu un reactiv alcalin de cupru (reacția biuretului) și pe reducerea fosfomolibdaților și fosfowolframaților din reactivul Folin-Ciocalteu de către compușii fenolici din proteină (în special tirozina) (Bergmeyer și colab., 1974).

Etalonarea soluției de BSA prin metoda Lowry.

Reactivi și soluții

- *Reactiv Folin-Ciocalteu.* Înainte de întrebuințare se diluează o parte reactiv și două părți apă distilată
- *Soluție alcalină A.* Se dizolvă 4 g NaOH, 10 g Na₂CO₃ și 0.2 g tartrat dublu de sodiu și potasiu în apa distilată și se aduce la semn într-un balon cotat de 1000 ml
- *Soluție B.* Soluție CuSO₄ 0.5 %
- *Reactiv alcalin de cupru.* Se prepară înainte de folosire amestecând 50ml soluție alcalină A cu 1 ml soluție B
- *Soluție etalon de albumină serică de bovină (BSA)* în apă distilată (1 mg/ml)

Trasarea caracteristicii de etalonare

În 10 eprubete s-au introdus cote parte din soluția etalon de BSA și apă distilată conform Tabelului 61. S-au adăugat în ordine 5 ml reactiv alcalin de cupru și 0.5 ml reactiv Folin-Ciocalteu. Probele s-au lăsat la temperatura camerei timp de 30 minute, apoi s-a citit extincția la o lungime de undă de 660 nm față de un martor obținut în aceleași condiții, dar cu înlocuirea soluției de BSA cu apă distilată. Pentru siguranța determinării s-au făcut două probe în paralel. Valorile medii ale extincției s-au trecut în Tabelul 61.

Tabelul 61. Etalonarea soluției de BSA prin metoda Lowry

Nr. crt.	Sol. BSA (ml)	Apa distilată (ml)	E	Cantitate proteină (mg)
1(martor)	-	0.2		0
2.	0.02	0.18	0.0546	0.02
3.	0.04	0.16	0.0999	0.04
4.	0.06	0.14	0.1511	0.06
5.	0.10	0.10	0.2429	0.10
6.	0.12	0.08	0.2788	0.12
7.	0.14	0.06	0.2955	0.14
8.	0.16	0.04	0.3393	0.16
9.	0.18	0.02	0.3628	0.18

Reprezentarea grafică a extincției funcție de cantitatea de proteină este o dreaptă cu ecuația:

$$E = b \cdot C_p$$

unde:

E = extincția

b = panta dreptei

C_p = cantitatea de proteină (mg)

Obs. : parametrul a din ecuația dreptei, având valoare foarte mică se neglijează

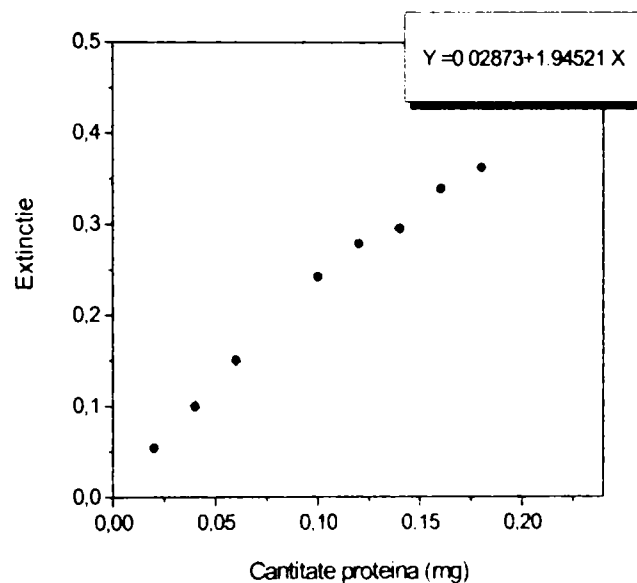


Figura 50. Caracteristica de etalonare a soluției de BSA prin metoda Lowry

Pentru determinarea conținutului în proteine a unei soluții necunoscute s-a procedat astfel: s-au amestecat 1 ml probă, 5 ml reactiv alcalin de cupru și 0.5 ml reactiv Folin. În paralel s-a făcut și o probă martor unde în loc de soluție necunoscută s-a pus 1ml apă distilată. Probele s-au lăsat 30 de minute la temperatura camerei apoi s-a citit extincția la 660 nm față de martor.

Cantitatea de proteine din probă s-a determinat cu formula:

$$C = 1/b \cdot E \cdot F \text{ (mg proteine/ml)}$$

F este factorul de diluție al soluției enzimatic

Materiale

Pentru determinarea conținutului de proteine s-au utilizat: ulei de măsline comercial, gumă arabică (Serva), albumina din ser de bovină BSA (Reanal). Restul reactivilor utilizați au fost achiziționați de la Chimopar, București. Soluțiile tampon au fost obținute în laborator din reactivi chimici puri.

Determinările în UV-VIS s-au efectuat cu ajutorul unui spectrofotometru Specord M-40 (Carl Zeiss Jena, Germania).

3.2.2. Analiza cantitativă prin cromatografie de gaze

Determinarea concentrației componentelor unui amestec analizat se poate face prin mai multe metode, printre care amintim metoda normării ariilor, metoda calibrării răspunsului detectorului, metoda standardului extern, metoda standardului intern. În această lucrare pentru analiza cantitativă s-a utilizat metoda standardului intern considerată ca fiind cea mai exactă. Ea constă în adăugarea unui compus standard în cantitate cunoscută în amestecul de analizat, iar determinarea cantitativă se face prin raportare la acest standard. Metoda are avantajul că nu este necesară cunoașterea exactă a cantității de probă injectată și că mici modificări ale condițiilor de analiză care afectează aria picului nu vor duce la rezultate eronate, ele influențând în măsură egală picul componentei și al standardului.

Analizele cromatografice s-au efectuat pe un cromatograf de gaze DANI GC 86.10 echipat cu detector cu ionizare în flacără. S-a utilizat o coloană capilară cu dimensiunile 15m x 0.32 mm, faza staționară BPX- 5 chimic legată (SGE Australia).

Condiții de analiză pentru probe:

- Temperatură injector: 300°C
- Temperatură detector: 350°C
- Gaz purtător - azot cu debitul 1.47 ml/min
- Programul de temperatură a fost diferit pentru fiecare compus etalon și a fost ales astfel încât să se obțină o separare completă a tuturor componentelor din amestec într-un timp optim de analiză.

Mod de lucru general

În cinci fiole cromatografice s-au cântărit cu exactitate volume diferite de compus etalon, o cantitate fixă de standard intern și solvent. Cantitățile de compus etalon și standard au fost alese astfel încât concentrațiile lor și raportul acestora să se înscrie în domeniul reacției urmărite. Probele au fost analizate gaz-cromatografic, fiecare injectându-se de 3-4 ori pentru eliminarea erorilor de măsură. În calcul s-a luat media determinărilor ariilor respective.

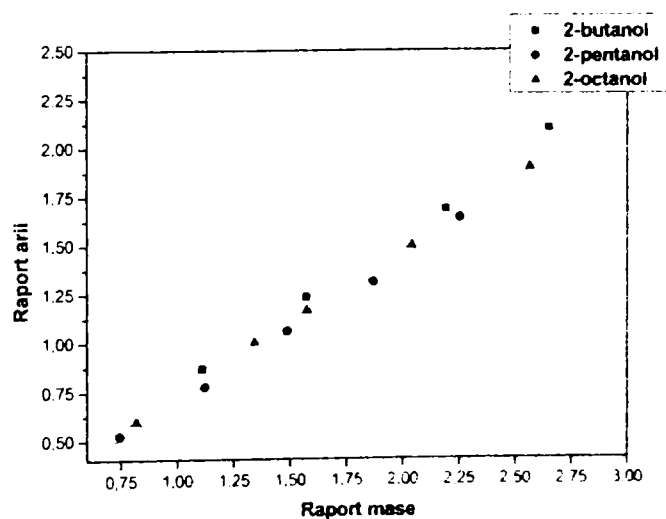


Figura 51. Caracteristica de etalonare a alcoolilor

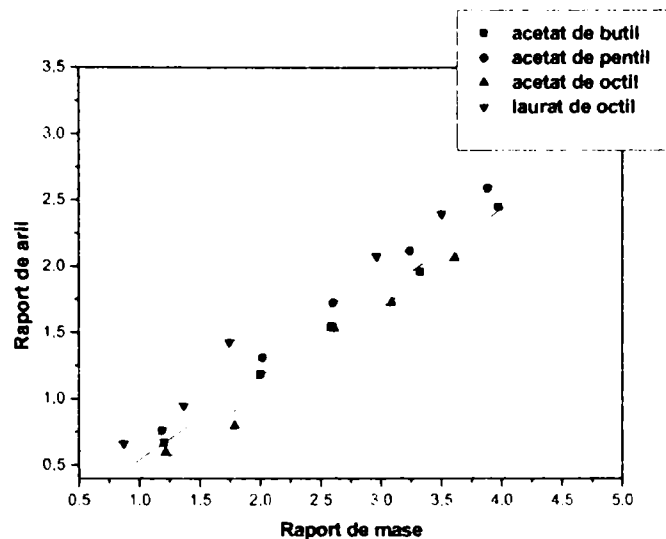


Figura 52. Caracteristica de etalonare a esterilor

În Figurile 51 și 52 se observă reprezentarea grafică a variației raportului ariilor în funcție de raportul maselor pentru etalonarea alcoolilor secundari și esterilor obținuți în reacții. Se observă că aceste dependențe sunt liniare de forma $Y = a + bX$. În Tabelul 62 se pot observa parametrii dreptelor de etalonare pentru compuşii studiați.

Tabelul 62. Parametrii dreptelor de etalonare

Nr.crt.	Compus etalon	Standard intern	a	b
1.	2-butanol	Decan	- 0.177	0.878
2.	2-pentanol	Decan	- 0.037	0.736
3.	2-octanol	Decan	0.003	0.738
4.	Acetat de butil	Decan	- 0.089	0.632
5.	Acetat de pentil	Decan	- 0.040	0.676
6.	Acetat de octil	Decan	0.014	0.567
7.	Laurat de octil	Hexadecan	0.094	0.684

Cu ajutorul acestor parametri se poate calcula cantitatea de alcool respectiv ester care se găsește la un moment dat în amestecul de reacție:

$$m_{\text{alc/ester}} = \left(\frac{A_{\text{alc/ester}}}{A_{\text{st}}} - a \right) \cdot \frac{m_{\text{st}}}{b}$$

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

3.3. REȚETE DE LUCRU

3.3.1. Reacții de hidroliză. Determinarea activității lipazice.

Materiale

Pentru determinarea activității în reacții de hidroliză s-au utilizat: ulei de măsline comercial, gumă arabică (Serva), albumina din ser de bovină BSA (Reanal). Restul reactivilor utilizați au fost achiziționați de la Chimopar, București. Soluțiile tampon au fost obținute în laborator din reactivi chimici puri. Pentru titrări s-a folosit o biuretă automată tip OP-930 (Radelkis), un pH-metru digital tip OP-208 (Radelkis) și un agitator magnetic.

Principiul metodei

Activitatea lipazei se exprimă în *unități enzimatică* ("cantitatea de enzimă" care catalizează transformarea unui micromol de substrat, într-un minut, în condiții standard notate U sau $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) și se definește drept cantitatea de enzimă dintr-un ml 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.

$$\text{Activitatea} = \frac{\mu\text{moli acid gras}}{\text{min}\cdot\text{ml extract}} (U/\text{ml}) \text{ sau } \text{Activitatea} = \frac{\mu\text{moli acid gras}}{\text{min}\cdot\text{mg preparat}} (U/\text{mg})$$

În cazul în care raportarea se face la cantitatea de proteină din extractul lichid sau preparatul solid, se definește drept *activitate specifică*, exprimată în U/mg proteină.

Mod de lucru

S-a lucrat după metoda Worthington (Manual Worthington, 1993) cu unele modificări.

Prepararea emulsiei: 6.6 g gumă arabică s-au dizolvat în 92 ml apă distilată sub agitare energetică. S-au mai adăugat în picături 8 ml ulei de măsline și s-a continuat agitarea timp de 4 h. Emulsia s-a păstrat la 0 - 5°C, maxim 15 zile.

Într-un reactor de sticlă cu capacitatea de 50 cm³, termostatat la 37°C și prevăzut cu agitare magnetică s-au introdus 5 ml substrat de emulsie de ulei de măsline, 5 ml apă distilată, 2 ml soluție NaCl 3.0 M, 1 ml soluție CaCl₂ 0.075 M și 2 ml soluție BSA 0.5%. PH-ul emulsiei a fost stabilizat 8.0 cu soluție NaOH 0.01 M. S-a adăugat apoi 1 ml soluție enzimatică sau enzima solidă, considerând adăugarea enzimei drept momentul zero al reacției. În decursul determinării pH-ul s-a menținut la valoarea 8.0 timp de 10 minute prin titrarea acizilor grași eliberați cu soluție NaOH 0.01 M. Din cantitatea de bază consumată s-a calculat activitatea enzimei. Calculul activității s-a făcut prin scăderea volumului de NaOH 0.01 M consumat după 2 minute din volumul total de NaOH consumat după 10 minute (pentru a elimina erorile datorate eventualelor grupări acide prezente în xerogel care s-a presupus că s-au neutralizat în primele 2 minute). Activitatea s-a exprimat prin numărul de micromoli de acid gras eliberați în urma hidrolizei trigliceridei sub acțiunea a 1 mg enzimă într-un minut. S-a folosit relația:

$$Activitate = \frac{V_1 - V_2}{t} \cdot \frac{n \cdot f \cdot 1000}{m} \quad \mu\text{moli acid gras} / \text{min} \cdot \text{mg enzimă} (U / \text{mg})$$

unde:

V_1 – volumul de NaOH folosit la titrare, după 10 minute (ml)

V_2 – volumul de NaOH folosit la titrare, după 2 minute (ml)

t – intervalul de timp pentru determinarea activității (8 minute)

f – factorul soluției de NaOH

n – normalitatea soluției de NaOH

m – cantitate de enzimă (mg)

Randamentul de imobilizare a proteinelor s-a determinat ca raportul dintre cantitatea proteinelor imobilizate prin entrapare și cantitatea de proteine supusă imobilizării. Randamentul de regăsire a activității enzimatică după imobilizare s-a determinat ca fiind raportul dintre activitatea totală a enzimei imobilizate și activitatea totală a enzimei libere.

3.3.2. Reacții de esterificare. Determinarea activității lipazice.

Pentru determinarea activității de esterificare a lipazelor în această lucrare s-a ales drept model reacția dintre acidul lauric și 1-octanol destășurată în mediu de solvent organic.

Materiale

În reacțiile de esterificare s-au folosit: 1-octanol 95% (Fluka), acid lauric (Fluka), izooctan 99.5% (Serva), n-hexadecan 99% (Merck).

Determinările cromatografice s-au efectuat pe un cromatograf de gaze DANI GC 86.10 echipat cu detector cu ionizare în flacără. S-a utilizat o coloană capilară cu dimensiunile 15m x 0.32 mm, faza staționară BPX - 5 chimic legată (SGE Australia). Condiții de analiză pentru probele din reacțiile de esterificare:

- program de temperatură: 100°C - 200°C cu viteza de încălzire de 20°C/min
- temperatură injector: 300°C
- temperatură detector: 350°C
- gaz purtător - azot cu debitul 1.47 ml/min

Mod de lucru

Într-o fiolă de sticlă termostată la 40°C și prevăzută cu agitare magnetică, s-au introdus 0.2 mmoli acid lauric, 0.4 mmoli 1-octanol, 2 ml izooctan (solvent) și 30 μl hexadecan (standard intern). La momentul zero al reacției s-a introdus enzima, liberă (Cc-10mg, PPL-5mg) sau imobilizată (40 mg). Reacțiile au fost urmărite timp de mai multe zile, prin luare de probe la fiecare 24 h. Activitatea de esterificare s-a calculat pe baza randamentelor de ester după 24 h și s-a exprimat ca micromoli de ester format pe oră de către 1 mg de enzimă liberă sau imobilizată. Randamentele de regăsire a activității enzimatică s-au calculat tot după 24 h de reacție. Randamentul de imobilizare a proteinelor s-a determinat ca raportul dintre cantitatea proteinelor imobilizate prin entrapare și cantitatea de proteine supusă imobilizării.

$$Activitate \text{ de esterificare} = \frac{\mu\text{moli ester format}}{24 \cdot m} \quad (U / \text{mg})$$

m = cantitatea de enzimă introdusă în reacția de esterificare (mg)

$$\text{Randament regasire} = \frac{\text{Activitate esterificare enz.imobilizata} \cdot m_1}{\text{Activitate esterificare enz.libera} \cdot m_2} \cdot 100$$

m_1 = cantitatea de enzimă imobilizată obținută (mg)

m_2 = cantitatea de enzimă supusă imobilizării (mg)

3.3.3. Reacții de transesterificare. Determinarea activității lipazice, excesului enantiomeric și selectivității.

Determinarea activității de transesterificare a lipazelor din *Pseudomonas fluorescens* (AK) și BUTE-3b imobilizate prin diverse metode, a excesului enantiomeric și a selectivității reacției s-a realizat pentru reacția de acilare a unor alcooli secundari (2-butanol, 2-pentanol și 2-octanol) cu acetat de vinil în hexan.

Materiale

În reacții s-au folosit: 2-butanol (Fluka), 2-pentanol (Fluka), 2-octanol (Fluka), acetat de vinil (Fluka), n-hexan 98% (Merk), n-decan 95% (Riedel de Haën), n-hexadecan 99% (Merk).

Determinările cromatografice pentru probele din reacțiile de transesterificare enantioselectivă s-au efectuat pe un cromatograf de gaze DANI GC 86.10 echipat cu detector cu ionizare în flacără. Pentru analiza compușilor optic activi s-a folosit o coloană capilară chirală cu dimensiunile 25m x 0.32 mm, fază staționară CYDEX-B cu grosimea de 0.25 μm (SGE, Australia). Condiții de analiză pentru probele din reacțiile de transesterificare:

- temperatură injector: 240°C
- temperatură detector: 280°C
- gaz purtător: heliu cu debitul 0.815 ml/min sau 1.13 ml/min
- program de temperatură: variabil în funcție de proprietățile componentelor amestecului de analizat, astfel încât acestea să fie complet separate.

Mod de lucru

Într-o fiolă termostată la 40°C și prevăzută cu agitare magnetică s-au introdus 2 ml hexan, 1 mmoli alcool secundar, 3 mmoli acetat de vinil, 30 μl decan (utilizat ca standard intern pentru analiza cantitativă), 50 mg preparat enzimatic. În reacțiile catalizate de enzima liberă s-au utilizat 5 mg preparat enzimatic. Momentul inițial al reacției s-a considerat atunci când s-a introdus lipaza. Reacțiile au fost urmărite prin luare de probe cu ajutorul unei micropipete la diferite intervale de timp, care s-au diluat cu hexan după caz, și care au fost analizate gaz-cromatografic prin metoda standardului intern. Activitățile de transesterificare au fost calculate la 24 h pe baza cantității de ester formată și exprimată ca micromoli de ester format pe oră de către 1 mg enzimă liberă sau imobilizată. Randamentele de regăsire a activității enzimatică după imobilizare s-au calculat tot la un timp de reacție de 24 h. Randamentele de ester au fost calculate direct sau în unele cazuri pe baza conversiilor alcoolului din datele obținute în urma analizele gaz-cromatografice.

$$\text{Activitate de transesterificare} = \frac{\mu\text{moli ester format}}{24 \cdot m} \quad (\text{U/mg})$$

m = cantitatea de enzimă introdusă în reacția de transesterificare (mg)

$$\text{Randament regasire} = \frac{\text{Activitate transesterificare enz.imobilizata} \cdot m_1}{\text{Activitate transesterificare enz.libera} \cdot m_2} \times 100$$

m_1 = cantitatea de enzimă imobilizată obținută (mg)

m_2 = cantitatea de enzimă supusă imobilizării (mg)

Conform regulii lui Kazlauskas (Bornscheuer și Kazlauskas, 1999) s-a stabilit că lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (AK) este (*R*)-specifică, la fel ca lipaza BUTE-3b (Bodai, 2004), deci esterul majoritar s-a considerat că este (*R*)-esterul. Excesul enantiomeric al produsului (*ee*) s-a calculat pe baza analizelor cromatografice considerându-se că aria corespunzătoare fiecărui enantiomer este direct proporțională cu concentrația acestuia. Factorul enantiomeric (*E*) a fost calculat conform literaturii (Chen și colab., 1982).

$$ee = \frac{c_R - c_S}{c_R + c_S} \quad \text{unde } c_R = \text{concentrația enantiomerului (R)}$$

$$c_S = \text{concentrația enantiomerului (S)}$$

$$E = \frac{\ln[1 - C(1 + ee_p)]}{\ln[1 - C(1 - ee_p)]} \quad \text{unde } C = \text{conversia}$$

$$ee_p = \text{excesul enantiomeric de produs}$$

3.3.4. Reacții de esterificare enantioselectivă.

Studiul reacțiilor de esterificare enantioselectivă a urmărit esterificarea directă între un alcool secundar alifatic (2-pentanol și 2-octanol) și un acid carboxilic saturat (acid n-hexanoic, acid n-butiric) în mediu de solvent organic, în prezența lipazelor din pancreas de porc (PPL, obținută în laborator) imobilizată prin adsorbție pe CaCO_3 (PPL₂ și PPL₃), din *Candida cylindracea* imobilizată prin adsorbție pe Celite și a preparatului comercial de lipază din *Mucor miehei* - Lipozyme[™].

Materiale

În reacțiile de esterificare și pentru analize s-au folosit: 2-pentanol (Fluka), 2-octanol (Fluka), acid hexanoic (Loba), acid butiric (Riedel de Haën), n-hexan 98% (Merk), n-decan 95% (Riedel de Haën), tris(2,2,2-trifluoro-1-hidroxiethyliden)-d-camforato european (Aldrich), S-(+)-2-pentanol (Aldrich).

Determinările cromatografice pentru probele din reacțiile de esterificare enantioselectivă s-au efectuat pe un cromatograf de gaze GCHF 18.3 echipat cu detector cu ionizare în flacără. Pentru analiza amestecului de reacție s-a folosit o coloană cu umplutură polară, tip FFAP 10%, depusă pe Chromosorb W-AW DMCS de 80-100 mesh. Condiții de analiză pentru probele din reacțiile de esterificare:

- temperatură injector: 200°C
- temperatură detector: 200°C
- gaz purtător: azot cu presiunea 0.3bar
- program de temperatură: variabil în funcție de proprietățile componentelor amestecului de analizat, astfel încât acestea să fie complet separate

Pentru analiza probelor prin metoda ¹H-RMN s-a utilizat un spectrometru ¹H-RMN Tesla BS 487C, 80MHz. Soluțiile s-au preparat în cloroform deuterat, iar ca standard intern s-a folosit TMS (tetrametilsilanul). Reactivul de deplasare chiral

utilizat a fost $\text{Eu}(\text{TFC})_3$ Tris3-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxietiliden)-d-camforato-europiu cu masa moleculară $M=893.67$. S-au făcut spectre $^1\text{H-RMN}$ ale alcoolilor racemici folosiți ca materii prime, fără reactiv de deplasare și în prezența reactivului de deplasare. De asemenea au fost analizate fracțiunile separate în urma distilării în vid care conțin alcool și ester.

Mod de lucru

Într-un reactor cu capacitatea de 50 cm^3 , termostatat la temperatura de 37°C și sub agitare magnetică s-au introdus alcoolul secundar și acidul în diferite rapoarte molare, apă după caz, solventul și enzima. Momentul adăugării preparatului enzimatic a fost considerat momentul zero al reacției. Evoluția reacțiilor în timp a fost urmărită gaz-cromatografic, pe baza analizelor calculându-se conversia alcoolului în diferite momente ale reacției. Ca standard intern pentru analiza cromatografică s-a utilizat n-decan. După stoparea reacției prin filtrarea enzimei, solventul s-a evaporat iar produsele de reacție au fost fracționate prin distilare în vid și analizate prin spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară $^1\text{H-RMN}$ utilizându-se pentru determinarea excesului enantiomeric reactivul de deplasare chiral $\text{Eu}(\text{TFC})_3$, (tris3-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxietiliden)-d-camforato-europiu. Pentru identificare s-a folosit S-(+)-2-pentanol.

Conversia alcoolului (C) s-a calculat prin raportarea cantității de alcool transformată la cantitatea inițială de alcool din sistem.

Excesul enantiomeric se poate calcula în fiecare caz considerând că integrala semnalului corespunzător fiecărui enantiomer este proporțională cu numărul de moli al acestuia.

$$ee = \frac{|n_1 - n_2|}{n_1 + n_2} \quad \text{unde } n_1 \text{ și } n_2 = \text{numărul de moli de enantiomer 1 respectiv 2}$$

4. CONCLUZII FINALE

Studiile prezentate în cadrul părții de contribuții originale cuprind două direcții principale: obținerea unor biocatalizatori cu calități îmbunătățite față de enzimele libere, utili în diverse reacții din chimia organică pentru sinteza unor compuși intermediari în fabricarea unor produse chimice, sau pentru obținerea unor produse finite și respectiv realizarea unor reacții enantioselective catalizate de lipaze libere și imobilizate prin rezoluție cinetică.

Cercetările efectuate, asupra metodelor de imobilizare a lipazelor, au condus la obținerea a 90 de preparate enzimaticе toate rețetele utilizate fiind noi. Lipazele utilizate în studii au fost lipaza din *Candida Cylindracea*, lipaza din *Pseudomonas fluorescens*, lipaza din *Pseudomonas cepacia*, lipaza microbială din fungii termofile BUTE-3b, obținută în cadrul unei colaborări cu Universitatea Tehnică și Economică din Budapesta, lipaza din *Mucor miehei* (denumire comercială Lipozyme) și lipaza din pancreas de porc obținută și purificată în laborator.

- Prima metodă de imobilizare studiată a fost adsorbția. Au fost utilizate două materiale drept suporturi care să îndeplinească cerințele de bază de a fi inerte și ușor accesibile: Celite (un material pe bază de pământ de diatomee, mult utilizat în industria alimentară) și carbonatul de calciu, iar lipaza imobilizată a fost cea pancreatică. Celite s-a dovedit a fi un suport mai bun, probabil datorită suprafeței specifice mai ridicate și prezenței unor grupări care permit formarea de legături de hidrogen în momentul imobilizării enzimei. În cazul carbonatului de calciu, reacția de imobilizare a fost efectuată la diferite valori de pH în domeniul în care lipaza pancreatică este activă (7-9), cel mai ridicat randament de regăsire a activității enzimaticе fiind înregistrat la pH 7. Acest randament însă a fost de numai 40%, în timp ce în cazul Celitei la același pH s-a obținut un randament de regăsire de peste 70%. Randamentul de legare a proteinei enzimaticе pe suport a fost de asemenea mai mare în cazul Celitei (36%) decât al carbonatului de calciu (în jur de 20%). Pe baza acestor rezultate s-a utilizat în studiile următoare Celite drept suport anorganic pentru imobilizare.

- Cea de-a doua metodă de imobilizare folosită a fost entraparea în sol-gel. Cercetările efectuate au urmărit obținerea unor sol-geluri hibride folosind drept materii prime tetraetoxisilan și alchil- sau aril-trietoxisilani, spre deosebire de datele obținute din literatură în care s-au utilizat derivați ai tetraetoxisilanului. Ideea care a stat la baza acestei alegeri a fost aceea că viteza reacției de formare a gelului va fi mai mică decât în cazul metoxi-derivaților ceea ce va face ca și creșterea locală de temperatură datorită efectului termic al reacției să fie mai mică și să fie evitat pericolul unei eventuale dezactivări termice a enzimei. În același timp, în urma reacției de hidroliză a silanilor nu se formează metanol ci etanol, care este un compus mai puțin toxic pentru majoritatea lipazelor.

- Alcoolii măresc omogenitatea sistemului constituit din silanii parțiali hidrolizați și soluția apoasă de enzimă. Deși datele de literatură recomandă în acest sens alcoolul izopropilic, rezultatele obținute în studiul utilizării diferiților aditivi în procesul de încapsulare în sol-gel al lipazei din *Candida cylindracea* (Cc) au condus la concluzia că alcoolul etilic are efectul activator mai pronunțat, deoarece omogenitatea sistemului de reacție în care are loc gelifierea este mai bună. Alți aditivi utilizați au fost polietilenglicolii, dintre care cel cu masă moleculară mare (20.000) s-a dovedit a fi superior celui cu masă moleculară medie (8.000). Prezența

polietilenglicolului împiedică colapsarea porilor în timpul maturării gelului, favorizând formarea unui xerogel poros.

- Raportul molar silan/apă, modul de obținere al solului prepolimer și timpul de hidroliză al solului sunt parametri care pot avea un rol important în procesul de obținere a biopolimerilor încapsulați prin metoda sol-gel, existând în general o valoare optimă a acestora. În urma cercetărilor realizate cu lipaze *Candida cylindracea* (Cc), *Pseudomonas fluorescens* (AK), *Pseudomonas cepacia* (PS) imobilizate s-a stabilit că creșterea raportului molar apă/silan peste o anumită valoare determină scăderea activității enzimei imobilizate, raportul molar optim situându-se în domeniul între 1:20 și 1:10.

- Creșterea timpului de hidroliză al solului conduce la obținerea unei rețele mai ramificate și a unei configurații diferite a solului prepolimer în momentul adăugării soluției enzimatică și a catalizatorului. Rezultatele obținute în acest studiu au demonstrat că, indiferent de proveniența lipazei, activitatea după imobilizare a scăzut dacă solul a fost menținut o perioadă mai lungă (până la 168 de ore) după obținere. Drept urmare, următoarele experimente s-au efectuat folosind rețete de fabricație în care gelifierea se realiza imediat după obținerea solului.

- Compuși cu rol de „șablon” pot fi utilizați în timpul procesului de obținere a sol-gelului pentru a favoriza obținerea unei structuri favorabile a gelului în timpul maturării. S-a urmărit efectul adăosului unor hidrați de carbon ca și compuși șablon. Au fost utilizate diferite monozaharide tip hexoză (glucoză, galactoză, manoză), o dizaharidă (lactoza), o pentoză (xiloza) cât și β-ciclodextrina, iar sol-gelurile au fost obținute numai pe bază de tetraetoxisilan. Activitățile obținute în reacția de hidroliză a uleiului de măsline de lipaza din *Pseudomonas cepacia* imobilizată în prezența acestor aditivi nu au diferit mult între ele și nici în comparație cu preparatul care nu conținea zaharide. Deoarece aditia compușilor menționați nu influențează semnificativ activitatea hidrolitică a lipazei imobilizate înseamnă că ei se pot utiliza în procesele de încapsulare în sol-gel pentru a mări enantioselectivitatea prin inducerea unor mici modificări conformaționale ale enzimei în timpul imobilizării.

- La imobilizarea prin entrapare a lipazei din *Candida cylindracea* (Cc) și a lipazei pancreatice (PPL) cu diferiți silani în diferite rapoarte molare nu toate preparatele obținute au fost active ca biocatalizatori în reacția de esterificare a 1-octanolului iar activitatea a fost influențată de natura și raportul molar al silanilor precursori. Preparatele în care gruparea hidrofobă prezentă în structura gelului a fost gruparea fenil au avut activitatea de esterificare cea mai mare. Aceste preparate se obțin însă greu, din cauza dificultăților care apar la procesul de gelifiere. Preparatele care au fost obținute folosind metiltrietoxisilan ca silan precursor cu grupare hidrofobă s-au obținut în schimb în condiții foarte bune, iar în seria acestora creșterea concentrației de grupări metil a determinat creșterea activității de esterificare și a randamentului de regăsire. Acest fenomen se datorează deplasării segmentului hidrofob din apropierea centrului activ datorită interacțiunii cu grupările hidrofobe ale suportului favorizându-se astfel accesul substratului la centrul activ.

- Pentru combinarea avantajelor celor două metode de imobilizare studiate și anume creșterea de activitate observată în cazul adsorbției pe Celite și stabilitatea mai mare a enzimei imobilizate rezultată în urma entrapării în sol-gel, s-a elaborat o metodă de imobilizare în care cele două tehnici au fost combinate. Au fost testate mai multe variante de realizare practică a unei asemenea imobilizări prin metoda combinată entrapare-adsorbție, folosind lipază pancreatică. Metoda combinată nu determină o creștere a activității la fel de mare ca în cazul adsorbției urmată de precipitarea enzimei pe suprafața adsorbantului cu acetonă, totuși activitatea totală

regăsită după imobilizare este de 3-4 ori mai mare decât cea inițială. Au fost investigați parametrii acestei imobilizări.

- Inițierea policondensării s-a efectuat prin modificarea pH-ului din domeniul acid în domeniul bazic prin adăugare de soluție tampon de pH 8 sau soluție de amoniac, sau cu ajutorul unui catalizator de tip acid Lewis, fluorura de sodiu. Dintre aceste metode, cataliza bazică s-a dovedit a fi mai eficientă, valorile activităților fiind mult mai mari comparativ cu cele obținute folosind NaF. S-a preferat utilizarea amoniacului, deoarece s-a constatat că în aceleași condiții de imobilizare (precursori MTEOS și TEOS în raport molar 3:1) o valoare mai mare a pH-ului la gelificare, realizată cu amoniac, duce la o activitate a preparatului de peste 4 ori mai mare. Adăosul de etanol în faza de obținere a solului, pentru a favoriza omogenitatea sistemului de reacție, a fost eficientă doar în cazul folosirii NaF drept catalizator. Dacă imobilizarea lipazei pancreatice se face prin metoda combinată de entrapare și adsorbție, creșterea concentrației de grupări hidrofobe din matricea polisiloxanică nu mai influențează favorabil activitatea enzimei. Studiul realizat la diferite rapoarte molare ale silanilor precursori metiltrietoxisilan și tetractoxisilan a demonstrat că în acest caz cel mai mare randament de regăsire a activității enzimatică după imobilizare se obține la o valoare a acestui raport de 1:1.

- Rezoluția cinetică a amestecurilor racemice, catalizată de lipaze, a fost investigată în partea a doua a tezei. Ea este una din cele mai atractive metode utilizate în obținerea compușilor enantiomeric puri, iar alcoolii secundari sunt cele mai utilizate substraturi în rezoluțiile catalizate de lipaze datorită importanței lor în sintezele organice dar și datorită faptului că în mod normal lipazele manifestă față de aceștia cea mai mare enantioselectivitate comparativ cu alcoolii primari și terțiari. S-au studiat două tipuri de reacții enantioselective ale alcoolilor secundari și anume: esterificarea cu acizi carboxilici saturați și acilarea (transesterificarea) cu acetat de vinil, ambele în solvent organic cu conținut redus de apă.

- Reacțiile de esterificare enantioselectivă studiate au condus la concluzia că dintre lipazele utilizate, lipaza din *Candida cylindracea* nu a fost enantioselectivă în această reacție iar cea comercială - Lipozyme a demonstrat o stereoselectivitate remarcabilă, doar enantiomerul (*R*) fiind detectat prin analiza ¹H-RMN a produsului.

- Folosind Lipozyme, s-au stabilit condițiile optime de reacție pentru sinteza (*R*)-esterilor acizilor butiric și hexanoic cu 2-pentanolul. S-a demonstrat că este preferabil să se lucreze cu un raport molar alcool/acid de 2:1 pentru că în acest caz, ținând cont de enantioselectivitatea reacției, se poate obține (*R*)-esterul 2-pentanolului cu un randament de aproape 90% și puritate enantiomerică foarte mare, iar alcoolul nereacționat conține izomerul (*S*) într-un exces enantiomeric ce depinde de gradul de conversie. Studiile realizate cu mici cantități de apă introduse în sistem (concentrație de până la 0.05% față de acid) au condus la variații nesemnificative ale valorilor conversiei, deci eliminarea apei rezultate în sistem nu este neapărat necesară în condițiile în care se lucrează într-un solvent hidrofob. Esterii 2-octanolului au fost obținuți cu randamente mai mici comparativ cu cei ai 2-pentanolului, în aceleași condiții de reacție. Reacția de esterificare a 2-pentanolului cu acidul hexanoic a fost studiată și în funcție de temperatură. S-a constatat un efect favorabil semnificativ al temperaturii asupra conversiei în intervalul de până la 40°C și unul mai puțin semnificativ peste această temperatură. Rezultă că reacțiile de esterificare enantioselectivă pot fi realizate în cataliză enzimatică la temperaturi relativ scăzute cu viteză suficient de mare, deci în condiții energetice favorabile comparativ cu procesele chimice.

- Reacțiile de acilare enantioselectivă cu acetat de vinil s-au studiat pentru trei alcooli secundari, 2-butanol, 2-pentanol și 2-octanol. Drept catalizatori s-au utilizat lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (AK), imobilizată prin entrapare și prin metoda nouă – entrapare combinată cu adsorbție, și lipaza BUTE-3b imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție.
- În urma studiului reacțiilor 2-butanolului catalizate de lipază AK imobilizată prin entrapare, s-a constatat că selectivitatea reacțiilor nu diferă foarte mult în funcție de natura și raportul molar al silanilor precursori. Excesele enantiomerice obținute sunt foarte mici și imobilizarea nu duce la creșterea selectivității, deci aceste preparate nu sunt potrivite pentru separarea izomerilor 2-butanolului. Nici preparatele rezultate în urma imobilizării prin metoda combinată nu conduc la o selectivitate mare a reacției de acilare a 2-butanolului, valorile fiind apropiate de cele ale reacției catalizate de enzima imobilizată prin adsorbție. Randamentele de regăsire a activității enzimatică au fost în cazul enzimei imobilizate prin entrapare simplă mai mici de 35%, în timp ce la lipaza imobilizată prin metoda combinată acest randament a ajuns până aproape de 50%, un rezultat foarte bun pentru aceste reacții.
- Selectivitatea reacției de acilarea 2-butanolului cu enzima BUTE-3b imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție nu a prezentat diferențe semnificative în funcție de silanii precursori utilizați. Cea mai mare valoare înregistrată a fost în cazul utilizării preparatului enzimatic imobilizat obținut cu EtTEOS : TEOS în raport molar de 1:1. Valorile enantioselectivității scad însă în urma imobilizării prin metoda sol-gel, atât comparativ cu enzima liberă, cât și față de cea imobilizată numai prin adsorbție.
- Pentru substratul 2-pentanol preparatele de AK imobilizate prin adsorbție au condus la activități de reacție diferite în funcție de natura și raportul molar al silanilor precursori. Preparatele cele mai active față de acest substrat au fost cele obținute cu PhTEOS iar randamentul de regăsire a fost puțin mai scăzut ca la 2-butanol, de cel mult 32%. În unele cazuri în urma imobilizării se obține o creștere a excesului enantiomeric obținut după 24h de reacție, justificând astfel imobilizarea enzimelor libere. Dintre cele șase preparate de lipază AK imobilizată prin metoda combinată cele care conțin MTEOS au condus la rezultate mai bune pe substratul 2-pentanol, în acest caz excesele enantiomerice și selectivitatea reacției fiind chiar mai mari ca în cazul enzimei libere.
- În reacțiile de acilare a 2-pentanolului care utilizează lipază BUTE-3b imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție s-au obținut randamente în ester destul de bune iar excesele enantiomerice obținute au fost sensibil mai mari în toate cazurile studiate decât cele obținute cu enzima liberă și cu cea imobilizată prin adsorbție. De asemenea s-au realizat valori ridicate ale enantioselectivității reacției, apropiate de cele înregistrate cu enzima liberă și cea imobilizată numai prin adsorbție. Cele mai bune rezultate s-au obținut când s-a utilizat preparatul în care raportul molar metiltrietoxisilan și tetraetoxisilan a fost 5:1. Randamentul de regăsire a fost și de data aceasta mai mare pentru această enzimă, situându-se la valoarea de 55% în cazul celui mai activ preparat.
- Preparatele imobilizate testate pe 2-butanol și 2-pentanol au fost utilizate și în reacții de acilare a 2-octanolului. Pe acest substrat cele mai active și selective preparate pe bază de lipază AK imobilizate prin entrapare au fost cele obținute cu PhTEOS, astfel, la raport molar PhTEOS:TEOS de 1:1 indicele de enantioselectivitate E a fost mai mare cu 30% decât în cazul enzimei libere. Spre deosebire de 2-pentanol, în cazul 2-octanolului se înregistrează o creștere a enantioselectivității în urma imobilizării prin metoda combinată în comparație cu enzima liberă în timp ce

rezultatele cele mai bune se observă la enzima imobilizată prin adsorbție. Excesul enantiomeric este însă mai mic la enzima adsorbită, deci pe ansamblu și în acest caz entraparea combinată cu adsorbție duce la rezultate mai bune.

- În cazul catalizatorilor pe bază de BUTE-3b, imobilizate prin metoda combinată, preparatele cele mai active în reacțiile de acilare a 2-octanolului s-au dovedit a fi cele obținute folosind MTEOS ca al doilea silan precursor. Creșterea proporției grupării hidrofobe a dus la formarea unui preparat mai activ, randamentul de regăsire a activității fiind 35% la preparatului obținut cu un raport molar MTEOS/TEOS de 5:1. Enantioselectivitatea ridicată a enzimei libere în raport cu acest substrat s-a menținut și chiar a crescut puțin în urma imobilizării, însă randamentele mai scăzute ale reacției de transesterificare au afectat valorile coeficientului de enantioselectivitate E.

- Comparând toate rezultatele obținute pe cele trei substraturi și cele 24 de preparate imobilizate de AK și BUTE-3b, precum și rezultatele obținute în urma reacțiilor cu enzimele libere, se poate spune că lipaza din *Pseudomonas fluorescens* nu are o enantioselectivitate foarte mare în raport cu alcoolii secundari studiați, excesele enantiomerice cele mai mari obținute fiind în jur de 70% în cazul 2-pentanolului și 60% în cazul 2-octanolului. În ce privește factorul enantiomeric E, acesta crește în urma imobilizării pentru această enzimă, dar nu suficient pentru ca să ajungă la valoarea de 20 considerată convenabilă pentru aplicare industrială. Astfel, lipaza neimobilizată are valoarea factorului E de 4.5 în raport cu 2-pentanolul, în timp ce aceeași lipază imobilizată prin entrapare pe bază de precursori metiltrietoxisilan și tetraetoxisilan în raport 3:1 ajunge la valoare de 6.3. În raport cu 2-octanolul, lipaza din *Pseudomonas fluorescens* liberă are valoare factorului E de 5.4, iar după imobilizarea prin entrapare pe bază de precursori de feniltrietoxisilan și tetraetoxisilan în raport 1:1 această valoare crește la 7. Cea mai bună separare a enantiomerilor prin rezoluție cinetică are loc în prezența lipazei BUTE-3b imobilizată prin metoda de entrapare combinată cu adsorbție în reacția de acilare a 2-pentanolului.

- Faptul că dintre cei trei alcoolii secundari 2-pentanolul conduce la cea mai bună rezoluție cinetică se explică prin orientarea diferită a celor doi enantiomeri ai alcoolului secundar atunci când aceștia se leagă de centrul activ pentru a forma intermediarul acil-enzimă. În toate reacțiile de acilare a 2-pentanolului catalizate de lipaze BUTE-3b imobilizate prin entrapare combinată cu adsorbție valorile indicelui de enantioselectivitate depășesc 20, reacțiile cu $E \geq 20$ fiind considerate suficiente pentru ca sinteza să poată fi utilizată industrial. Utilizând metoda de entrapare combinată cu adsorbția pe Celite și drept precursori feniltrietoxisilanul și tetraetoxisilanul, s-a obținut pentru 2-pentanol o valoare a factorului enantiomeric E de 32 iar pentru 2-octanol de 21.

- Studiului termostabilității lipazelor imobilizate a dus la concluzia că prin metoda de imobilizare entrapare combinată cu adsorbția creșterea temperaturii determină o creștere a activității de transesterificare la mai mare decât în cazul enzimei libere, în timp ce scăderea enantioselectivității și excesului enantiomeric este mai puțin pronunțată decât cea înregistrată pentru enzima liberă. Dacă drept silani precursori s-au utilizat metiltrietoxisilan și tetraetoxisilan în raport 3:1, pentru lipaza AK s-a constatat o creștere a activității de transesterificare la creșterea temperaturii în intervalul 30-70°C, atât pentru enzima liberă cât și pentru cea imobilizată, însă după imobilizare creșterea activității a fost mai mare, de 2.5 ori comparativ cu 1.3 ori la enzima liberă. În același timp, enantioselectivitatea reacției de acilare a 2-pentanolului a scăzut la creșterea temperaturii. Această scădere a fost mai puternică la enzima liberă, unde excesul enantiomeric a scăzut de la 44% la 11% (adică de 4 ori în acest

interval de temperatură), decât la enzima imobilizată unde a scăzut de la 63% la 45%. Dacă precursorii silanici utilizați pentru imobilizare au fost feniltrietoxisilan și tetraetoxisilan în raport 1:1, reducerea enantioselectivității a fost mai pronunțată (excesul enantiomeric a scăzut de la 57% la 25%).

- Lipaza BUTE-3b a arătat o sensibilitate termică mai mare în stare liberă, activitatea ei scăzând semnificativ la o temperatură mai mare de 60°C, în timp ce la lipaza imobilizată nu s-a înregistrat acest fenomen până la 70°C. În ce privește enantioselectivitatea acestei enzime, la lipaza liberă ea a scăzut de la 90% la 74% în intervalul de temperatură 30-70°C, în timp ce enzimele imobilizate își păstrează în măsură mai mare înalta enantioselectivitate, scăderea fiind de 7-8% pe același interval de temperatură. Se poate afirma că prin imobilizare lipazele studiate pot fi folosite și la temperaturi mai ridicate, cu o pierdere a enantioselectivității mai puțin pronunțată decât în cazul enzimei libere.

- În urma studiului de reutilizare făcut pentru două din enzimele imobilizate prin entrapare combinată cu adsorbție (*Pseudomonas fluorescens* AK₂₄ și BUTE-3b₈) s-a observat creșterea excesului enantiomeric și a selectivității reacției la reutilizare. Această creștere se poate explica prin faptul că scăzând activitatea enzimei, adică viteza de transformare a substratului și fiind vorba de rezoluție cinetică diferența dintre vitezele cu care sunt transformați cei doi enantiomeri se poate accentua. Numărul de cicluri de reutilizare pentru care activitatea relativă se menține la peste 25% din activitatea inițială pentru lipaza AK imobilizată este de 4, în timp ce în cazul enzimei libere acest număr este de numai 2.

- Rezultatele obținute și prezentate în această teză au constituit până în prezent subiectul unui număr de 5 lucrări științifice publicate în reviste de specialitate sau volumele unor manifestări științifice și 9 lucrări comunicate la manifestări științifice din țară și străinătate.

Lucrări publicate și comunicate pe baza rezultatelor prezentate în teză

1. Peter F., Anghel A., **Popa C.**, Sârbu A., *Simpozionul "Resurse și Dezvoltare în Industria Alimentară"*. București, 1995.
2. Peter F., **Popa C.**, Csunderlik C., *Al IV-lea Simpozion Național de Cataliză*, Ploiești, 21-22 septembrie 1995.
3. V. Popoviciu, F. Peter, L. Ursica, **C. Popa**, *Conferința Națională de Farmacie*, Tg.Mureș, 16-18 octombrie 1996, *Revista de Medicină și Farmacie*, 1996, 42, 47.
4. Peter F., Muntean D., Petrean A., **Popa C.**, *A 22-a Sesiune de Comunicări Științifice*, Olănești, 1996, 1, 185-192.
5. Burian A., **Kiss C.**, Anderca M., Peter F., *A 23-a Sesiune de Comunicări Științifice*, Călimănești-Căciulata, 1997, 277-280.
6. **Kiss C.**, Zsok R., Burian A., Petrean A., *Al II-lea Simpozion Internațional Cercetarea Interdisciplinară Zonală ȘTIINTA-TEHNOLOGIE-SOCIETATE* Timișoara, 1997.
7. **Kiss C.**, Anderca M., Popa I., Burian A., Peter F., *Al IX-lea Simpozion de Microbiologie și Biotehnologie*, Iași, 1998.
8. Peter F., **Kiss C.**, Preda G., *Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ.*, Timișoara, 1999, 44(58), 2, 239-244.

9. Peter F., **Kiss C.**, Szöcs-Biró E., Dumitru R., Tolos M., Tomescu L., Achiței C., *A XVII-a Conferință Națională de Chimie*, Calimănești – Căciulata, Romania, **2002**, 35.
10. Peter F., Poppe L., **Kiss C.**, Szöcs-Biró E., Preda G., Zarcu C., Olteanu A., *6th International Conference on Protein Stabilization*, Bratislava, **2004**, 63.
11. Szöcs-Biró E., **Kiss C.**, Zarcu C., Olteanu A., Peter F., *Al VI-lea Simpozion Internațional Romania-Serbia&Muntenegru-Ungaria*. Ed. Sudura. Timișoara, **2004**, 580-589, ISBN 973-8359-26-0.
12. **Kiss, C.**, Szocs-Biro E., Olteanu A., Mazilu A., Zarcu C., Peter F., *A XXVIII-a Conferință Națională de Chimie*, Calimănești –Căciulata, **2004**, 119.
13. Zarcu C.A., **Kiss C.**, Szöcs-Biró E., Peter F., *Al VII-lea Simpozion Internațional Romania-Serbia&Muntenegru-Ungaria*. Reșița. **2005**, Analele Universității "Eftimie Murgu", în curs de publicare.
14. Peter F., Poppe L., **Kiss C.**, Szöcs-Biró E., Preda, G., Zarcu C., Olteanu A., *Biocatal. Biotransform.*, **2005**, 23 (3-4), 251-260.

5. BIBLIOGRAFIE

- Ader U., Schneider M.P., *Tetrahedron: Asym.*, **1990**, *3*, 205.
 Adlercreutz P., *Eur.J.Biochem.*, **1991**, *199*, 609-614.
 Allenmark S., *Chromatografic Enantioseparation*, Ed.Ellis Horwood, London, 1991.
 Ambramowicz D.A., Keese C.R., *Biotechnol.Bioeng.*, **1989**, *33*, 149.
 Andersson M., Samra B., Holmberg H., Adlercreutz P., *Biocatal. Biotransform.*, **1999**, *17*, 293-303.
 Antus S., Gottsegen A., Kajtar J., Kovacs T., Toth T.S., Wagner H., *Tetrahedron: Asym.*, **1993**, *4*, 3399.
 Atsuumi S., Nakano M., Koike Y., Tanaka S., Ohkubo M., *Tetrahedron Lett.*, 1990, *31*, 1601-1604.
 Atsuumi S., Nakano M., Koike Y., Tanaka S., Ohkula M., Yonezawa T., Funabashi H., Hashimoto J., Morishima H., *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 1601.
 Avram M., *Chimie organică*, Ed.Academiei RSR, București. **1983**.
 Azerad R., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1995**, *132*, 17-51.
 Bacaloglu R., Csundelik C., Cotarcă L., Glatt H.H., *Structura și proprietățile compușilor organici*, Ed.Tehnică. București, **1985**.
 Badea F., Kerek F., *Stereochimie*, Ed.Stiințifică. București. **1974**.
 Balcao V.M., Paiva A.L., Malcata F.X., *Enzyme Microb.Technol.*, **1996**, *18*, 392-416.
 Barnier J.P., Blanco L., Guibe-Jampel E., Rousseau G., Salaun J., *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 5051-5058.
 Barth S., Effenberger F., *Tetrahedron: Asym.*, **1993**, *4*, 823-827.
 Basheer S., Mogi K., Nakajima M., *Biotechnol.Bioeng.*, **1995**, *45*, 187-195.
 Berglund P., *Biomol. Eng.*, **2001**, *18*, 13-22.
 Berglund P., Voerde C., Hoegberg H., *Biocatalysis*, **1994**, *9*, 123-130.
 Bergmeyer H.U., Bernt E., Gawehn K., Michal G., in *Methods of Enzymatic Analysis* (Ed. : H.U. Bergmeyer), Academic Press., New York, **1974**, *1*, 158- 190.
 Berkowitz D.B., Danishefsky S.J., Schulte G.K., *J.Am.Chem.Soc.*, **1992**, *114*, 4518-4529.
 Berkowitz D.B., Danishefsky S.J., Schulte G.K., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 5497.
 Bevinakatti H.S., Banerji A.A., Newadkar R.V., Mokashi A.A., *Tetrahedron: Asym.*, **1992**, *3*, 1505-1508.
 Bevinakatti H.S., Newadkar R.V., Banerji A.A., *J.Chem.Soc., Chem.Commun.*, **1990**, 1091-1092.
 Bhalerao V.T., Dasaradhi L., Neelakantan P., Fadnavis N.W., *J.Chem.Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 1197-1198.
 Bianchi D., Cabri W., Cesti P., Francalanci F., Rama F., *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 2455-2458.
 Bilyk A., Bistline R.G., Haas R.G., Fearheller S.H., *J.Am.Oil Chem.Soc.*, 1991, *68*, 320.
 Blaschke G., *Chem.Ber.*, **1974**, *107*, 237-252.
 Blaschke G., Markgraf H., *Chem.Ber.*, **1980**, *113*, 2031-2035.
 Bodai V., Universitatea Tehnică și Economică. Teză de doctorat, Budapesta. **2004**.
 Bommarius A.S., Riebel B.R., *Biocatalysis*, Wiley VCH. Weinheim, **2004**.
 Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J., *Hydrolases in organic solvents*, Ed.Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.

- Brandy L., Brzozowski A.M., Derewenda Z.S., Christiansen L., Høge-Jensen B., Nørskov L., Thim L., Menge U., *Nature*, **1990**, *343*, 767-770.
- Brink L., Tramper J., Luyben K., Van't Riet K., *Enzyme Microb. Technol.*, **1988**, *10*, 736-743.
- Brown N.A., Jähnchen E., Müller W.E., Wollert U., *Mol. Pharmacol.*, **1977**, *13*, 70.
- Buchholz K., Kasche V., Bornscheuer U.T., *Biocatalysis and Enzyme Technology*, Wiley VCH, Weinheim, **2005**.
- Bullock C., *Science Progress*, **1995**, *78*, 119.
- Burgess K., Cassidy J., Henderson J., *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 2050-2058.
- Burian A., Kiss C., Anderca M., Peter F., *A 23-a Sesiune de Comunicări Stiințifice, Călimănești-Căciulata*, **1997**, 277-280.
- Burke P.A., Griffin R.G., Klivanov A.M., *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*(28), 20057-20064.
- Cambou B și Klivanov A.M., *Biotechnol. Bioeng.*, **1984**, *26*, 1449-1454.
- Cambou B., Klivanov A.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 2687-2692.
- Carrea G., Riva S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 2226-2254.
- Carta G., Gainer J.L., Benton A.H., *Biotechnol. Bioeng.*, **1991**, *37*, 1004-1009.
- Chattapadhyay S., Mamdapur V.R., *Biotechnol. Lett.*, **1993**, *15*, 245-250.
- Chen C.S., Fujimoto Y., Sih C.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 7294-7299.
- Chen C.S., Wu S.H., Girdaukas G., Sih C.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 2812-2817.
- Chen J.P., Lin W.S., *Enzyme Microb. Technol.*, **2003**, *32*, 801-811.
- Chenevert R., D'Astous L., *Can. J. Chem.*, **1988**, *66*, 1219-1222.
- Claon P.A., Akon C.C., *Biotechnol. Lett.*, **1993**, *15*, 1211.
- Claon P.A., Akon C.C., *Enzyme Microb. Technol.*, **1994**, *16*, 835.
- Cleasby A., Garman E., Egmond M.R., Batemburg M., *J. Mol. Biol.*, **1992**, *224*, 281.
- Contractor S.F., Wragg J., *Nature*, **1965**, *208*, 71-72.
- Crich J.Z., Brieva R., Marquart P., Gu R.L., Flemming S., Sih C.J., *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 3252-3258.
- Cygler M., Schrag J.D., *Methods Enzymol.*, **1997**, *284*, 3-27.
- Dalgliesh C.E., *Biochem. J.*, **1952**, *52*, 3-14.
- Dalgliesh C.E., *J. Chem. Soc.*, **1952**, 3940-3942.
- Davankov V.A., *Pure Appl. Chem.*, **1997**, *69*, 1469-1474.
- De Caro J., Boudouard M., Bonicel J., Guidoni A., Desnuelle P., Röverly M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1981**, *671*, 129-138.
- DeCastro H.F., Anderson W.A., Legge R.L., Moo-Young M., *Indian J. Chem.*, **1994**, *31*, 891.
- Dent C.E., *Biochem. J.*, **1948**, *43*, 169-180.
- Demoncour R., Azerad R., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 4661-4664.
- Dibkaer R., *Clin. Chem.*, **2002**, *48*, 586-590.
- Dordick J.S., *Enzyme Microb. Technol.*, **1989**, *11*, 194-211.
- Drauz K., Waldmann H., *Enzyme catalysis in organic synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **1995**.
- Dudal Y., Lortie L., *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, *45*, 129-134.
- Dumitru I.F., Iordăchescu D., *Introducere în enzimologie*, Ed. Medicală, București, **1981**.
- Ehler J., Seebach D., *Liebigs Ann. Chem.*, **1990**, 397-388.
- Eliel E.L., Wilen S.H., *Stereochemistry of Organic Compounds*, Ed. John Wiley & Sons, New York, **1994**.
- Ennis M.D., Old D.W., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 6283-6286.
- Faber K., *Biotransformation in organic chemistry*, Springer, Heidelberg, **1995**.

- Faber K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, Ediția a 2-a, Ed. SpringerVerlag, Heidelberg, 1995.
- Feibush B., *Chem. Commun.*, 1971, 544.
- Ferjancic A., Puigserver A., Gaertner H., *Biotechnol. Lett.*, 1988, 10, 101-106.
- Fernandez S., Brieva R., Rebolledo F., Gotoc V., *J.Chem.Soc., Perkin Trans. I*, 1992, 2885-2889.
- Ferraboschi P., Grisenti P., Manzocchi A., Santaniello E., *J.Org.Chem.*, 1990, 55, 6214-6216.
- Fisher P., Aichholz R., Bolz U., Juza M., Krimmer S., *Angew.Chem.*, 1990, 102, 439.
- Fonteyn F., Blecker C., Lognay G., Marlier M., Severin M., *Biotechnol. Lett.*, 1994, 16, 693-696.
- Francalanci F., Cesti P., Cabri W., Bianchi D., Martinengo T., Foa M., *J.Org.Chem.*, 1987, 52, 5079.
- Frank H., Nicolson G.J., Bayer E., *Angew. Chem.*, 1978, 90, 396.
- Frank H., Nicolson G.J., Bayer E., *J.Chromatogr. Sci.*, 1977, 15, 174.
- Frings K., Koch M., Hartmeier W., *Enzyme Microb. Technol.*, 1999, 25, 303-309.
- Fritsche K., Sylatk C., Wagner H., Hengelsberg H., Tacke R., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1989, 31, 107-111.
- Frykman H., Ohrner N., Norin T., Hult K., *Tetrahedron Lett.*, 1993, 34, 1367-1370.
- Furukawa S., Tsutomu O., Hiroyuki I., Kawakami K., *J.Molec.Cat.B: Enzymatic*, 2001, 15, 65-70.
- Gandhi N.N., *JAOCs*, 1997, 74, 621-633.
- Ghanem A., Aboul-Enein H.Y., *Chirality*, 2005, 17, 1-15.
- Ghanem A., Ginatta C., Jian Z., Schuring V., *Chromatografia*, 2003, 57, 275.
- Ghanem A., *Org. Biomol. Chem.*, 2003, 1, 1282-1291.
- Ghanem A., Schurig V., *Tetrahedron: Asym.*, 2003, 14, 2547-2555.
- Gil-Av E., Feibush B., Charles-Siegler R., *Tetrahedron Lett.*, 1966, 10, 1009-1015.
- Gill I., Ballesteros A., *Trends Biotech.* 2000, 18, 282-296.
- Gill I., *Chem. Mat.*, 2001, 13, 3404-3421.
- Gill I., Pastor E., Ballesteros A., *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 9487-9496.
- Gorman L.A.S., Dordick J.S., *Biotechnol. Bioeng.*, 1992, 39, 392-397.
- Gray C.J., Narang J.S., Barker S.A., *Enzyme Microb. Technol.*, 1990, 12, 800.
- Gu R.L., Sih J., *Tetrahedron Lett.*, 1990, 31, 3283-3286.
- Guanti G., Banfi L., Narisano E., *Tetrahedron Lett.*, 1989, 30, 2697-2698.
- Guanti G., Banfi L., Narisano E., *Tetrahedron: Asym.*, 1990, 1, 721-724.
- Guibe-Jampel E., Rousseau G., Salaun J., *J.Chem.Soc., Chem. Commun.*, 1987, 1080-1081.
- Guo Z.W., Sih C.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 6836-6841.
- Gupta A.K., Kazlauskas R.J., *Tetrahedron: Asym.*, 1993, 4, 879-888.
- Halling P.J., *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, 16, 178-206.
- Hemmerle H., Gais H.J., *Tetrahedron Lett.*, 1987, 28, 3471-3474.
- Hench, L.L., West, J.K., *Chem. Rev.*, 1990, 90, 33-72.
- Henderson G.M., Rule H.G., *Nature*, 1938, 141, 917-918.
- Hoegh I., Patkar S., Halkier T., Hansen M.T., *Can. J. Botan.*, 1995, 73, 869-875.
- Hoff B.H., Ljones L., Ronstad A., Anthonsen T., *J.Molec.Cat.B: Enzymatic*, 2000, 8, 51-60.
- Holmberg E., Holmquist M., Hedenstrom E., Berglund P., Norin T., Hult K., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1992, 35, 572-578.
- Huges D.L., Bergan J.J., Amato J.S., Reider P.J., Grabowski E.J.J., *J.Org.Chem.*, 1989, 54, 1787-1788.

- Huges D.L., Song Z., Schmith G.B., Bergan J.J., Dezeny G.C., Reider P.J., Grabowski E.J.J., *Tetrahedron: Asym.*, **1993**, *4*, 865-874.
- Hui D.Y., Kissel J.A., *FEBS Lett.*, **1990**, *276*, 131-134.
- Indlekofer M., Brotz F., Bauer A., Reuss M., *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, *52*, 459-471.
- Isono Y., Nabetani H., Nakajima M., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1995**, *72*, 887-890.
- Itoh T., Takagi Y., Murakami T., Hiyama Y., Tsukube H., *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 2158-2163.
- Itoh T., Takagi Y., Tsukube H., *J. Molec. Cat. B: Enzymatic*, **1997**, *3*, 259-270.
- Iwai M., Tsujisaka Y., *Agric. Biol. Chem.*, **1974**, *38*, 1241-1247.
- Iwasaki Y., Yasui M., Ishikawa T., Irimescu R., Hata K., Yamane T., *Journal of Chromatography A*, **2001**, *905*, 111-118.
- Jaeger K.H., Reetz M.T., *Trends Biotechnol.*, **1998**, *16*, 396-403.
- Jin W., Brennan J.D., *Anal. Chim. Acta*, **2002**, *461*, 1-36.
- Kagan H.B., Fiaud J.C., *Top. Stereochem.*, **1988**, *18*, 249-330.
- Kahn S.S., Siddiqui A.M., *Biotechnol. Bioeng.*, **1985**, *27*, 415.
- Kalaritis P., Regenye R.W., Partridge J.J., Coffen D.L., *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 812-815.
- Kanerva L.T., Räkälä K., Vääntinen E., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1992**, *14*, 1759-1762.
- Karube I., Kawarai M., Matsuoka H., Suzuki S., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1985**, *21*, 270-272.
- Kaul R., Souza S.F., Nadkarni G.B., *Biotechnol. Bioeng.*, **1984**, *26*, 901-904.
- Kawakami K., Matsui Y., Ono T., Ijima H., *Biocat. Biotrans.*, **2003**, *21*, 49-52.
- Kawakami K., Yoshida S., *Biotechnol. Tech.*, **1994**, *8*, 441-446.
- Kawakami K., Yoshida S., *Biotechnol. Tech.*, **1995**, *9*, 701-704.
- Kawakami K., Yoshida S., *J. Ferment. Bioeng.*, **1996**, *82*, 239-245.
- Kazlauskas R.J., Weissfloch A.N.E., Rappaport A.T., Cuccia L.A., *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 2656-2665.
- Khmelnitsky Y.L., Belova A.B., Levashov A.V., Mozhaev, V.V., *FEBS Lett.*, **1991**, *284*, 267-269.
- Kimura Y., Tanaka A., Sonomoto K., Nihira T., Fukui S., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1983**, *17*, 107-112.
- Kirchner G., Scollar M.P., Klibanov A.M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 7072-7076.
- Kise H., Hayakawa A., Noritomi H., *J. Biotechnol.*, **1990**, *14*, 239-254.
- Kiss C.**, Anderca M., Popa I., Burian A., Peter F. .. *Al IX-lea Simpozion de Microbiologie și Biotehnologie*, Iași, **1998**.
- Kiss C.**, Zsok R., Burian A., Petrean A., *Al II-lea Simpozion Internațional Cercetarea Interdisciplinară Zonală ȘTIINȚA-TEHNOLOGIE-SOCIETATE* Timișoara, **1997**.
- Kiss, C.**, Szocs-Biro E., Olteanu A., Mazilu A., Zarcuța C., Peter F., *Al XXVIII-a Conferință Națională de Chimie*, Calimănești –Căciulata, **2004**, 119.
- Kitazume T., Sato T., Ishikawa N., *Chem. Lett.*, **1984**, 1811-1814.
- Kitazume T., Sato T., Kobayashi T., Lin T. J., *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 1003-1006.
- Klibanov A.M., *Acc. Chem. Res.*, **1990**, *23*, 114-120.
- Klibanov A.M., *ChemTech*, **1986**, 354-359.
- Klibanov A.M., *Nature*, **2001**, *409*, 241-246.
- Klibanov A.M., *Trends Biochem. Sci.*, **1989**, *14*, 141-144.
- König W.A., Lutz S., Colberg C., Schmidt N., Wenz G., Von der Bey E., Monsandl A., Gunter C., Kunstermann A., *J. High Resol. Chromatog., Chromatog. Commun.*, **1988**, *11*, 621-626.

- König W.A., Lutz S., Mischnick-Lübbecke P., Brassat B., Wenz G., *J. Chromatogr.*, **1988**, *447*, 193-197.
- König W.A., Mischnick-Lübbecke P., Brassat B., Lutz S., Wenz G., *Carbohydr. Res.*, **1988**, *183*, 11-17.
- Koshiro S., Sonomoto K., Tanaka A., Fukui S., *J. Biotechnol.*, **1985**, *2*, 47-57.
- Kutsuki A., Sawa I., Hasegawa J., Watanabe K., *Agric. Biol. Chem.*, **1986**, *50*, 2369.
- Kwon S.J., Song K.M., Hong W.H., Rhee J.S., *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, *46*, 393-395.
- Laane C., Tramper J., Lilly M.D., *Biocatalysis in Organic Media*, Elsevier, Amsterdam, **1987**.
- Langrand G., Barrati J., Buono G., Triantaphylides C., *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 29-32.
- Laumen K., Breitgoff D., Schneider M.P., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1988**, 1459-1461.
- Laumen K., Schneider M.P., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1988**, 598-600.
- Lin J.T., Yamazaki T., Kitazume T., *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 3211-3217.
- Loubinoux B., Viriot-Chauvenau C., Stinnes J.L., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 2145.
- Luisi P.L., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1985**, *24*, 439-450.
- MacNaughtan M.D., Daugulis A.J., *Enzyme Microb. Technol.*, **1993**, *15*, 114-119.
- Magnusson A., Royal Institute of Technology, Teză de doctorat. Stockholm, **2005**.
- Manjon A., Iborra J.L., Arocas A., *Biotechnol. Lett.*, **1991**, *13*, 339-344.
- Manual Worthington*, Worthington Biochemical Corporation, **1993**, 243-246.
- Martinek K., Berezin I., *J. Solid-Phase Biochem.*, **1977**, 343-385.
- Mertoli P., Nicolosi G., Patti A., Piatelli M., *Chirality*, **1996**, *8*, 377-380.
- Monsan P., Combes D., *Biotechnol. Bioeng.*, **1984**, *26*, 347-351.
- Mori K., Bernotas R., *Tetrahedron: Asym.*, **1990**, *1*, 87.
- Müller P., *Pure Appl. Chem.*, **1994**, *66*, 1077-1184.
- Müller W.E., Wollert U., *Mol. Pharmacol.*, **1975**, *11*, 52-60.
- Murata M., Terao Y., Achiwa K., Nishio T., Seto K., *Chem. Pharm. Bull.*, **1989**, *37*, 2670.
- Mustranta A., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1992**, *38*, 61-66.
- Nelson J.M., Griffin E.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1916**, *38*, 1109-1115.
- Nenițescu C.D., *Chimie organică*. Ed. Didactică și Pedagogică, București, **1980**.
- Nilsson J., Blackberg L., Carlsson P., Enerback S., Hernell O., Bjursell G., *Eur. J. Biochem.*, **1990**, *192*, 543-550.
- Oguntimein G.B., Anderson W.A., Moo-Young M., *Biotechnol. Lett.*, **1995**, *17*, 77-82.
- Ohtani T., Nakatsukasa H., Kamezawa M., Tachibana H., Naoshima Y., *J. Molec. Cat. B: Enzymatic*, **1998**, *4*, 53-60.
- Oi N., Doi T., Kitahara H., Inda Y., *J. Chromatogr.*, **1982**, *239*, 493.
- Oi N., Kitahara H., Doi T., *J. Chromatogr.*, **1983**, *254*, 282-284.
- Overbeeke P.L.A., Govardhan C., Khalaf N., Jongejan J.A., Heijnen J.J., *J. Molec. Cat. B: Enzymatic*, **2000**, *10*, 385-393.
- Ozegowski R., Kunath A., Schick H., *Liebigs Ann.*, **1995**, 1699-1702.
- Pauling L., *Chem. Eng. News.*, **1949**, *27*, 313.
- Payen A., Persoz J.F., *Ann. Chim. (Phys.)*, **1833**, *53*, 73-92.
- Persichetti R.A., Lalonde J.J., Govardhan C.P., Khalaf N.K., Margolin A.L., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 6507-6510.
- Peter F., Anghel A., **Popa C.**, Sârbu A., *Simpozionul "Resurse și Dezvoltare în Industria Alimentară"*, București, **1995**.

- Peter F., Roşu R., **Kiss C.**, E. Deretey, *EuropaCat-3, 3rd European Congress of Catalysis*, Cracovia, Polonia, **1997**.
- Peter F., *Biotransformări enzimatică*, Ed. Politehnica, Timișoara, **2005**.
- Peter F., **Kiss C.**, Preda G., *Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timișoara)*, **1999**, 44(58), 2, 239-244.
- Peter F., **Kiss C.**, Szocs-Biro E., Dumitru R., Tolos M., Tomescu L., Achiței C., *A XXVII-a Conferință Națională de Chimie*, Calimănești –Căciulata, Romania, **2002**, 35.
- Peter F., **Popa C.**, Csunderlik C., *Al VI-lea Simpozion Național de Cataliză*, Ploiești, **1995**.
- Peter F., Poppe L., **Kiss C.**, Szocs-Biro, E., Preda, G., Zarcu C., Olteanu A., *Biocatal. Biotransform.*, **2005**, 23 (3-4), 251-260.
- Peter F., Preda G., Dragomirescu M., *Biocatalizatori enzimatici. Obținere, Caracterizare, Aplicații*, Ed. Mirton, Timișoara, **2003**.
- Pierre A.C., *Biocat. Biotrans.*, **2004**, 22, 145-170.
- Poppe L., Novak L., *Selective Biocatalysis*, Wiley-VCH, Weinheim, **1992**.
- Pottie M., van der Eycken J., Vandewalle M., Dewanckele J.M., Roper H., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 5319.
- Preda G., Peter F., Zsok R., **Popa C.**, C. Csunderlik, *1st International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Halkidiki, Greece, **1998**, 1, 424.
- Preda G., Peter F., **Kiss C.**, Dragomirescu M., *2nd International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries*, Halkidiki, Greece, **2000**, 1, 182.
- Prenosil J.E., Kut O.M., Dunn I.J., Heinzle E., *Immobilized biocatalysts in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Ed.5., Vol. A14, Wiley-VCH, Weinheim, **1989**.
- Rakels J.L.L., Straathof A.J.J., Heijnen J.J., *Enzyme Microb. Technol.*, **1993**, 15, 1051-1056.
- Reetz M.T., *Adv. Mater.*, **1997**, 9, 943-954.
- Reetz M.T., Tielmann P., Wiesenhöfer W., Könen W., Zonta A., *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, 345, 717-728.
- Reetz M.T., Zonta A., Simpelkamp J., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, 34, 301-303.
- Reetz M.T., Zonta A., Simpelkamp J., *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, 49, 527- 534.
- Rekker, R.F., *The hydrophobic fragmental constants*. Elsevier, Amsterdam, **1977**
- Reslow M., Adlercreutz P., Mattiason B., *Eur. J. Biochem.*, **1988**, 172, 573-578.
- Rottici D., Haeffner F., Orrenius C., Norin T., Hult, K., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998**, 5, 267-272.
- Salaun J., Karkour B., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 4669-4672.
- Schomaecker R., Robinson B.H., Fletcher P.D., *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, **1988**, 84, 4203-4212.
- Schurig V., *Angew. Chem.*, **1977**, 89, 419-428.
- Schurig V., Gil-Av E., *Israel. J. Chem.*, **1976**, 15, 96.
- Schuring V., *J. Chromatogr. A*, **2001**, 906, 275-299.
- Scilimati A., Ngooi T.K., Sih C.J., *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 4927-4930.
- Sinisterra J.V., in *Engineering of/with Lipases*, (Ed. Malcata X.F), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **1989**, 73-101.
- Soares C.M.F., dos Santos O.A., Olivo J.E., de Castro H.F., de Moraes F.F., Zanin G.M., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2004**, 29, 69-79.
- Sparks M.A., Panek J.S., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 33, 4085-4093.

- Stajer H., Borkowski J., Sobiech K., *Biotechn. Appl. Biochem.*, **1991**, *13*, 65.
- Stamatis H., Xenakis A., Dimitriadis E., Kolisis F.N., *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, *45*, 33-37.
- Stokes T., Oehlschlager A.C., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 2091-2094.
- Straathof A.J.J., Jongejan J.A., *Enzyme Microb. Technol.*, **1997**, *21*, 559-571.
- Svendsen A., *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, *1543*, 223-238.
- Szöcs-Biró E., **Kiss C.**, Zarcuła C., Olteanu A., Peter F., *Al VI-lea Simpozion Internațional România-Serbia&Muntenegru-Ungaria*. Ed. Sudura, Timișoara, **2004**, 580-589, ISBN 973-8359-26-0.
- Tamper J., *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, *52*, 290.
- Tanaka A., Sonomoto K., *Chem. Tech.*, **1990**, *20*, 112-115.
- Terao Y., Murata M., Achiwa K., *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 5173-5176.
- Theisen P.D., Heathcock C.H., *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 2374-2378.
- Tombo G.M.R., Schar H.P., Fernandez X., Busquets I., Ghisalba O. în *Biocatalysis in Organic Media*. (Ed: Laane C., Tamper J., Lilly M.D.), Amsterdam, Elsevier, **1987**, 43.
- Tombo G.M.R., Schar H.P., Fernandez X., Busquets I., Ghisalba O., *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 5707.
- Triantafyllou A.O., Wehtje E., Adlercreutz P., Mattiasson B., *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, *45*, 406-414.
- Tsai S.W., Chiang C.L., *Biotechnol. Bioeng.*, **1991**, *38*, 206-211.
- Tsuji K., Terao Y., Achiwa K., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 6189-6192.
- V. Popoviciu, F. Peter, L. Ursica, **C. Popa**, Conferința Națională de Farmacie. Tg.Mureș. 16-18 octombrie 1996, Revista de Medicină și Farmacie. **1996**, *42*, 47.
- Van Tol J.B.A., Jongejan J.A., Duine J.A., *Biocatal. Biotransform.*, **1995**, *12*, 99.
- Verger R., De Haas G.H., Sarda L., Desnuelle P., *Biochim. Biophys. Acta*, **1969**, *188*, 272-282.
- Verger R., *Trends Biotechnol.*, **1997**, *15*, 32-38.
- Vermue M.H., Tramper J., *Pure Appl. Chem.*, **1995**, *67*, 345-373.
- Wang Y.F., Lalonde J.J., Momongau M., Bergbreiter D.E., Wong C.H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 7200-7205.
- Wang Y.F., Sih C.J., *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *25*, 4999-5002.
- Wehtje E., Adlercreutz P., Mattiasson B., *Biotechnol. Bioeng.*, **1993**, *41*, 171-175.
- Weichert R., *Arkiv Kemi*, **1970**, *31*, 517.
- Wu S.H., Guo Z.W., Sih C.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 1990-1995.
- Xie Z.F., *Tetrahedron: Asym.*, **1991**, *2*, 733-750.
- Yahya A.R.M., Anderson W.A., Moo-Young M., *Enzyme Microb. Technol.*, **1998**, *23*, 438-450.
- Yang Z., Russell A.J., *Enzymatic reactions in organic media*, Ed. Chapman & Hall, London, **1996**.
- Zaks A., Klivanov A.M., *J. Biol. Chem.*, **1988**, *263*, 3194-3201.
- Zaks A., Klivanov A.M., *Science*, **1984**, *244*, 1249-1251.
- Zarcuła C.A., **Kiss C.**, Szöcs-Biró E., Peter F., *Al VII-lea Simpozion Internațional România-Serbia&Muntenegru-Ungaria*, Reșița, **2005**, Analele Universității "Eftimie Murgu", în curs de publicare.