

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

**TEZĂ DE DOCTORAT**

*Obținere de compuși organici optic activi pe cale enzimatică*

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

Candidat  
**Ing. Gabriela Preda**

BIBLIOTECA CENTRALA  
UNIVERSITATEA "POLITEHNICA"  
TIMISOARA

**TIMIȘOARA – 2003 –**

**BUPT**

*Familiei mele, cu dragoste*  
*Profesorilor și mentorilor mei, cu respect*

# CUPRINS

<b>Introducere</b>	1
<i>Partea I. Studiu documentar</i>	
<b>1. Amilaze. Obținere, proprietăți, utilizări.</b>	6
1.1. Generalități privind enzimele amilolitice	6
1.2. Obținerea și purificarea amilazelor	7
1.2.1. Generalități	7
1.2.2. Biosinteza $\alpha$ -amilazelor fungice	8
1.2.3. Biosinteza amiloglucozidazei fungice	10
1.2.4. Purificarea enzimelor amilolitice	12
1.3. Caracterizarea amilazelor	14
1.3.1. Caracterizarea $\alpha$ -amilazei	14
1.3.2. Caracterizarea glucoamilazei	19
1.4. Structura și mecanismele de acțiune ale enzimelor amilolitice	21
1.4.1. Structura enzimelor amilolitice	21
1.4.1.1. Structura $\alpha$ -amilazei	21
1.4.1.2. Structura glucoamilazei	22
1.4.2. Mecanisme de acțiune	24
1.4.2.1. Mecanismul de acțiune al $\alpha$ -amilazei	26
1.4.2.2. Mecanismul de acțiune al glucoamilazei	26
1.4.2.3. Teoria subsitusurilor	27
1.4.2.4. Modele de acțiune	28
1.4.2.5. Reacții multimoleculare	30
1.5. Utilizările enzimelor amilolitice	30
1.5.1. Gelatinizarea și lichefierea amidonului	31
1.5.2. Zaharificarea	32
1.6. Bibliografie	33
<b>2. Enzime proteolitice în solvenți organici</b>	37
2.1. Structura și mecanismul de acțiune al subtilizinelor	37
2.1.1. Structura subtilizinelor	37
2.1.2. Mecanismul catalitic	38
2.1.3. Specificitatea de substrat	43
2.2. Parametrii care guvernează cataliza enzimatică în mediu organic	44
2.2.1. Rolul apei în cataliza enzimatică în mediu organic	45
2.2.2. Efectul solventului organic asupra biocatalizei	46
2.2.2.1. Efectul solventului asupra enzimei	47
2.2.2.2. Efectul solventului asupra apei asociate de enzimă	48
2.2.2.3. Efectul solventului asupra substraturilor și produșilor	48
2.3. Mecanismul de acțiune al enzimelor în mediu neapos	49
2.4. Cinetica și termodinamica proceselor enzimaticice în mediu neapos	50
2.4.1. Modele	50
2.4.2. Constante cinetice aparente și constante de viteză individuale	51
2.4.3. Efectul mediului organic asupra poziției de echilibru	53
2.5. Noi proprietăți ale enzimelor în mediu organic	53
2.5.1. Specificitatea de substrat a enzimelor în mediu neapos	53
2.5.2. Stereoselectivitatea enzimelor în mediu neapos	55

2.5.3.	Termostabilitatea enzimelor în mediu neapos	57
2.6.	Concluzii	58
2.7.	Bibliografie	59
<b>3.</b>	<b>Studii privind sinteza <math>\alpha</math>-aminoacizilor optic activi</b>	<b>62</b>
3.1.	Produse naturale chirale, surse de L- $\alpha$ -aminoacizi	63
3.1.1.	Hidroliza acidă	64
3.1.2.	Hidroliza alcalină	64
3.1.3.	Hidroliza enzimatică	64
3.2.	Aminoacizi optic activi din substraturi prochirale	68
3.2.1.	Metode biocatalitice de obținere a aminoacizilor optic activi	68
3.2.1.1.	Obținerea aminoacizilor optic activi prin fermentație	68
3.2.1.1.1.	Producerea directă de aminoacizi din diverse surse de carbon	68
3.2.1.1.2.	Metoda precursorilor	71
3.2.1.2.	Aminoacizi optic activi prin sinteză enzimatică asimetrică din precursori prochirali	71
3.2.1.2.1.	Dehidrogenaze	72
3.2.1.2.2.	Aminotransferaze	74
3.2.1.2.3.	Amoniac-liaze	76
3.2.1.2.4.	Alte liaze	77
3.2.1.2.5.	Aminoacizi optic activi prin biotransformarea unor precursori racemici sau chirali	78
3.2.2.	Aminoacizi optic activi prin sinteză chimică asimetrică	80
3.3.	Obținerea aminoacizilor optic activi prin rezoluția racemaților	83
3.3.1.	Rezoluția prin cristalizare	83
3.3.1.1.	Rezoluția racemaților prin cristalizare directă	83
3.3.1.2.	Cristalizarea directă a sărurilor cu acizi sau baze achirale	84
3.3.1.3.	Transformarea asimetrică a racemaților indusă prin cristalizare	85
3.3.1.4.	Rezoluția prin cristalizarea diastereomerilor	86
3.3.1.5.	Transformarea asimetrică a sărurilor diastereomere	87
3.3.2.	Aminoacizi optic activi prin rezoluție cinetică enzimatică	89
3.3.2.1.	Esteraze	90
3.3.2.1.1.	Subtilizine	90
3.3.2.1.2.	$\alpha$ -Chimotripsina	93
3.3.2.1.3.	Papaina	95
3.3.2.1.4.	Lipaze	95
3.3.2.1.5.	Esteraza din ficat de porc	96
3.3.2.2.	Amidaze	96
3.3.2.3.	Acilaze	98
3.3.2.4.	Hidantoinaze	101
3.3.2.5.	Nitrilaze și nitril-hidrataze	102
3.4.	Bibliografie	103

## *Partea II. Contribuții originale*

<b>4.</b>	<b>Obținerea, caracterizarea și utilizarea enzimelor amilolitice produse de <i>Aspergillus oryzae</i> și <i>Aspergillus niger</i></b>	<b>109</b>
4.1.	Obținerea și purificarea $\alpha$ -amilazei din culturi de <i>Aspergillus oryzae</i>	109



4.1.1.	Selectarea de tulpini microbiene cu randament ridicat și standardizarea mediului optim de cultură	109
4.1.1.1.	Cultivarea tulpinilor pe medii sintetice de creștere și întreținere	110
4.1.1.2.	Selectarea de tulpini microbiene	110
4.1.1.3.	Standardizarea mediului optim de cultură	111
4.1.2.	Cinetica biosintezei amilazelor, transglucozidazelor și proteazelor pe mediu de cultură submers	114
4.1.2.1.	Sinteza substratului pentru transglucozidaze	114
4.1.2.2.	Biosinteza în flacoane	116
4.1.2.3.	Biosinteza în bioreactor	117
4.1.2.4.	Separarea enzimelor amilolitice din mediul de cultură brut de <i>Aspergillus oryzae</i>	121
4.1.3.	Obținerea de amilaze din culturi de suprafață de <i>A. oryzae</i> 242	126
4.1.4.	Concluzii privind obținerea și purificarea amilazelor din culturi de <i>Aspergillus oryzae</i>	127
4.2.	Obținerea și purificarea amiloglucozidazei din culturi de <i>A. niger</i>	128
4.2.1.	Seleționarea tulpinilor de <i>Aspergillus</i> producătoare de AMG	128
4.2.1.1.	Testarea tulpinilor de <i>Aspergillus</i> pe mediu de cultură lichid	128
4.2.1.1.1.	Biosinteza în flacoane	128
4.2.1.1.2.	Biosinteza în bioreactor	132
4.2.1.1.3.	Separarea enzimelor amilolitice din mediul de cultură de <i>Aspergillus niger</i>	134
4.2.2.	Testarea tulpinilor de <i>Aspergillus niger</i> pe mediu de cultură solid	135
4.2.2.1.	Biosinteza în flacoane	135
4.2.2.2.	Biosinteza în tăvi	136
4.2.3.	Concluzii privind obținerea și purificarea amiloglucozidazei din culturi de <i>Aspergillus niger</i>	137
4.3.	Determinarea parametrilor optimi de acțiune și a stabilității preparatelor enzimatiche purificate obținute din culturi de <i>A. oryzae</i> și <i>A. niger</i>	138
4.3.1.	Influența pH-ului asupra activității amilazice și amiloglucozidazice	138
4.4.2.	Influența temperaturii asupra activității amilazice și amiloglucozidazice	141
4.4.3.	Influența ionilor metalici și a anionilor asupra activității amilolitice	143
4.4.4.	Stabilitatea termică	145
4.4.5.	Stabilitatea la pH	149
4.4.6.	Stabilitatea la conservare	151
4.4.7.	Concluzii privind parametrii optimi de acțiune și stabilitatea preparatelor amilazice de <i>A. oryzae</i> și <i>A. niger</i>	152
4.4.	Studiul cinetic al reacției de hidroliză a amidonului cu enzime amilolitice	154
4.4.1.	Amidonul-substrat natural al amilazelor	154
4.4.2.	Determinarea parametrilor cinetici ai reacției de hidroliză a amidonului cu enzime amilolitice	157
4.4.2.1.	Cinetica reacției de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) cu $\alpha$ -amilază (Fungamyl Novo și <i>A. oryzae</i> )	158
4.4.2.2.	Cinetica reacției de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) cu amiloglucozidază (Amyloglucosidase Novo și <i>A. niger</i> )	163
4.4.2.3.	Cinetica reacției de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) folosind	165

	sistemul $\alpha$ -amilază - amiloglucozidază	
4.4.2.4.	Cinetica reacției de hidroliză a mălaiului lichefiat cu amilaza.	168
	Determinarea parametrilor cinetici	
4.4.3.	Studiul zaharificării mediilor amidonoase cu complexul amilolitic obținut din culturi de <i>A. oryzae</i> și <i>A. niger</i>	170
4.4.3.1.	Zaharificarea amidonului solubil	170
4.4.3.2.	Zaharificarea mălaiului lichefiat	174
4.5.	Concluzii	176
4.6.	Bibliografie	177
<b>5.</b>	<b>Sinteza aminoacizilor optic activi prin rezoluție cinetică enzimatică cu enzime proteolitice</b>	<b>178</b>
5.1.	Esterificarea aminoacizilor	181
5.1.1.	Esterificarea cu alcool anhidru și acid clorhidric gazos	181
5.1.2.	Esterificarea cu alcool și clorură de tionil	183
5.1.3.	Caracterizarea produșilor	184
5.2.	Rezoluția cinetică a esterilor de aminoacizi aromatici cu enzime proteolitice în sistem monofazic apă-solvent organic	186
5.2.1.	Caracterizarea produșilor	186
5.2.2.	Selectarea enzimei proteolitice	189
5.2.3.	Selectarea mediului de reacție apos-organic	191
5.2.3.1.	Influența compoziției amestecului apos-organic asupra activității Alcalasei și Savinasei	191
5.2.3.2.	Stabilitatea Alcalasei și Savinasei în sistem apos-organic monofazic	194
5.2.3.3.	Optimizarea solvenților organici	197
5.2.4.	Influența factorilor de mediu asupra rezoluției cinetice a esterilor de aminoacizi aromatici cu Alcalase în sistem monofazic apă-solvent organic	200
5.2.4.1.	Influența naturii solventului organic asupra rezoluției cinetice	200
5.2.4.2.	Influența conținutului de apă al solventului organic asupra rezoluției cinetice	200
5.2.4.3.	Influența temperaturii asupra rezoluției cinetice	206
5.2.4.4.	Influența timpului asupra rezoluției cinetice	209
5.2.5.	Separarea D-aminoacidului	212
5.2.6.	Concluzii	213
5.3.	Bibliografie	217
<b>6.</b>	<b>Protocoale și rețete de lucru</b>	<b>219</b>
6.1.	Metode de analiză	219
6.1.1.	Metoda Summner de dozare a activității amilazice cu acid 3,5-dinitrosalicilic	219
6.1.2.	Metoda de dozare a activității $\alpha$ -amilazice cu iod	222
6.1.3.	Determinarea activității proteolitice prin metoda Anson modificată	224
6.1.4.	Metoda Lowry de determinare a proteinelor	227
6.1.5.	Determinarea activității amiloglucozidazice	229
6.1.6.	Determinarea activității transglucozidazice	230
6.1.7.	Metoda Bertrand de determinare a amidonului	233
6.2.	Rețete de lucru	235
6.2.1.	Obținerea și purificarea $\alpha$ -amilazei din culturi de <i>Aspergillus oryzae</i>	235

6.2.1.1.	Biosinteza în mediu submers	235
6.2.1.1.1.	Întreținerea culturilor pe medii sintetice	235
6.2.1.1.2.	Selectarea tulpinii de producătoare de amilaze și standardizarea mediului optim de cultură	236
6.2.1.1.3.	Sinteza substratului pentru transglucozidaze	236
6.2.1.1.4.	Cinetica biosintezei amilazelor, transglucozidazelor și proteazelor pe mediu de cultură submers	236
6.2.1.1.5.	Separarea enzimelor amilolitice din mediul de cultură brut de <i>Aspergillus oryzae</i>	238
6.2.1.1.6.	Obținerea de amilaze din culturi de suprafață de <i>A. oryzae</i> 242	239
6.2.2.	Obținerea și purificarea $\alpha$ -amilazei din culturi de <i>Aspergillus niger</i>	239
6.2.2.1.	Seleționarea tulpinilor de <i>Aspergillus</i> producătoare de AMG	239
6.2.2.2.	Biosinteza în culturi de suprafață	241
6.2.2.2.1.	Cultura în flacoane	241
6.2.2.2.2.	Cultura în tăvi	241
6.2.3.	Influența factorilor de mediu asupra activității preparatelor enzimatic obținute din culturi de <i>A. oryzae</i> și <i>A. niger</i>	241
6.2.3.1.	Determinarea parametrilor optimi de acțiune ai preparatelor enzimatic produse de <i>A. oryzae</i> și <i>A. niger</i>	241
6.2.3.2.	Determinarea stabilității preparatelor enzimatic	242
6.2.3.2.1.	Stabilitatea la temperatură	242
6.2.3.2.2.	Stabilitatea la pH	242
6.2.3.2.3.	Stabilitatea la păstrare	243
6.2.4.	Studiul cinetic și zaharificarea amidonului cu amilaze	243
6.2.4.1.	Determinarea activității $\alpha$ -amilazei prin metoda dinamică	243
6.2.4.2.	Cinetica reacției de hidroliză a amidonului (Zulkovsky)	243
6.2.4.3.	Cinetica reacției de hidroliză a mălaiului lichefiat cu enzime amilolitice	243
6.2.4.4.	Studiul zaharificării amidonului cu enzime amilolitice	243
6.2.5.	Rezoluția cinetică a esterilor de aminoacizi cu proteaze	244
6.2.5.1.	Obținerea esterilor de aminoacizi	244
6.2.5.2.	Rezoluția cinetică a esterilor de aminoacizi în sistem monofazic apă-solvent organic (metodă generală)	245
6.2.5.3.	Influența factorilor de mediu asupra hidrolizei enzimatic a esterilor de DL-aminoacizi cu Alcalase în sistem monofazic	245
6.2.5.4.	Obținerea D-tirozinei	246
6.2.6.	Influența solvenților organici asupra activității și stabilității Alcalasei și Savinasei	246
6.2.6.1.	Influența temperaturii și pH-ului asupra activității Alcalasei	246
6.2.6.2.	Influența solvenților asupra stabilității Alcalasei și Savinasei	246
6.3.	Bibliografie	247
	<b>Concluzii generale</b>	<b>248</b>

*Much of life can be understood in rational terms if expressed in the language of chemistry. It is an international language, a language without dialects, a language for all of time, and a language that explains where we came from, what we are, and where the physical world will allow us to go. Chemical language has great esthetic beauty and links the physical sciences to the biological sciences.*

Arthur Kornberg, 1997

(premiul Nobel pentru fiziologie și medicina, 1959)

*Chimia organică este cea mai frumoasă parte a chimiei, este idealul în știință. Ea a dat în mare parte cheia deslegării fenomenelor vieții vegetale și animale; ea a transformat industria și ne procură corpuri de o însemnătate excepțională și de utilitate zilnică...*

*Poezia, fruct al celei mai largi imaginațiuni, își are o soră în chimia organică. Prima produce ființe fantastice; chimia organică, din contră, vede, pipăe, caracterizează și foarte adesea se servește de creațiunile sale, tot atât de fantastice. În chimia organică, furtunile imaginațiunii neîfărmurite, se unesc seninătății, observațiunii și experimentațiunii, pentru a concepe, a produce și a da mijloace nouă omeniei.*

C. I. Istrati, 1887

## Introducere

Dezvoltarea din ultimii ani a chimiei organice de sinteză fină a permis obținerea stereocontrolată a unui număr foarte mare de molecule relativ complexe. Pe măsură ce domeniul s-a dezvoltat, au apărut probleme și constrângeri noi. Sinteza organică are de rezolvat două tipuri de probleme: dezvoltarea unor tehnici de obținere de biomolecule complexe, solubile în apă, precum și dezvoltarea unor procedee de sinteză acceptabile din punct de vedere economic și ecologic. Enzimele pot contribui la rezolvarea ambelor probleme.

Enzimele sunt proteine; ele catalizează majoritatea reacțiilor biologice *in vivo*. Ele catalizează de asemenea reacții implicând substraturi naturale și nenaturale *in vitro*. Ca și catalizatori, enzimele au următoarele caracteristici:

- Accelerează viteza de reacție, în condiții blânde.
- Pot fi foarte selective pentru substraturi și stereoselective pentru reacțiile pe care le catalizează, selectivitate care poate varia de la foarte îngustă la foarte largă.
- Pot fi supuse fenomenelor de reglare, adică activitatea catalitică poate fi puternic influențată de concentrațiile substraturilor, produșilor sau a altor specii prezente în soluții.
- Catalizează în mod obișnuit reacții în condiții identice sau similare.
- Sunt în general instabile, în comparație cu catalizatorii sintetici.
- Sunt chirale și pot prezenta o mare capacitate de enantiodiferențiere.

O serie de caracteristici precum instabilitatea, costurile ridicate și specificitatea îngustă de substrat au fost considerate a fi cele mai importante dezavantaje ale enzimelor în calitatea lor de catalizatori sintetici. Ca urmare, utilizarea enzimelor a fost axată în primul rând pe obținerea de substanțe chimice pentru cercetare, prin procedee la scară redusă. Însă concepția că enzimele sunt

limitate intrinsec ca și catalizatori s-a schimbat radical în ultimii 20 de ani prin performanțele obținute în chimie și biologie.

- S-a demonstrat că multe reacții enzimatic transformă stereoselectiv numeroase substraturi naturale și nenaturale în intermediari sau produși cu importanță sintetică deosebită.
- Au fost dezvoltate noi tehnici de mărire a stabilității enzimelor și de recuperare în vederea reutilizării lor.
- Dezvoltarea biologiei celulare și moleculare, a chimiei analitice și computaționale a creat noi instrumente de manipulare a materialelor genetice în vederea obținerii de gene pentru expresia unor anumite proteine.
- S-au descoperit noi enzime, multe având un rol cheie în genetica moleculară și în tehnologia ADN recombinant. Aceste enzime, folosind tehnicile adecvate, au fost folosite la obținerea de gene utilizate pentru expresia a diferite proteine.
- Tehnologia ADN recombinant a făcut posibilă în principiu obținerea de enzime cu costuri reduse și modificarea rațională a proprietăților lor.
- Aria catalizei enzimatică a fost lărgită și stimulată de descoperirea activității catalitice a anticorpilor.

Multe reacții de sinteză organică importante au echivalentul lor în reacțiile catalizate enzimatic. Cea mai importantă caracteristică din punct de vedere sintetic a enzimelor ca și catalizatori este selectivitatea. Deoarece enzimele sunt molecule chirale mari cu stereo-structuri unice în situsul activ, ele pot fi foarte selective pentru anumite tipuri de structuri de substrat și reacții. Printre tipurile de reacții enzimatic utile sintetic se pot aminti:

- reacția **chemoselectivă** a uneia dintre grupările funcționale diferite existente în moleculă,
- reacția **regioselectivă** a uneia dintre grupările similare din moleculă,
- reacția **enantioselectivă** a unuia dintre enantiomerii unei perechi racemice, a unei fețe sau grupări enantiotopice,
- reacția **diastereoselectivă** a unui diastereomer dintr-un amestec, a unei fețe sau a unei grupări diastereomere.

În fața chimiștilor stau probleme incitante precum înțelegerea la nivel molecular a unor procese biologice importante, precum și utilizarea acestor informații în proiectarea și obținerea unor biomolecule cu aplicații în medicină, agricultură, biologie.

Deoarece activitatea biologică a majorității medicamentelor se datorează capacității lor de a interfera cu interacțiile enzimă-substrat sau receptor-ligand, abordarea rațională a proiectării și sintezei de medicamente necesită studii implicând un mare număr de substraturi, inhibitori, liganzi și derivați, multe dintre ele fiind dificil de realizat prin metode clasice. Cataliza enzimatică poate oferi căi practice de sinteză a acestor clase de molecule, iar sinteza organică prin cataliză enzimatică a devenit o alternativă atractivă la metodele clasice de sinteză. Ea oferă, atunci când se poate aplica, regio- și enantioselectivitate, costuri reduse și condiții de reacție nepoluante.

Apa este un solvent slab pentru aproape toate aplicațiile din chimia industrială. Majoritatea compușilor organici de interes comercial sunt foarte puțin solubili și sunt adesea instabili în soluții apoase. Chimiștii au realizat aceste limitări ale catalizei în soluții apoase și au înlocuit apa cu solvenți organici mult mai potriviți. Spre deosebire de



procesele chimice, biocataliza convențională se face în soluții apoase. Acest lucru se datorează în principal ideii preconcepționate că natura a destinat enzimele spre a fi catalitic active în apă și că solvenții organici servesc doar pentru a distruge puterea catalitică a enzimelor. Această concepție nu este doar simplistă ci și greșită. Folosirea enzimelor în medii neapoase nu este restricționată la situațiile create de către om. Multe enzime sau complexe multienzimatice care includ lipaze, esteraze, dehidrogenaze precum și enzimele responsabile pentru metabolismul xenobiotic (ex. citocromii P<sub>450</sub>) funcționează în medii naturale hidrofobe, de obicei în prezența sau imobilizate pe o membrană. Concentrația apei în vecinătatea acestor enzime este semnificativ mai mică decât valoarea concentrației apei de 55M în soluție apoasă. N-ar trebui să fie atunci surprinzător faptul că enzimele sunt active catalitic în sisteme de solvenți organici. Din perspectivă biotehnologică există numeroase avantaje potențiale ale utilizării enzimelor în mediu organic în comparație cu cel apos :

- Solubilitatea crescută a substraturilor nepolare.
- Deplasarea echilibrului termodinamic din sensul hidrolizei în cel al sintezei (de exemplu sintezele de esteri, peptide, lactone).
- Reducerea reacțiilor secundare dependente de apă (ex. hidroliza anhidridelor acide sau polimerizarea chinonelor).
- Imobilizarea este adesea inutilă, enzimele sunt insolubile în solvenți organici. Recuperarea enzimelor este posibilă printr-o simplă filtrare. Dacă se dorește imobilizarea enzimelor, o variantă utilă este de exemplu adsorbția pe suprafețe poroase (ex. perle de sticlă). În mediu neapos, enzimele nu se desorb de pe aceste suprafețe.
- Ușurința recuperării produsului din solvenți cu temperatură de fierbere scăzută.
- Stabilitatea termică crescută a enzimelor, apa fiind implicată în inactivarea enzimelor la temperaturi ridicate.
- Eliminarea contaminării microbiene.
- Potențial ridicat al enzimelor în folosirea lor în transformări biocatalitice.

Cataliza enzimatică în mediu neapos a cunoscut o expansiune rapidă mai ales în ultimele două decenii. Enzimele se folosesc în mod curent în soluții apoase ce conțin cantități reduse de cosolvent organic miscibil cu apa. Enzimele se utilizează de asemenea în sisteme apos organice bifazice (dizolvate în faza apoasă) sau sub formă de micelii inversate (micelii apoase emulsionate în solvenți nepolari). În fine, enzimele se utilizează de asemenea în formă insolubilă, în solvenți organici aproape anhidri. Sistemele care folosesc enzime în solvenți organici monofazici nu au o fază apoasă distinctă și implică preparate enzimatiche insolubile. Enzimele, cu foarte puține excepții, sunt insolubile în solvenți organici.

Atât mediul aproape anhidru cât și cosolvenții organici miscibili în apă implică solventul organic ca și componentă predominantă a sistemului. Spre deosebire de alte sisteme de reacție în solvent organic, enzimele în sisteme monofazice nu sunt în contact direct cu faza apoasă și există într-un mediu foarte diferit față de cel apos.

Deoarece activitatea catalitică a enzimelor este dependentă de condițiile de reacție, adesea este necesară determinarea parametrilor cinetici în condițiile practice de sinteză, în scopul obținerii unei performanțe optime. Înțelegerea semnificației constantelor cinetice permite chimistului să analizeze o reacție enzimatică și să aleagă o astfel de concentrație încât să se optimizeze potențialul sintetic al enzimei. Condițiile de reacție se pot ajusta pentru a crește productivitatea și/sau pentru a modifica selectivitatea sistemelor enzimatiche.

În literatură există numeroase studii privind influența solvenților organici asupra selectivității enzimelor, însă relațiile dintre proprietățile solventului și selectivitate nu pot fi de obicei generalizate. O modificare a polarității solventului, de exemplu, poate afecta sau nu activitatea și selectivitatea enzimei. Sunt cunoscute și cazuri de inversie a enantioselectivității de către solvenții organici. Nu se cunoaște exact dacă această inversie este cauzată direct de solvent sau de modificarea structurii enzimei în prezența solventului. Iată deci câteva exemple în favoarea ideii că mai sunt multe necunoscute în ceea ce privește rolul solvenților organici în cataliză.

Cercetările prezentate în această teză de doctorat au fost inițiate și în mare parte realizate în cadrul sau prin colaborare cu membrii colectivului de cataliză enzimatică din Institutul de Energetică Chimică și Biochimică București, transformat în 1991 în Laboratorul de sinteze organice fine din Institutul de Științe Chimice și Tehnologice Timișoara. Acest colectiv, înființat și condus de Prof. Dr. Radu Bacaloglu și apoi de Prof. Dr. Carol Csunderlik, a realizat studii de biocataliză și biotransformări încă într-o perioadă când domeniul era de pionierat, atât la noi în țară cât și pe plan mondial. Necesitatea de a avea acces la diverse enzime, din diverse surse și cu diverse proprietăți a făcut ca, pe lângă direcția de aplicații în biocataliză, să se dezvolte și o linie de obținere de enzime, atât prin metode fermentative, cât și extractive. Prezenta teză de doctorat este o oglindă a acestor două direcții. În partea de studii originale, se abordează două teme complementare, precum cele două fețe ale unei monede, corespunzând la două direcții mari de cercetare în biotehnologiile microbiene: obținerea și utilizările biocatalizatorilor.

Cu toate că cercetările în biocataliză și biotransformări au cunoscut o dezvoltare senzațională, poate greu de anticipat acum 20 de ani, dar azi ușor de înțeles, dată fiind tendința către o chimie verde, către o conviețuire mai puțin devastatoare cu natura, se pare că în domeniul acesta nu s-a scrijelit decât suprafața aisbergului, așa cum afirmă Prof. Roger Sheldon în una din cărțile sale. Din ~2500 de enzime cunoscute, numai ~250 au fost utilizate comercial, și, din ele, ~25 reprezintă mai mult de 80% din toate aplicațiile. Faptul că s-a realizat atât de mult folosind un așa mic număr de enzime ne dă o idee asupra potențialului lor extraordinar. Întrebarea pe care și-o punea în 1926 J. B. S. Haldane, unul dintre părinții cineticii enzimatică, este valabilă azi mai mult ca oricând: „why make a chemical when a bug can do it for you?”

## *Partea I. Studiu documentar*



Motto:

*Messieurs, c'est les microbes qui auront le dernier mot.*

Louis Pasteur

## 1. Amilaze. Obținere, proprietăți, utilizări.

### 1.1. Generalități privind enzimele amilolitice

Amilazele fac parte din clasa hidrolazelor. Ele catalizează hidroliza legăturilor glicozidice din macromoleculele polizaharidelor.

Se împart în două grupe mari, după poziția legăturilor asupra cărora acționează [1.1]:

- $\alpha$ -1,4-glucaze
- $\alpha$ -1,6-glucaze

Fiecare clasă cuprinde mai mulți reprezentanți (figura 1.1), dintre care cei mai importanți pentru industria chimică, pentru obținerea fermentativă a alcoolului etilic, sunt:

- $\alpha$ -amilaza ( $\alpha$ -1,4-gluca-4-glucahidrolaza, E.C. 3.2.1.1.)
- glucoamilaza sau amiloglucozidaza (AMG) ( $\alpha$ -1,6-gluca-4-glucahidrolaza, E.C. 3.2.1.3.)

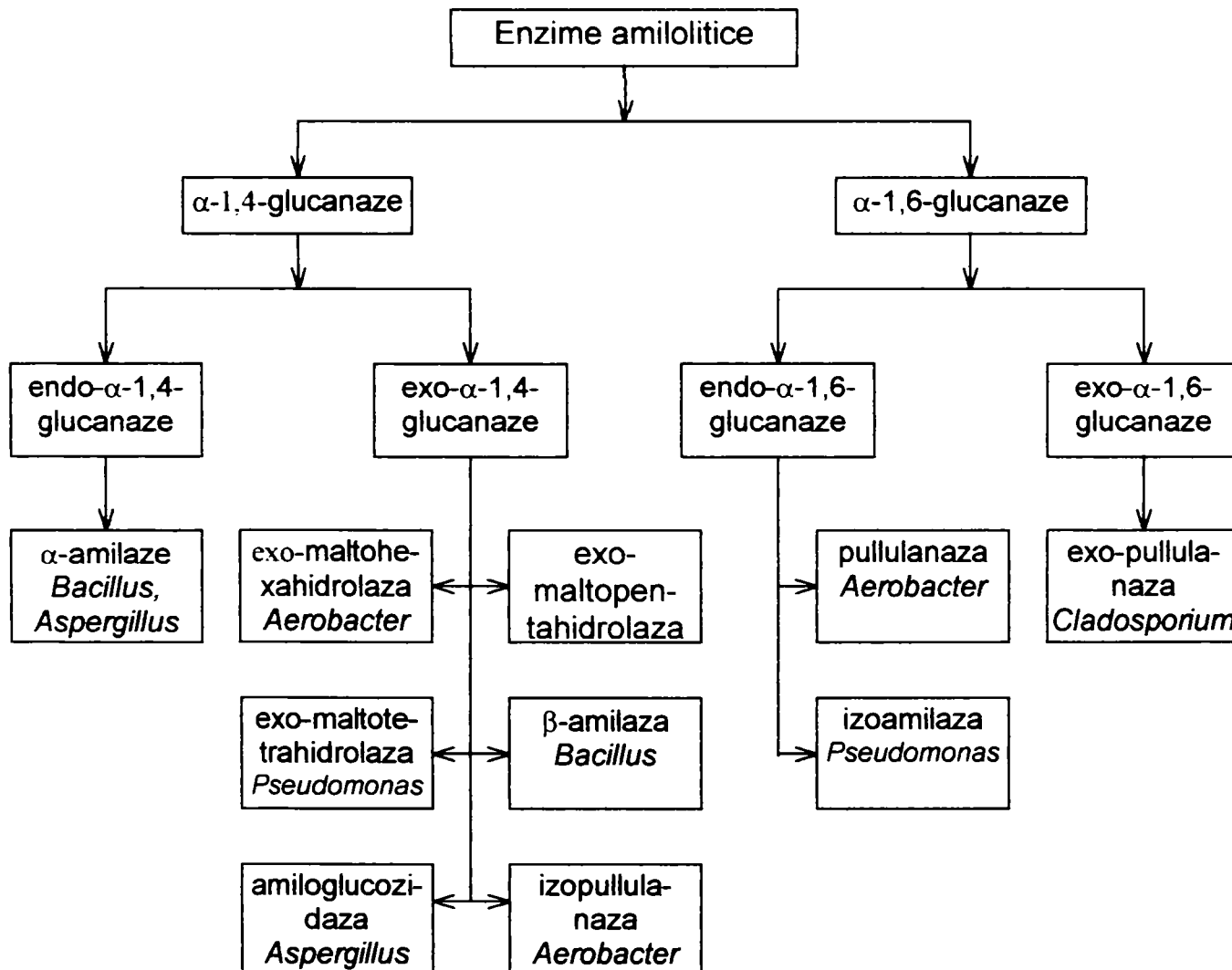


Figura 1.1. Clasificarea enzimelor amilolitice de interes industrial

Există diferite criterii de clasificare a amilazelor în funcție de stabilitatea termică, toleranța față de săruri, producerea sau neproducerea de glucoză, maltoză, ciclodextrine, etc. De fapt, fiecare amilază are o structură diferită, în funcție de materialul (vegetal, animal, bacterian, fungic) din care a fost separată, are nuanțe diferite de specificitate și chiar aceeași enzimă, dacă acționează în medii diferite, prezintă diferențe în ceea ce privește specificitatea sa [1.2]. Caracteristicile amilazelor variază în funcție de sursa de proveniență (tabelul 1.1.) [1.3].

Tabelul 1.1. Caracteristici ale enzimelor amilolitice

Enzima	Sursa	pH-ul optim de acțiune	Temperatura optimă de acțiune, °C
$\alpha$ -Amilază (EC 3.2.1.1)	Salivă umană	6.9	50
	Pancreas	6.9	
	<i>Aspergillus oryzae</i>	5.5	55
	<i>Aspergillus niger</i>	3.5	65
	<i>Bacillus subtilis</i>	6.5	75-92
	<i>Bacillus licheniformis</i>	6.5	80-105
	Orz germinat	5.8	75
$\beta$ -Amilază (EC 3.2.1.2)	Orz	5.2	63
	Microorganisme	5.0-7.5	
Pullulanaza (EC 3.2.1.41)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6.0	50-55
Izoamilază	<i>Pseudomonas</i>	3.5	50-55
Amiloglucozidază (EC 3.2.1.3)	<i>Rhizopus</i>	4.8	55
	<i>Aspergillus niger</i>	4.2	60

## 1.2. Obținerea și purificarea amilazelor

### 1.2.1. Generalități

Pentru obținerea preparatelor enzimaticice sunt folosite surse accesibile, cu potențial productiv ridicat, ieftin și ușor prelucrabil. Aceste surse pot fi de origine vegetală (semințe, cereale germinate sau negerminate, rădăcini, frunze, etc.), animală (ficat, pancreas, mucoasa stomacală, intestinală, etc.) și de origine microbiană (bacterii, drojdii, fungi). Față de sursele de natură vegetală sau animală, culturile de microorganisme prezintă o serie de avantaje:

- se obțin enzime în cantități mari, pe medii de cultură ieftine (tărâțe de grâu, melasă, șroturi de soia, de floarea-soarelui, etc.);
- ciclul de creștere este mai scurt și nu necesită terenuri cultivate;
- producerea enzimelor poate fi reglată prin selectarea de tulpini înalt productive și prin modificarea condițiilor de cultură.

Indiferent de sursa de materii prime, prelucrarea lor în vederea obținerii preparatelor enzimaticice este în general aceeași (figura 1.2.) [1.4].

După extracție, preparatele enzimaticice pot fi utilizate ca atare, în stare brută sau după o prealabilă purificare. În general, dacă nu este necesară o purificare avansată, se folosește doar o treaptă de purificare, mai ales precipitarea.

Importanță practică prezintă în special  $\alpha$ -amilazele de lichefiere din *Bacillus* și *Aspergillus* și glucoamilazele din *Aspergillus*. Enzimele obținute ca preparate brute sau parțial purificate acționează ca enzime "libere" în mediile pe care urmează să le

transforme. În prezentul referat vor fi prezentate în principal  $\alpha$ -amilazele și amiloglucozidazele de origine fungică, mai ales cele din genul *Aspergillus*.

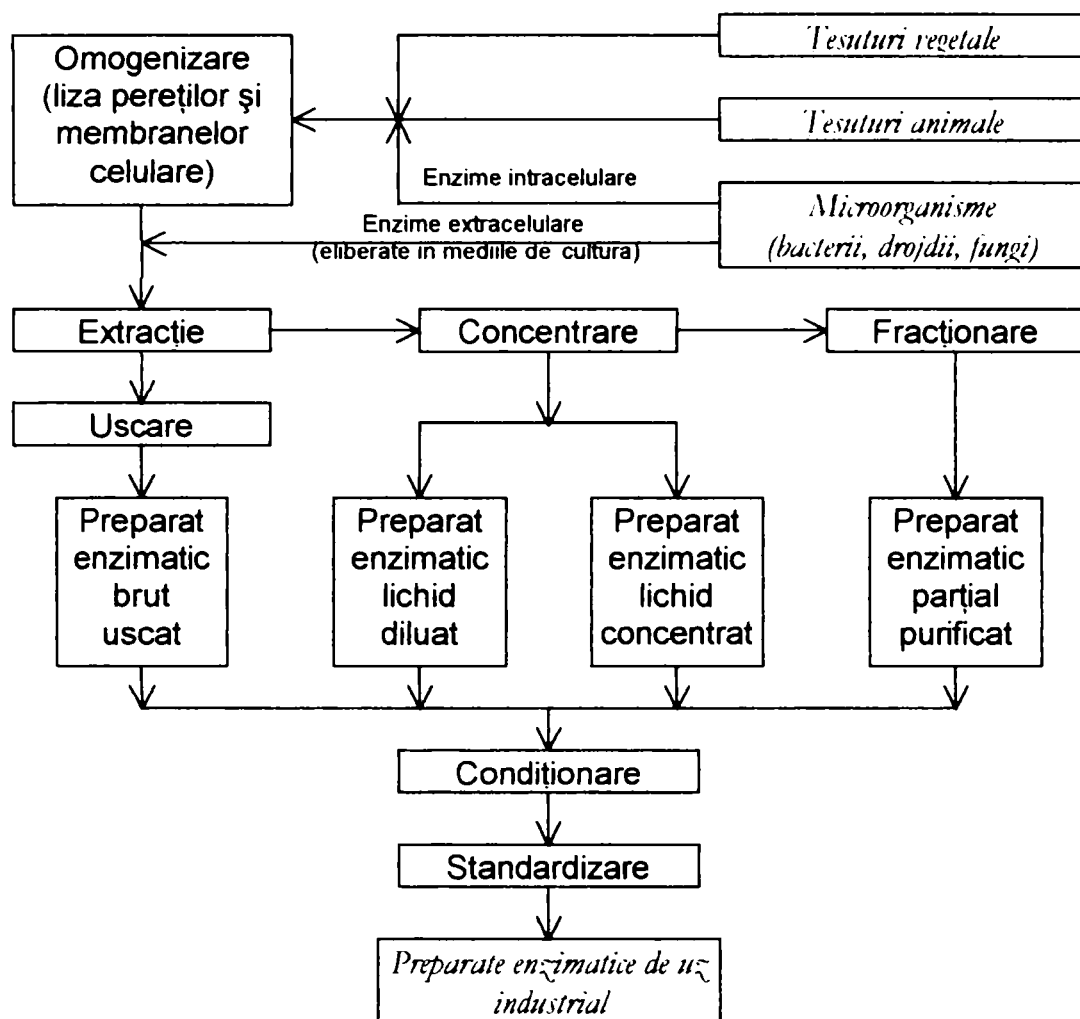


Figura 1.2. Schema generală de obținere a preparatelor enzimatiche

### 1.2.2. Biosinteza $\alpha$ -amilazelor fungice

$\alpha$ -Amilazele, alături de  $\beta$ -amilaze, se găsesc în malț. Totuși, enzimele industriale se produc din pancreas și din culturi microbiene de bacterii, fungi, drojdii. Diversele tipuri de  $\alpha$ -amilaze diferă prin specificitate, pH optim și stabilitate termică.

Principala sursă de  $\alpha$ -amilaze este genul *Aspergillus* (mai ales *Aspergillus oryzae* și *Aspergillus niger*). Pentru acțiunea  $\alpha$ -amilazelor este caracteristic următorul spectru de dextrine: G1 8%, G3 32%, G4 18%, G5 9%, G6 4%, dextrine mai mari 17%.  $\alpha$ -Amilazele fungice diferă de cele bacteriene în spectrul de zaharide produse din amidon, ducând în final la maltoză și puțină glucoză. Au o stabilitate termică mai scăzută, dezactivându-se la temperaturi cu 20°C mai joase ca cele bacteriene, cum sunt enzimele mezofile din *Bacillus*.

$\alpha$ -Amilaza din *Aspergillus oryzae* a fost prima enzimă microbiană produsă industrial și a fost obținută prin culturi în mediu solid timp de mulți ani. În ultimii ani s-a trecut la obținerea enzimei prin fermentare în mediu submers, proces care nu a fost lipsit de o serie de probleme, deoarece majoritatea preparatelor conțin și alte enzime, mai ales amiloglucozidază, iar preparatele au un spectru mai îngust de activitate [1.5].

*Aspergillus oryzae* este cea mai utilizată tulpină fungică pentru obținerea de  $\alpha$ -amilază, însă condițiile de obținere sunt în cea mai mare parte confidențiale.

$\alpha$ -Amilaza este produsă în cantități semnificative în culturi de suprafață. Componenta de bază a mediului o constituie tărâțele de grâu. Uneori se utilizează soluții ușor acide pentru menținerea umidității tărâțelor, dar s-a dovedit că acidul este dăunător producerii de amilază. Timpul de incubare necesar atingerii unui randament maxim variază între 1-4 zile [1.5].

Vallier și colab. au produs enzimă pe mediu Czapek completat cu zaharoză și amidon. În condițiile lor, o însemnată cantitate de enzimă a fost decelată în miceliu, lizat prin ajustarea pH-ului la 8,8, dar enzima eliberată s-a dovedit a fi instabilă dacă nu era stabilizată prin adăugare de amidon sau pH-ul ajustat corespunzător. Cantitatea maximă de activitate enzimatică în supernatantul final de cultură a fost obținută la un profil de pH în trepte, de 6,0, 7,2 și 8,8 [1.6].

Kundu și Das au studiat comparativ cultura de suprafață pe mediu lichid cu cea în mediu submers agitat și au obținut o producție de  $\alpha$ -amilază în culturi în flacoane agitate mai mare decât în culturi de suprafață, în aproape toate mediile testate [1.7].

Nikolov și colab. au utilizat un mediu conținând amidon, extract de malț și săruri și au obținut o producție maximă în 54 ore. Au determinat de asemenea viteza optimă de aerare [1.8].

Yabuki și colab. au studiat inducerea producerii de  $\alpha$ -amilază cu diverși carbohidrați. Ei au obținut activitățile cele mai mari pentru maltoză, apoi pentru  $\alpha$ -metil-D-glucozid și, pe baza observațiilor lor experimentale, au propus un mecanism alternativ pentru inducerea de enzimă [1.9].

Folosind un spectru de compuși similari ca surse de carbon, Malik și Chaudhari au găsit că amidonurile și tărâțele au dat activități enzimatiche mai mari ca maltoza sau dextrinele [1.10].

Meyrath și Bayer au arătat că producerea de amilază este favorizată de substraturile cu legături  $\alpha$ -1,4-glucozidice și nu de monozaharide sau compuși cu alte tipuri de legături glicozidice, iar producerea de enzimă este mărită de excesul de ioni de amoniu. Autorii au susținut că prezența de proteaze în cultură ar fi avantajoasă pentru producerea de amilază [1.11].

Ulbrich și colab. au susținut că  $\alpha$ -amilaza nativă din *Aspergillus oryzae* nu este atacată de proteaza produsă în aceeași fermentație, ci doar denaturată [1.12].

Meyrath și Bayer au susținut de asemenea că prin cultivare pe substrat solid s-au obținut productivități mai mari decât prin cultură în mediu submers, prin dezvoltarea fermentației tradiționale orientale pe substrat solid, numită "coji" [1.11].

Borriss și Eberhardt au utilizat noi mutanți de *A. oryzae* pentru producerea de  $\alpha$ -amilază. Ei au utilizat un mediu conținând malț, amidon și o soluție de săruri Czapek Dox într-un fermentator de 1 litru, 37°C, aerare la 50 l/h, timp de cultură de 4 zile [1.13].

Terebiznik și colab. au obținut, prin culturi pe mediu solid de tărâțe de grâu umectate folosind *A. oryzae* NRRL 3485, activități ridicate de  $\alpha$ -amilază (500-700 unități/mg proteină în extractul apos, cu o concentrație de enzimă de ~0,15 g/l), produsul separat și purificat fiind liber de  $\alpha$ -glucozidază, amiloglucozidază și contaminanți colorați [1.14].

O interesantă variantă de cultură pe mediu solid a fost prezentată de M. A. Murado și colab. care au produs amilază pe spume poliuretanică de diferite caracteristici, cu diferite volume de fază lichidă și de concentrații de substrat, până la nivel de instalație industrială. Ei au propus un model empiric care permite un control mai simplu al procesului decât în cazul culturilor submerse. Ei au interpretat principalele caracteristici cinetice ale sistemului în termenii efectelor difuzionale intra și interparticule,

care au o influență determinantă asupra variabilelor de bază, cum sunt activitatea apei și transferul de gaze [1.15].

M. Carlsen și colab. au obținut  $\alpha$ -amilază prin cultivarea continuă a unei tulpini de *A. oryzae* pe un mediu bine definit chimic, glucoza fiind componenta limitativă de creștere. În culturi de stare staționară s-a determinat că vitezele de consum al zaharurilor, al oxigenului și de producere de dioxid de carbon sunt funcții liniare de creștere a biomasei. Determinările de consum de stare staționară a glucozei au arătat că *A. oryzae* are un sistem eficient de reținere a glucozei, la o concentrație de  $\sim 6$  mg/l. Prin experimente în puls, aplicate sistemului de stare staționară, s-a determinat că reținerea glucozei este reglată în cel puțin două nivele, cu constante de timp de 30-40 min. și respectiv de câteva ore. Experimentele au arătat o represie semnificativă a  $\alpha$ -amilazei de către glucoză, la concentrații de 10 mg/l. Producerea de  $\alpha$ -amilază a fost strâns legată de dezvoltarea fungului, dovedindu-se că pentru o producție mare de proteină extracelulară este esențială creșterea și buna dezvoltare a miceliului [1.16]. A fost elaborat un model morfologic al miceliului, pentru a descrie creșterea sa și producerea de metaboliți de către fungii filamentoși [1.17]. Aceeași autori au arătat că un miceliu mai dens este mai eficient pentru producerea de  $\alpha$ -amilază și au elaborat un model morfologic al miceliului, pentru a descrie creșterea sa și producerea de metaboliți de către fungii filamentoși [1.17, 1.18].

Deși majoritatea producătorilor utilizează *A. oryzae* pentru producerea de  $\alpha$ -amilază, au fost studiate și alte surse.

Astfel, o tulpină selecționată de *A. niger*, crescută pe un mediu conținând cartofi și amidon, a produs în primul rând  $\alpha$ -amilază și puțină amiloglucozidază. Jarniewicz și colab. au studiat parametrii de ridicare la scară în fermentatoare agitate și aerate [1.19]. Ilczuk și colab. au obținut o îmbunătățire a activității  $\alpha$ -amilazice și amiloglucozidazice prin mutații ale unei tulpini de *A. niger* [1.20].

Mencinicopschi și colab. au descris biosinteza  $\alpha$ -amilazei din culturi de *A. niger* ICA-3.76, pe un mediu de cultură conținând făină de porumb, amidon de porumb, de cartofi și maltodextrină de cartofi (fluidizate cu  $\alpha$ -amilază bacteriană), plus extract de porumb. În primele 24 ore, producerea de  $\alpha$ -amilază a fost paralelă cu dezvoltarea miceliului, apoi a stagnat 24 ore, fiind din nou reluată și atingând maximum după 65-70 ore. Ei au sugerat că inducția  $\alpha$ -amilazei s-a făcut în două stadii cu rate înalte și scăzute de formare a enzimei și au descris, pe baza rezultatelor experimentale, mecanismul probabil de inducție [1.4].

În literatură sunt prezentate de asemenea ca surse de  $\alpha$ -amilază: *A. flavus* [1.21, 1.22], *A. awamori* [1.23, 1.24], *A. kawachii* [1.25, 1.26, 1.27], *A. fumigatus* (*A. sp.*) [1.28, 1.29], *Thermomyces lanuginosus* (termofilă) (inițial *Humicola lanuginosa*) [1.30], *Thermoascus aurantiacus* (termofilă) [1.31], *Mucor sp.* [1.32] etc.

### 1.2.3. Biosinteza amiloglucozidazei fungice

Amiloglucozidaza este produsă de o serie de microorganisme de natură fungică (*Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*), bacteriană (*Aerobacter*, *Clostridium*) și de drojdii [1.33].

Speciile cele mai utilizate pentru producția industrială sunt *A. niger* și *A. oryzae*. Acești fungi produc însă în mod obișnuit și o altă enzimă, transglucozidază, care catalizează reacția dintre glucoză și alte zaharide (cu masă moleculară mai mare) cu formare de oligozaharide. Acești produși afectează randamentul în glucoză și împiedică cristalizarea sa. De aceea, pentru cultivare sunt selecționate tulpini care produc cantități reduse de transglucozidază. În general, dacă se utilizează tulpini de *Aspergillus*, metoda



de cultivare este cea a culturilor submerse, dar și cea pe mediu solid, iar în cazul tulpinilor de *Mucor* și *Rhizopus* se utilizează culturile de suprafață. Mediile utilizate pentru producerea amiloglucozidazei în culturi submerse conțin în mod uzual concentrații mari de substanțe organice (12-20%). Pot fi folosite substanțe amidonoase ca: porumb, grâu, orz, ovăz, sorg (acestea asigurând și necesarul de azot), precum și săruri anorganice (săruri de amoniu) [1.33, 1.34].

Formarea amiloglucozidazei este stimulată prin introducerea în mediul de cultură a extractului de drojdie. Pentru obținerea unui randament ridicat este necesar ca pH-ul mediului să fie acid. În cazul utilizării tulpinilor de *A. niger*, pH-ul culturilor scade la sfârșitul fermentației până la 2,8 datorită secretării de acizi organici în sistem [1.5].

Enzima din *Rhizopus sp.* se produce prin fermentație în fază solidă în Japonia și are avantajul că nu produce transglucozidază, dar în același timp este mai puțin stabilă termic [1.34].

Preparatul enzimatic de *Aspergillus niger* produce transglucozidază, ceea ce scade randamentul prin generarea de oligozaharide  $\alpha$ -1,6-ramificate. S-au pus la punct tehnici de reducere sau eliminare a acestei enzime, dintre care cea mai elegantă este obținerea de mutanți care nu o produc [1.35].

Astăzi *Aspergillus niger* este sursa de enzimă cea mai utilizată la hidroliza industrială, cu mici excepții. Uzual, enzima se produce în fermentatoare cu agitare și aerare, utilizând medii pe bază de porumb, de obicei pretratate cu  $\alpha$ -amilază bacteriană, conținând tipic 5-20% făină grosieră, uneori completată cu amidon de porumb și alte componente [1.35-1.38].

Mediul poate fi suplimentat cu săruri anorganice [1.35, 1.38]. Amoniacul gazos sau hidroxidul de amoniu au fost utilizate pentru menținerea pH-ului la ~5,5, demonstrându-se o creștere a randamentului cu 60% dacă se introduc de la început săruri de amoniu și dacă se menține pH-ul la 4,0 cu NaOH. De obicei se folosește un inocul cu același mediu ca cel din fermentator.

Barton și colab. au studiat inducerea de enzimă utilizând numeroși carbohidrați în culturi pe mediu de bază de sorbitol. În aceste condiții, maltoza și izomaltoza au fost mult mai eficiente decât amidonurile și monozaharidele [1.39].

Uguru și colab. au utilizat ca sursă de carbon coji de cartofi, în cultura în flacoane agitate a unei tulpini termofile de *Aspergillus niger*. Producerea maximă de enzimă s-a făcut în a 4-a zi de fermentație, dintr-un ciclu de fermentație de 6 zile, timp care a corespuns fazei staționare incipientă a organismului. Greutatea miceliului uscat nu a fost afectată semnificativ utilizând amidon sau coji de cartofi ca surse de carbon. În schimb, s-a obținut o activitate enzimatică mai mare la creșterea organismului pe acest mediu [1.40].

Lasater și Smith au utilizat o tulpină de *Aspergillus niger* pentru producerea simultană a  $\alpha$ -amilazei și amiloglucozidazei, preparatul obținut fiind potrivit pentru zaharificarea făinii de porumb fără adăugare separată de malț [1.41].

Li și colaboratorii au utilizat, pentru obținerea concomitentă a  $\alpha$ -amilazei și a AMG o metodă de obținere cu spori de *A. niger* germinați în granule de alginat și i-au utilizat repetat în cicluri de fermentații de 4 zile în flacoane agitate [1.42]. Organismul imobilizat a reținut capacitatea de a produce enzime în 11 cicluri, în timp ce randamentul pentru miceliul liber a scăzut mult după al 2-lea ciclu.

*A. niger* produce mai multe forme de AMG. Lineback și colab. [1.43] au găsit două forme, diferind prin punctul izoelectric, dar cu proprietăți antigenice și enzimatiche similare și secvență N-terminală identică. Cele două forme sunt ușor separabile prin

cromatografie pe coloană. Se poate obține o singură formă, dacă se utilizează un mediu de cultură conținând glucoză și săruri de amoniu.

*A. awamori* produce trei forme de enzimă, dintre care una singură are capacitatea de a hidroliza amidonul. Autorii au propus un mecanism pentru producerea diverselor forme. Au obținut de asemenea mutanți care nu au produs și proteaze. Ei au atribuit abilitatea de a digera amidonul unui situs de legătură diferit de situsul activ, aflat într-o regiune clivabilă cu subtilizină sau proteaze endogene [1.44-1.46].

Din amiloglucozidaza comercială produsă de Novo au fost izolate două fracțiuni,  $G_1$  și  $G_2$ , care digeră ambele amidonul, cărora li s-a determinat secvența completă de aminoacizi. Au masele moleculare de 71000 și 61000.  $G_2$  este mai mică, lipsindu-i un fragment C-terminal prezent în  $G_1$  [1.47, 1.48].

#### 1.2.4. Purificarea enzimelor amilolitice

Enzimele se izolează la nivel industrial cu diverse scopuri, folosind întregul spectru de tehnici accesibile în chimia proteinelor. Enzimele intracelulare necesită un procedeu inițial suplimentar de extracție, pe când cele extracelulare nu. Dar, o dată ce enzima a fost eliberată din celule, tehnicile utilizate pentru purificare variază relativ puțin, indiferent de sursa de enzimă. Deși atât tehnicile de purificare industrială cât și cele la scară de laborator se bazează pe aceleași principii, există totuși diferențe, în funcție de scopul de separare și purificare propus.

Purificările la scară de laborator se bazează de obicei pe tehnici analitice și au ca scop obținerea unui produs omogen și purificat. În acest caz se acceptă pierderi apreciabile, determinant fiind factorul de purificare, chiar în detrimentul randamentului global. Pentru a obține produse înalt purificate, se acceptă chiar și metode scumpe, cum este de exemplu cromatografia de afinitate.

În cazul izolării enzimelor industriale, trebuie să se ia în considerare costurile de producție, strâns legate de valoarea produsului final. Se acordă o importanță deosebită randamentului, respectiv recuperării produsului. Unele tehnici de extracție sau purificare la scară de laborator nu sunt potrivite pentru manipularea la scară mare. Este cazul de exemplu al electroforezei.

Principalele surse de obținere a proteinelor, și implicit a enzimelor, sunt țesuturile animale, microorganismele (bacterii, fungi, drojdii), țesuturile și sucurile de plante. Dacă enzimele sunt extracelulare, ele sunt secretate direct în mediul de cultură. După ce fermentația este terminată, microorganismele se separă prin centrifugare sau filtrare. Soluțiile enzimatică obținute sunt de obicei concentrate, pentru a reduce volumele de lichid manipulate. O metodă practică de separare a diferitelor tipuri de proteine este precipitarea unora dintre componente, indusă prin modificarea unor proprietăți ale solventului. Distribuția resturilor hidrofile și hidrofobe la suprafața și în interiorul moleculei proteice afectează solubilitatea în diferiți solvenți. Proprietățile de solvent ale apei pot fi manipulate în vederea modificării solubilității proteinelor prin modificarea tăriei ionice, a pH-ului, prin adăugare de solvenți organici miscibili, polimeri sau alte componente inerte, respectiv a temperaturii.

Principalele tehnici de purificare, valabile și în cazul amilazelor, sunt:

- precipitarea fracționată cu săruri neutre,
- precipitarea cu solvenți organici miscibili cu apa, ca acetona sau etanolul,
- cromatografia de schimb ionic,
- cromatografia de excluziune sterică (gel-filtrarea),
- cromatografia de interacțiune hidrofobă,

- cromatografia de afinitate.

Uneori se folosesc tehnici mai speciale și mai puțin uzuale, cum sunt:

- focusarea izoelectrică,
- electroforeza preparativă,
- cromatografia de lichide de înaltă performanță preparativă, etc.

Principala problemă care apare în timpul purificării este pierderea de activitate, din cauza naturii proteice a enzimelor. Enzimele extracelulare fac excepție de la regulă deoarece, fiind destinate de la început să acționeze într-un mediu advers, sunt mai stabile. Denaturarea poate fi minimalizată dacă se evită principalele cauze ale denaturării (pH, temperatură, solvenți organici).

Principali factori denaturanți sunt:

- temperatura, pH-ul, solvenții organici; denaturarea se minimizează prin utilizarea unui domeniu de pH adecvat, respectiv precipitarea la temperaturi reduse (chiar sub 0°C);
- concentrația soluțiilor proteice; soluțiile enzimatiche diluate se dezactivează rapid; se evită prin utilizarea de proteine inerte (ca albumina serică bovină);
- inactivarea reversibilă sau ireversibilă a situsului catalitic, prin pierderea cofactorilor sau modificarea unor legături covalente (de exemplu oxidarea grupărilor SH); se evită prin adăugare de cofactor, complexarea cu cationi metalici, adăugarea de reactivi cu grupări SH, etc.;
- degradarea sub influența proteazelor prezente în sistem; se evită utilizând inhibitori specifici ai proteazelor.

La purificarea unui preparat enzimatic se au în vedere următoarele scopuri:

- puritate maximă a produsului,
- reproductibilitatea procesului,
- eficiența economică a procesului.

La purificarea enzimelor amilolitice au fost utilizate unele din metodele amintite mai sus. Chiar dacă condițiile de cultură sunt optimizate, tulpinile de *Aspergillus* produc și o serie de alte enzime și alte molecule organice, impunându-se astfel necesitatea purificării acestora. Metodele uzuale de purificare sunt precipitarea cu sulfat de amoniu și precipitarea cu solvenți organici, însă uneori este necesară utilizarea unor metode care să ducă la un grad de puritate mai avansată.

Preparatele  $\alpha$ -amilazice uzuale se prezintă sub formă condiționată cu grade diferite de puritate. Există preparate  $\alpha$ -amilazice sub formă de soluție concentrată și stabilizată. Acestea se obțin prin filtrarea biomasei, urmată de o concentrare până la ~ 50% S. U. și adăugare de substanțe cu efect stabilizant.

Un preparat de puritate relativ mare se poate obține astfel: lichidul perfect limpede obținut după filtrarea biomasei este concentrat până la 1/5 din volumul său apoi supus precipitării cu acetonă în proporție de 50%. Preparatul solid obținut se spală cu acetonă și se usucă corespunzător [1.49].

În vederea obținerii unor preparate enzimatiche înalt purificate se utilizează metodele specifice de purificare a proteinelor. Vor fi prezentate câteva exemple.

M. Brena și colab. au realizat o exhaustivă trecere în revistă a metodelor cromatografice utilizate în separarea și purificarea amilazelor [1.50].

$\alpha$ -Amilaza de *A. oryzae* a fost separată din soluție apoasă și purificată prin cromatografie pe DEAE-Sepharose (eluare cu NaCl 0,2 M, pH 5), apoi cromatografie de afinitate pe concavalina A-Sepharose (eluare cu  $\alpha$ -D-metilmanozidă 7,5 mM). S-a obținut o enzimă cu o activitate specifică de 2000 U/mg proteină, la un randament de



recuperare de 60%, fără alte activități enzimatică. Puritatea a fost verificată prin electroforeză pe gel și centrifugare în gradient de zaharoză [1.14].

Într-o altă variantă, Park și colab. au purificat  $\alpha$ -amilaza din *Aspergillus sp.* JP-1 de aprox. 80 ori, cu un randament de 16,5%, prin fracționare cu sulfat de amoniu și gel-cromatografie pe Sephadex G-150 [1.51].

Planchot și Colonna au purificat  $\alpha$ -amilaza din *Aspergillus fumigatus* (*Aspergillus sp.* K-27) până la omogenitate prin dializă față de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  50 mM, pH 5,5,  $\text{CaCl}_2$  5 mM și apoi cromatografie pe schimbători de ioni (DEAE-celuloză) și de afinitate ( $\alpha$ -ciclodextrină-Sepharose) [1.52].

Abou-Zeid a purificat  $\alpha$ -amilaza de *Aspergillus flavus* până la omogenitate prin adsorbție pe amidon [1.21].

Metodele de purificare sunt similare, indiferent de sursa microbiană utilizată. De aceea sunt caracteristice exemplele prezentate în continuare.

Zarnea și colab. [1.5] citează o metodă de purificare a  $\alpha$ -amilazei din *Bacillus subtilis* NRRL-B 3411 (enzimă Monsanto) în mai multe etape. Enzima se precipită din soluție de acetat de calciu 2% cu acetonă rece până la 45-50% saturație. Precipitatul separat a fost redizolvat în soluție de acetat de calciu 0,1% și clorură de sodiu 0,2%, iar soluția a fost agitată pe DEAE-celuloză pentru îndepărtarea pigmentilor contaminanți. Filtratul a fost încălzit 30 min. la 75°C pentru inactivarea proteazelor acide și neutre existente în materialul enzimatic, apoi dializat contra unei soluții de acetat de calciu 0,1% - clorură de sodiu 0,1% și percolat pe o coloană de hidroxiapatită în acetat de calciu 0,1%. Enzima a fost apoi eluată cu fosfat de potasiu 0,1M, pH 7, soluția dializată contra acetat de calciu și liofilizată. Urmele de protează neutră au fost inactivate cu diizopropilfluorofosfat. S-a obținut o enzimă cu activitate de  $3 \times 10^5 - 6 \times 10^6$  U/g, la un randament de recuperare a activității enzimatică de 60%.

Chang și colab. au descris purificarea  $\alpha$ -amilazei industriale din *Bacillus subtilis* prin extracție lichid-lichid cu miclele inverse de Aliquat 336/izooctan, folosind drept cosolvent n-butanol sau n-octanol 0,4-2,0%, iar ca fază apoasă soluții tampon de acid citric-fosfat monopotasice 30 mM, pentru pH 2-9 sau borax-NaOH pentru pH 9-12 [1.53-1.55].  $\alpha$ -Amilaza a fost purificată de 1,5 ori, la un randament de recuperare de 85%.

Zhang și colab. au obținut o  $\alpha$ -amilază termostabilă din *Bacillus sp.* JF 2 prin purificare într-o singură etapă prin cromatografie de afinitate pe suport de granule de amidon, obținând o activitate specifică finală de  $1,2 \times 10^5$  U/mg, la un randament de recuperare de 85% [1.56].

Tulpinile înalt producătoare de amiloglucozidază produc în mod inevitabil și cantități mari de transglucozidază. O variantă de eliminare a transglucozidazei este menținerea la pH 1,8 un anumit timp. Altă variantă este gel-filtrarea pe Sephadex G-100. Transglucozidaza este eluată prima, apoi un amestec de transglucozidază și amiloglucozidază și în final amiloglucozidaza. Randamentul este de 55% [1.57].

### 1.3. Caracterizarea amilazelor

#### 1.3.1. Caracterizarea $\alpha$ -amilazei

$\alpha$ -Amilazele sunt enzime specifice pentru hidroliza legăturilor  $\alpha$ -1,4-glucozidice. Se mai cunosc și sub denumirea de amilază dextrinogenică sau de lichiefiere, diastază, glucogenază,  $\alpha$ -1,4-glucoză-4-glucohidrolază (EC.3.2.1.1.) [1.3].

Sunt endo-enzime care atacă legăturile  $\alpha$ -1,4-glucozidice în orice loc din catena unor zaharide (cu minim 3 unități de D-glucoză) ca amidon, glicogen sau alte polizaharide înrudite, ocolind însă punctele de ramificare. În urma atacului, într-un prim

stadiu sunt rupte 10-17% din totalul legăturilor  $\alpha$ -glucozidice, rezultând dextrine cu gradul de polimerizare 6-10. Acest stadiu se recunoaște prin scăderea bruscă a vâscozității și dispariția culorii cu iodul (acțiune de dextrinificare). Urmează apoi hidroliza lentă a  $\alpha$ -dextrinelor cu formare de maltoză, izomaltoză și maltotrioză (acțiune de zaharificare). Compoziția produsului final variază cu natura substratului și cu proveniența enzimei [1.4].

$\alpha$ -Amilazele sunt metalo-proteine care conțin calciu în proporție de 1 atom-gram/moleculă. Prin îndepărtarea calciului, ele devin inactive și instabile termic. Calciul nu participă direct la formarea complexului enzimă-substrat, dar menține molecula de enzimă în configurația optimă pentru un maxim de activitate și stabilitate. În practică, la hidroliza amidonului se adaugă calciul sub formă de săruri.

În general, enzimele prezintă activitate la un pH cuprins între 4 și 7, pH-ul optim depinzând de originea enzimei. Stabilitatea termică variază de asemenea în funcție de natura enzimei, cele de origine bacteriană sunt mai stabile termic decât cele de origine fungică.

$\alpha$ -Amilazele fungice produse de specii ale genului *Aspergillus* au domeniul de activitate la pH cuprins între 3,0-7,0 și temperaturi optime situate în intervalul 20-60°C. Au o rezistență termică mai redusă ca cele bacteriene și se inactivează înainte ca amidonul să se gelatinizeze. De aceea ele se stabilizează, de exemplu, cu amidon sau zaharoză.

Se împart în:

- $\alpha$ -amilaze acidostabile (produse de reprezentanți ai grupului "*niger*"), care au ca aminoacid N-terminal alanina, iar ca aminoacid C-terminal valina, iar masa moleculară este 58.000.
- $\alpha$ -amilaze acidolabile (produse de reprezentanți ai grupului "*oryzae*"), care au ca aminoacid N-terminal leucina, iar ca aminoacizi C-terminali serina, glicina și alanina, masa moleculară fiind 51.000.

$\alpha$ -Amilaza din *Aspergillus oryzae* are masa moleculară de 51.000, determinată prin LALLS (low-angle-laser-light-scattering) și cromatografie de înaltă presiune pe gel de silice [1.58].

Enzima nu conține resturi de carbohidrați. Conține o grupare -SH per mol și 1-10 atomi gram de  $\text{Ca}^{2+}$  per mol enzimă. S-a determinat că doar unul din ionii de  $\text{Ca}^{2+}$  este cuplat cu gruparea -SH, ceilalți putând fi îndepărtați prin dializă fără pierderea activității enzimatice. Grupa -SH din  $\alpha$ -amilaza fungică nu participă direct în procesul catalitic, dar prin legarea calciului contribuie la menținerea conformației active catalitice a moleculei proteice.

Prezintă o stabilitate termică relativ redusă. Enzima cristalizată suferă o degradare termică rapidă la temperaturi peste 45°C, fiind inactivă la 55°C. Pentru preparatul brut, temperatura de dezactivare a fost cu cel puțin 10°C mai mare ca pentru cel cristalizat [1.59].

Terebiznik și colab. au arătat că eliminarea apei de cristalizare din  $\alpha$ -amilaza de *Aspergillus oryzae* mărește mult stabilitatea termică. O termostabilitate deosebită se observă în prezența trehalozei, chiar până la temperatura de 100°C. Activarea, respectiv dezactivarea depind de conținutul de apă din sistem, deoarece în lipsa apei trehaloza cristalizează, formează fază separată și nu se mai asociază cu enzima [1.60].

Enzima este activă în domeniul de pH de 3,5-6,0, la 30°C. pH-ul optim este de 4,5. La creșterea pH-ului activitatea scade, la pH 6 apare inactivarea. Inactivarea în mediu acid depinde de concentrația ionilor de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cu cât pH-ul este mai mic, cu atât

este mai mare cantitatea de ioni de calciu necesară pentru a preveni dezactivarea [1.61].

$\alpha$ -Amilaza produsă de *Aspergillus Y-78* are următoarele caracteristici [1.62]:

- pH-ul optim este 5,0, temperatura optimă la pH optim este de 45-50°C;
- este stabilă în domeniul de pH 6,0-9,0 la 37°C, timp de 24 ore și își pierde activitatea la pH 8,0 prin încălzire la 70°C, timp de 30 min.;
- hidrolizează amiloza, amilopectina și glicogenul până la glucoză, limita de hidroliză fiind mai mare de 95%;
- analiza elementară arată un conținut de carbon de 49,98-50,43%, de azot între 13,18-13,21% și hidrogen 6,78-7,45%;
- spectrul în UV prezintă o curbă tipică pentru proteine, cu un maxim de absorbție la 277-280 nm;
- este ușor solubilă în apă și insolubilă în solvenți organici ca metanol, etanol, acetonă, eter etilic, benzen.

Din *Aspergillus flavus*, Abou-Zeid și colab. au izolat o  $\alpha$ -amilază extracelulară cu masa moleculară 75.000 (gel de poli(acrilamidă)), corespunzând unei singure unități, prezentând o activitate maximă la pH 7 și 30°C. Ioni de  $K^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  și  $Fe^{3+}$  au inhibat puternic enzima. Produsele de hidroliză a amidonului nativ cu enzima de *Aspergillus flavus* au fost glucoza și o serie de oligozaharide neidentificate [1.63].

Das și colab. au obținut o  $\alpha$ -amilază și o amiloglucozidază din tulpini de *Aspergillus awamori* (NRRL 3112) cu pH optim 4,4-5,0 și temperatura optimă 65°C, respectiv 55°C.  $K_m$  și  $V_{max}$  au fost 21,73 mg/ml și 6,66 mg/ml-min pentru  $\alpha$ -amilază și 7,91 mg/ml și 1,66 mg/ml-min pentru amiloglucozidază. Sorbitolul și amidonul măresc stabilitatea ambelor enzime. La zaharificarea amidonului de cartofi într-o singură etapă, timp de 14 ore la pH 4,5 și temperatura de 55°C, s-a obținut un sirop cu 83% echivalent de dextroză, conținând 18,2 g/l glucoză [1.64].

Din  $\alpha$ -amilaza acido-stabilă produsă de *Aspergillus kawachii* (IFO 04308), Kajiwama și colab. au obținut două enzime cu masele moleculare de 108.000 și 58.000 [1.65].

$\alpha$ -Amilaza obținută de Voloshuk și colab. din *A. flavus* are pl 4,3, și conține resturi de glucoză, maltoză și trioze 15 mM [1.66].

Park și colab. au obținut o  $\alpha$ -amilază purificată din *Aspergillus sp.* JP-1 cu masa moleculară de 56 kDa (SDS-PAGE), având un pH optim de 5,5, temperatura optimă de 40°C,  $K_m$  pentru amidon de 2,5 mg/ml. Activitatea enzimei a crescut în prezență de  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ , EDTA,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  și  $Zn^{2+}$  și a fost inhibată de  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  și  $Ni^{2+}$  [1.67].

Mohapatra și colab. au obținut o amilază fungică din *Mucor sp.* cu pH optim 5,0, temperatura optimă de 60°C, timpii de înjumătățire ai enzimei parțial purificate, la 55°C și 60°C, au fost 120 și respectiv 50 min. Energiile de activare și dezactivare au fost 46,0 și 157,05 kJ/mol. Activitatea enzimatică a fost afectată de adăugarea de 3% NaCl, 10 mM  $Ca^{2+}$  și 25 mM  $Mg^{2+}$ , dar a fost inhibată puternic de EDTA [1.68].

Fungul termofil *Thermoascus aurantiacus* IFO 31613 produce două amilaze (I și II) cu masele moleculare 75.000 și 56.000 (omogene electroforetic). Sunt exo și endo-enzime cu pl 5,0 și 4,5. Stabilitatea amilazei II este mărită de  $CaCl_2$ , enzima fiind stabilă la încălzire la 60°C timp de 3 ore. Activitatea amilazei I nu a fost afectată de  $CaCl_2$ , dar a fost mult redusă la 60°C. Temperaturile optime (în prezența  $Ca^{2+}$ ) au fost 65°C respectiv 70°C [1.69].

$\alpha$ -Amilaza acidostabilă produsă de *Aspergillus niger* conține 24 moli manoză și 4 moli hexozamină per mol de enzimă, în timp ce  $\alpha$ -amilaza din *Aspergillus oryzae* nu conține resturi de carbohidrați. Ambele forme conțin o grupă SH per mol de enzimă și 1-10 atomgram  $\text{Ca}^{2+}$ /mol enzimă. Masa moleculară a  $\alpha$ -amilazei fungice acidostabile este de 58000, iar a  $\alpha$ -amilazei acidolabile este 51000 [1.7].

Pentru comparație, în continuare vor fi prezentate proprietățile unor amilaze de origine bacteriană.

$\alpha$ -Amilazele de origine bacteriană pot fi moderat termostabile (cele din *Bacillus subtilis* varietatea *amiloliquefaciens*) și termostabile (cele din *Bacillus licheniformis*), acestea din urmă suportând temperaturi cu 20°C mai mari decât primele [1.3].

$\alpha$ -Amilaza din *Bacillus subtilis* are domeniul de stabilitate la un pH cuprins între 5,6 și 7,0. Temperatura optimă este 50°C în tampon, temperatură care crește la 55°C dacă se adaugă  $\text{CaCl}_2$  0,05 M. Acest lucru se datorează efectului de stabilizare al calciului (figurile 1.3. și 1.4.) [1.10].

Pe de altă parte, adăugarea de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,005 M determină scăderea temperaturii optime la 30°C, datorită efectului de chelatare a  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  asupra calciului și zincului, elemente esențiale pentru structura enzimei [1.11].

Masa moleculară este de 96900. Enzima este un dimer, legat printr-un atom de zinc (masa moleculară determinată prin filtrare pe Biogel este 48420, iar prin ultracentrifugare (metoda echilibrului de sedimentare)  $44900 \pm 2400$ ). Monomerii sunt alcătuiți din două subunități cu masa de aproximativ 24000. La rândul ei, fiecare subunitate constă din două subunități a 12000 și conține doi atomi de calciu. Analizele de compoziție în aminoacizi au arătat că enzima nu conține cistină sau cisteină [1.5]. Inhibitorii enzimei sunt metalele grele, urea și agenții chelatanți [1.70].

Termostabilitatea este o proprietate importantă a preparatelor enzimatică deoarece majoritatea aplicațiilor industriale necesită temperaturi de reacție peste temperatura normală, deci enzime termostabile. De aceea, pe de o parte se caută surse de enzime termostabile, pe de altă parte se încearcă mărirea termostabilității enzimelor existente, de exemplu prin mutagenză direcționată. Mecanismele inactivării enzimelor sunt necunoscute în foarte multe cazuri.

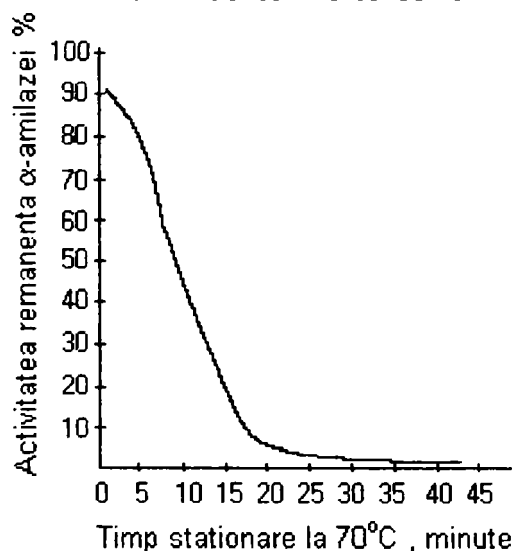


Figura 1.3. Stabilitatea termică a  $\alpha$ -amilazei în lipsa ionilor de  $\text{Ca}^{2+}$  și în lipsa substratului.

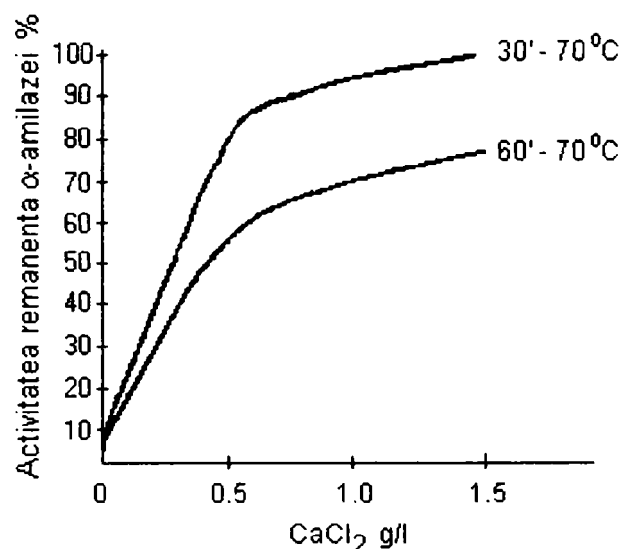


Figura 1.4. Stabilitatea termică a  $\alpha$ -amilazei din *Bacillus subtilis* ICA-1,65 la diferite concentrații de  $\text{Ca}^{2+}$ .



$\alpha$ -Amilazele din *Bacillus amyloliquefaciens* și *Bacillus stearothermophilus* au 60% omogenitate în secvența lor de aminoacizi, dar diferă prin termostabilitate [1.71].  $\alpha$ -Amilaza de *Bacillus amyloliquefaciens* se inactivează ireversibil la pH 5,0, 6,5 și 8,0 printr-un fenomen de agregare. Prezența amidonului suprimă procesul la pH 8,0. S-a determinat că un factor major al dezactivării enzimei este dezaminarea resturilor de glutamină și/sau asparagină. Constrângerile conformaționale sunt cauza dezactivării termice (90°C, pH 5,0, 6,5, 8,0) și în cazul  $\alpha$ -amilazei din *Bacillus stearothermophilus*. În plus, la dezactivarea de la pH 6,5 contribuie și dezaminarea resturilor amidice, iar la cea de la pH 8,0, oxidarea cisteinei. Timpii de înjumătățire ai activității  $\alpha$ -amilazelor de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus* și *Bacillus liqueniformis* la 90°C și pH 6,5 au fost 2 min., 50 min. și respectiv 270 min. [1.72].

Termoinactivarea ireversibilă a  $\alpha$ -amilazei de *Bacillus liqueniformis* este cauzată de dezaminarea resturilor de asparagină și/sau glutamină. Timpul de înjumătățire al enzimei, în condiții similare, este comparativ cu cel al enzimei de *Bacillus stearothermophilus*. În prezența amidonului, se crede că procesul de termoinactivare are loc tot prin dezaminarea resturilor de asparagină și/sau glutamină.

Stabilitatea ridicată la termoinactivare a  $\alpha$ -amilazei termofile, comparativ cu cea mezofilă, se datorează în esență existenței unei punți de sare în plus, cu implicarea a 2 sau 3 resturi de lizină. Aceste interacții electrostatice stabilizează enzima la denaturare termică. Dacă resturile din pozițiile 88 și 253 sunt înlocuite cu lizină și/sau arginină, timpul de înjumătățire al  $\alpha$ -amilazei din *Bacillus stearothermophilus* va crește. Situația este similară în cazul  $\alpha$ -amilazei de *Bacillus amiloliquefaciens* [1.72, 1.73].

$\alpha$ -Amilaza din *Bacillus liqueniformis* CUMC 305 cu activitate maximă la pH 9,0 și 90°C și, în prezența substratului, este complet stabilă la 100°C timp de 4 ore [1.74].

Blakeney și Stone au sugerat că la utilizarea unui mediu de alcool-tampon apos are loc modificarea afinității de substrat a  $\alpha$ -amilazei din *Bacillus liqueniformis*, probabil datorită unor schimbări în subsitusurile centrului activ. Paleta de oligozaharide produse de  $\alpha$ -amilază se modifică cu concentrația de etanol [1.75].

$\alpha$ -Amilaza din *Bacillus acidocaldarius* prezintă o termostabilitate mărită în mediu acid [1.76].  $\alpha$ -Amilaza din *Bacillus liqueniformis* este stabilizată de  $\text{CoCl}_2$  la concentrații de 10-30 ppm și este activă până la 98°C [1.77].

$\alpha$ -Amilaza din *Bacillus subtilis* (5 $\alpha$ -2) are temperatura optimă de 50°C și pH optim 5,0. Preparatul crud pierde 23% din activitate prin încălzire 2 ore în apă la 100°C și își menține 95% din activitate prin păstrare 4 zile la 4°C [1.78].

$\alpha$ -Amilaza extracelulară produsă *Micrococcus luteus* are o masă moleculară de 56 kDa, pH optim 6,0, temperatură optimă 30°C, concentrație optimă 0,6% (m/V). Menținerea enzimei la 70°C timp de 10 minute a determinat pierderea a 70% din activitate. Energia de activare a fost 34,8 kJ/mol. Activitatea este mărită de  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  și inhibată de EDTA, KCN și acid citric [1.79].

Feller și colab. au arătat că, asemeni  $\alpha$ -amilazei pancreatice și salivare a vertebratelor,  $\alpha$ -amilaza bacteriană din *Alteromonas haloplanctis* este activată de ionul de clorură ca efector alosteric [1.80]. Ei au demonstrat că o sarcină negativă (care nu se rezumă numai la ionul clorură) este esențială pentru reacția amilolitică. În situsul de legare al clorurii există o grupare bazică esențială, iar afinitatea pentru legare depinde de modul de coordonare al ionului clorură de către acest rest bazic. Ionul de clorură nu este implicat direct în legarea substratului. Se pare că este responsabil de modificarea  $\text{pK}_a$  a grupării catalitice, el interacționând cu gruparea carbonil din situsul activ.

### 1.3.2. Caracterizarea glucoamilazei

Glucoamilaza (amiloglucozidaza,  $\gamma$ -amilaza, maltaza acidă,  $\alpha$ -glucozidaza lizozomală) este o exo- $\alpha$ -1,4-glucoan-glucohidrolază (EC. 3.2.1.3) ce hidrolizează atât legăturile  $\alpha$ -1,4- cât și  $\alpha$ -1,6-glucozidice de la capetele nereducătoare ale lanțurilor poliglucidice din amiloză, amilopectină, glicogen, conducând la glucoză [1.3]. Deși enzima are activitate maximă pentru legăturile  $\alpha$ -1,4-glucozidice, ea hidrolizează de asemenea și legăturile  $\alpha$ -1,6- și  $\alpha$ -1,3-glucozidice, dar cu viteze mai mici.

Amiloglucozidazele apar aproape în exclusivitate ca enzime extracelulare în fungi, în tulpini ca *Aspergillus* și *Rhizopus*.

Spre deosebire de  $\alpha$ -amilază, amiloglucozidaza nu acționează asupra amidonului nativ, ci asupra dextrinelor, eliberând glucoză. O excepție este amiloglucozidaza din *Aspergillus awamori* care scindează amidonul nativ până la 60-80%. Viteza de hidroliză depinde de masă moleculară, structură și de următoarea legătură în secvență. Viteza de hidroliză a legăturii  $\alpha$ -1,4- crește liniar cu masa moleculară relativă a substanței, până la cel mult maltopentoză. Enzima din *Aspergillus niger* are o afinitate relativă pentru amidon, maltotrioză și maltoză de 100, 68, și respectiv 31 [1.34].

Amiloglucozidaza hidrolizează și legăturile  $\alpha$ -1,6- din izomaltoză. Nu s-a putut face o distincție între activitatea maltolitică și izomaltolitică, iar acestea nu au putut fi separate prin electroforeză pe gel sau pe hârtie. Viteza reacției de hidroliză este afectată nu numai de mărimea substratului, dar și de următoarea legătură în secvență. Folosind un preparat foarte pur de *Aspergillus niger*, Fogarty [1.34] a arătat că amiloglucozidaza hidrolizează maltoza de 100 ori mai repede ca izomaltaza, pe când panoza este hidrolizată cu 45% din viteza maltozei. Se pare deci că legături  $\alpha$ -1,6- apropiate de legături  $\alpha$ -1,4- sunt atacate mai rapid ca legăturile  $\alpha$ -1,6- izolate. Legăturile  $\alpha$ -1,4- din maltoză și legăturile  $\alpha$ -1,6- și  $\alpha$ -1,4- din panoză sunt hidrolizate de un singur centru activ în amiloglucozidaza din *Rhizopus delemar* [1.34]. Viteza de hidroliză a legăturii  $\alpha$ -1,6- crește cu creșterea lungimii catenei. Amiloglucozidaza are afinitate mai mare pentru catenele lungi, astfel că  $V_{max}$  crește cu creșterea lungimii catenei, în timp ce  $K_m$  scade.

Kusunoki și alții [1.81] au descris un model de acțiune al amiloglucozidazei asupra amidonului, utilizând o cinetică Michaelis-Menten modificată cu efect de inhibiție de produs. Ei au arătat că  $V_{max}$  și  $K_m$  variază liniar cu masa moleculară a substratului.

Masa moleculară a amiloglucozidazei variază între 50000-95000, în funcție de sursa din care a fost obținută. În tabelul 1.2 se indică masele moleculare ale celor mai importante glucoamilaze produse de fungi [1.5].

Fungii eliberează forme multiple de amiloglucozidază, notate G I, G II (AG I, AG II), etc. Se pare că modificarea compoziției mediului de cultură poate duce la formarea izoenzimelor cu proprietăți cinetice diferite și specificitate de substrat diferită.

Tabelul 1.2. Proprietățile unor amiloglucozidaze

Microorganism producător	Masa moleculară	pH optim	Temperatura optimă, °C
<i>Cephalosporium charticola</i>	69000	5,4	60
<i>Aspergillus oryzae</i>	69000	4,2-5,2	60
<i>Aspergillus niger</i>	97000	3,8-4,8	60
<i>Aspergillus phoenicis</i>	63000	4,5	60
<i>Endomyces sp.</i>	55000	5,0	60
<i>Rhizopus delemar</i>	100000	4,0-5,0	60
<i>Piricularia oryzae</i>	94000	6,5	50-55

Morita și colab. au arătat că *Aspergillus oryzae* produce 4 forme de amiloglucozidază având mici diferențe în mobilitatea electroforetică, coeficientul de sedimentare și stabilitate la pH, dar proprietăți fizico-chimice și enzimaticice identice [1.82].

Amiloglucozidaza din *Aspergillus oryzae* purificată de Ono prin cromatografie de afinitate pe acarboză [1.83] s-a dovedit a fi omogenă prin gel-filtrare, PAGE, SDS-PAGE, ultracentrifugare și focusare izoelectrică. S-a dovedit a fi o AMG tipică, cu activitate maximă la 56°C, pH 4,0-4,5, masa moleculară relativă 68.400, pl 3,64, conținut în carbohidrați 7-8%.

În produsul de *Rhizopus niveus* s-au determinat 5 forme active, în amiloglucozidaza din *Chalara paradoxa* șase, iar enzima din *Aspergillus niger* produce forme multiple, deși unele tulpini pot produce o singură formă activă [1.47, 1.84, 1.85]. G I produce glucoză din amidon, pe când G II are o activitate redusă. G II are aproximativ 75% din activitatea G I asupra substraturilor polimerice solubile, în timp ce ambele forme sunt la fel de active în hidroliza legăturilor  $\alpha$ -1,4- și  $\alpha$ -1,6- ale substraturilor cu masă moleculară mică.

Ono și colab. au utilizat o coloană cu acarboză imobilizată pentru a purifica selectiv o amiloglucozidază din *Aspergillus niger* comercială, liberă de  $\alpha$ -amilază și  $\alpha$ -glucozidază. Prin gel-cromatografie, urmată de cromatografie de schimb ionic, componenta activă a fost separată în 6 fracții. Fiecare dintre acestea a eliberat  $\beta$ -D-glucoză ca unic produs din amidon solubil. Totuși, cele 6 componente diferă prin unele caracteristici. Ele diferă prin masă moleculară, constantă de sedimentare, compoziție chimică, pl, parametri cinetici și alte proprietăți enzimaticice [1.86, 1.87].

Paszczynsky și colab. [1.88] au utilizat cromatografia de afinitate cu amilopectină-AH-Sepharose sau amilopectină-sticlă poroasă pentru a separa AMG din *Aspergillus niger* C în două componente.

Yasuda și colab. au purificat două forme de AMG din *Monascus sp.* 3403 omogene (disc electroforeză și ultracentrifugare) [1.89].

Se pare că producția de forme multiple de amiloglucozidază este influențată de compoziția mediului și condițiile de creștere. De asemenea, se pare că un factor important care influențează formarea de forme multiple este degradarea amiloglucozidazei de glucozidaze sau proteaze, în timpul cultivării sau al preparării extractelor. Astfel, AG II din *Aspergillus awamori* var. *kawachi* poate fi obținut din AG I cu proteaze sau glucozidaze. S-au studiat efectele proteazelor asupra diferitelor fracțiuni de amiloglucozidază în timpul cultivării de *Aspergillus niger* C. Rezultatele au sugerat faptul că acestea pot regla activitatea și eterogenitatea amiloglucozidazei, care sunt, în acest caz, funcții de vârsta culturii [1.88].

AMG din *Aspergillus niger*, căreia i s-au introdus grupări amino adiționale, a fost cuplată pe dextran T-70 oxidat cu periodat în prezență de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , obținându-se o enzimă mai termostabilă ca cea nativă. Mai mult, stabilitatea operațională a enzimei conjugate a fost de două ori mai mare ca ce a enzimei native [1.90].  $\alpha$ -Ciclodextrina (100 mM) exercită un efect termostabilizator asupra amiloglucozidazei la 60°C [1.91]. Efectul ei stabilizator este mai slab la 30°C și 40°C. Mecanismul de stabilizare cu  $\alpha$ -ciclodextrină necesită încă investigații.  $\beta$ - și  $\gamma$ -ciclodextrina și alte zaharuri au doar un efect slab.

Nagamoto și colab. [1.92] au studiat hidroliza amidonului solubil, a maltotriozei și a maltozei cu AMG (*Aspergillus niger*), în soluții apoase de metanol, etanol,

etilenglicol și 1,4-dioxan la 40°C. Studiile cinetice au arătat că constanta de viteză intrinsecă a fost afectată electrostatic de constanta dielectrică a soluțiilor organice.

Acarboza, o pseudotetrazaharidă produsă de *Actinomicetes* este un inhibitor extrem de puternic pentru multe enzime amilolitice microbiene, în concentrații diferite (180 μg/ml pentru α-amilaza din *Aspergillus oryzae*, 40 μg/ml pentru AMG din *Aspergillus niger*, 25 μg/ml pentru amiloglucozidaza din *Candida tsukubaensis*, etc.) [1.93]. Se pare că legarea puternică dar reversibilă a acarbozei de AMG din *Aspergillus niger* se face prin intermediul a două resturi de triptofan specifice. Această afinitate specifică pentru acarboză a AMG a fost utilizată în cromatografia de afinitate, prin legarea ei de AH-Sepharose 4B.

Activitatea amologlucozidazei din *Aspergillus niger* este inhibată de ioni  $Hg^{2+}$  și în măsură mai mică de  $Pb^{2+}$  și  $Mn^{2+}$  [1.94].

## 1.4. Structura și mecanismele de acțiune ale enzimelor amilolitice

### 1.4.1. Structura enzimelor amilolitice

#### 1.4.1.1. Structura α-amilazei

**Secvența de aminoacizi.** Se cunoaște secvența completă de aminoacizi a α-amilazei din *Aspergillus oryzae* [1.95] și a α-amilazei pancreatice porcine [1.96]. Se cunosc de asemenea secvențele în aminoacizi ale unor porțiuni din structura a numeroase enzime de origine fungică, bacteriană, vegetală sau animală. Comparând α-amilaze din mai multe surse s-au identificat patru regiuni cu secvență identică, care încep, în cazul α-amilazei din *Aspergillus oryzae*, la aminoacizii din pozițiile 117, 202, 230 și 292. Aminoacizii analogi ai His122, Asp206, His210, Glu230, His296 și Asp297 din α-amilaza din *Aspergillus oryzae* se conservă în toate celelalte α-amilaze [1.97].

**Structura tridimensională.** α-Amilaza din *Aspergillus oryzae* constă din 478 resturi de aminoacizi pliate în două domenii, A și B. Domeniul A conține 380 de resturi N-terminale de aminoacizi și are o structură  $(\beta/\alpha)_8$ , adică constă din opt zone cu structură β care alternează cu opt zone cu structură de α-helix, legate prin bucle. Domeniul B conține opt regiuni cu structură de foi β pliate antiparalele, legate de domeniul A printr-o singură catenă polipeptidică. S-au identificat patru punți disulfurice localizate la resturile 30-38, 150-164, 240-283 și 439-474. Enzima este N-glicozilată la Asn197 [1.98-1.100].

**Situsul activ.** Situsul activ este situat într-o cavitate la capătul C-terminal al structurilor β ale zonei  $(\beta/\alpha)_8$ , din domeniul A. Toate resturile implicate în situsul activ se găsesc în bucle sau în structurile β, spre capătul C-terminal apropiat buclilor. Localizarea aminoacizilor activi în aceste poziții permite flexibilitate și variație printre α-amilaze din diferite surse, fără să se schimbe structura de bază  $(\beta/\alpha)_8$ . Cele două resturi cu rol catalitic din α-amilaza de *Aspergillus oryzae*, Glu230 și Asp297, sunt localizate la 3Å de oxigenul glucozidic al unității de substrat dintre subsitusurile 4 și 5 [1.101]. Aceleași observații sunt valabile și în cazul α-amilazei pancreatice porcine [1.102].

**Situsul de legare a substratului.** Pentru α-amilaza din *Aspergillus oryzae* [1.98] s-a propus un model al situsului de legătură alcătuit din șapte subunități. Ruperea legăturii din substrat are loc între subsitusurile 4 și 5. Resturile de His122, His296 și Asp297 din subsitusul 4 interacționează cu grupările hidroxil de la C<sub>6</sub>, C<sub>2</sub> și C<sub>3</sub> ale aceleiași unități de glucoză din substrat. În subsitusul de legare al substratului sunt implicați și Lys209, Tyr155, Val231, His210 și Asp206.



Un rol deosebit îl are restul de His [1.103] care este implicat atât în situsul de legare al substratului, cât și în cel de legare al calciului, aceste interacții permițând menținerea unei orientări corespunzătoare a substratului în situsul activ. His201, localizată în subsitusul 4, interacționează cu restul de substrat legat de subsitus și poate induce o modificare locală de configurație, benefică pentru cataliză. Deoarece His201 și cei doi liganzi ai  $\text{Cl}^-$  (Arg195, Asp197) se găsesc în aceeași buclă peptidică, efectul activator al  $\text{Cl}^-$  poate fi legat de acest proces de potrivire indusă. Studii recente de mutageneză direcționată asupra  $\alpha$ -amilazei salivare umane confirmă rolul multifuncțional al His201 în legarea calciului, a substratului, în controlul pH-ului optim și activarea prin ioni de  $\text{Cl}^-$ . Unitățile de substrat sunt legate de subsitusuri prin legături de hidrogen și interacții dipolare între catena amilozei și structurile  $\beta$  [1.104, 1.105].

Studii de modificare chimică indică de asemenea că și resturile de Tyr și Trp sunt implicate în legarea substratului. În enzima pancreatică, inelul aromatic al acestor resturi interacționează cu ciclul glucopiranozic din subsitusul 3 determinând o tensionare conformațională în substrat [1.102].

Studii de mutageneză direcționată a  $\alpha$ -amilazei termostabile din *Bacillus stearothermophilus* au evidențiat că Arg232 (Arg204 din  $\alpha$ -amilaza de *Aspergillus oryzae*) interacționează ionic cu Tyr63 (Tyr82 din  $\alpha$ -amilaza de *Aspergillus oryzae*), aflată în zona situsului activ, ceea ce favorizează accesul substratului la centrul activ [1.103].

A fost identificat un al doilea situs de legare a substratului, situat pe suprafața  $\alpha$ -amilazei pancreatice porcine, la  $\sim 20$  Å de situsul activ, lângă capătul amino-terminal al  $\alpha$ -helixului 8, care poate juca un rol în ancorarea catenei lungi a substratului de amidon la o unitate de glucoză mai îndepărtată, pentru a facilita interacțiunea între enzimă și substrat [1.106].

**Situsul de legare al calciului.** Ionul de calciu este coordonat de patru resturi de aminoacizi (Asn121, His210, Glu162 și Asp175 în *Aspergillus oryzae*). Primii doi aminoacizi aparțin structurilor  $\beta$  3 și 4 ale domeniului A, ceilalți doi structurilor  $\beta$  din domeniul B. Asp175 acționează ca un ligand bidentat. Sunt implicate și trei molecule de apă.  $\text{Ca}^{2+}$  este legat deci de opt liganzi, cu o geometrie de piramidă pentagonală deformată. Funcția cationului metallic este de a stabiliza și menține situsul activ într-o conformație favorabilă pentru activitatea enzimatică, prin poziționarea Asp197 în proximitatea Asp300 [1.101-1.103].

În enzima de *Aspergillus niger* a fost identificat și un situs de legare secundar al  $\text{Ca}^{2+}$ , la baza situsului de legare al substratului, ionul de  $\text{Ca}^{2+}$  fiind coordonat de Glu230, Asp206 și trei molecule de apă. Se pare că și el este implicat în etapa catalitică [1.107].

**Situsul de legare al ionului clorură.** În cazul  $\alpha$ -amilazei pancreatice, se știe că situsul de legare al clorurii este situat lângă situsul activ, lângă capătul carboxi-terminal al structurii  $\beta$  din domeniul A. Ionul  $\text{Cl}^-$  este coordonat de cinci liganzi: Arg337 (bidentat), Arg195 (bidentat), Asn298 și apă. Legarea ionului clorură determină modificarea pH optim către neutru și o creștere de activitate [1.102].

#### 1.4.1.2. Structura glucoamilazei

**Secvența de aminoacizi.** Se cunosc secvențele de aminoacizi ale mai multor glucoamilaze produse de fungii de tip *Aspergillus*, inclusiv *Aspergillus niger*, *Rhizopus*, sau drojdii de tipul *Saccharomyces*, deduse din gena cADN.

Prin studierea secvenței de aminoacizi din diverse surse, s-a constatat că există 5 secvențe omoloage ( $S_1$ - $S_5$ ), din care  $S_5$  nu este esențială în activitatea catalitică,

dovadă a acestui fapt fiind absența sa în amiloglucozidazele din *Saccharomyces*. Secvențele de aminoacizi au fost analizate din punct de vedere al hidrofobicității locale și a structurii secundare și s-a constatat că majoritatea domeniilor din secvențele S<sub>1</sub>-S<sub>5</sub> sunt similare din punct de vedere conformațional [1.34, 1.47, 1.108].

**Compoziția în carbohidrați.** Amiloglucozidazele sunt invariabil glicoproteine, conținând 4-18% carbohidrați, deși în unele cazuri se menționează un conținut în carbohidrați de până la 80% (*S. diastaticus*). Frațiunea de carbohidrați din AG I din *Aspergillus niger* se leagă prin legături glicozidice de L-treonină și L-serină. În amiloglucozidaza din *Aspergillus niger*, frațiunea de carbohidrați conține 20 unități individuale de D-manoză, 11 dizaharide cu structură de 2-O-D-manopiranozil-D-manoză, 8 trizaharide și 5 tetrazaharide compuse din diferite combinații de D-glucoză, D-manoză și D-galactoză legate prin legături 1,3- și 1,6-glicozidice. Acest aranjament al resturilor de carbohidrați în glicoproteină este foarte neuzual și este responsabil de unele proprietăți ale AMG, deoarece eliminarea lor determină scăderea activității și stabilității enzimei. Distribuția aleatoare a catenelor de carbohidrați de-a lungul catenei polipeptidice poate fi cauza rezistenței considerabile la inactivare termică și a stabilității la păstrare la temperaturi scăzute [1.108-1.110].

**Forme multiple.** Glucoamilazele fungice există în general în forme multiple [1.111]. Glucoamilaza din *Aspergillus niger* există în două forme, GAI și GAII.

**Structură tridimensională.** Forma GAI (616 aminoacizi, masă moleculară 71 kD) constă dintr-un domeniu catalitic (1-440), o regiune cu Thr și Ser puternic glicozilate (441-512) și o regiune C-terminală (513-616), domeniul de legare al amidonului granular (masă moleculară 61 kD). Acesta din urmă lipsește în GAII.

O-glicozilarea asigură stabilitatea ambelor forme la denaturare termică [1.83]. Pe lângă această O-glicozilare extinsă, mai există două catene glicozil, N-legate de Asn171 și Asn395 și legate de suprafața moleculei enzimatice prin legături de hidrogen ale zaharurilor terminale. Fragmentul catalitic activ (minus domeniul de legare C-terminal) al glucoamilazei din *Aspergillus awamori* var. X100 are o structură cristalină  $\alpha/\alpha$  (spre deosebire de  $\alpha/\beta$  din  $\alpha$ - și respectiv  $\beta$ -amilaze), cu un miez interior alcătuit din șase elice legate antiparalele de șase  $\alpha$ -elice periferice prin bucle. În jurul segmentului  $\alpha/\alpha$  se află încolăcit segmentul de legare al resturilor glicozil, aflat în conformație extinsă. Molecula mai conține 3 punți disulfurice: 210-213, 262-270 și 222-449, ultima având rolul de a lega segmentul glicozilat de corpul principal [1.112, 1.113].

**Situs activ.** Este localizat într-o cavitate longitudinală a miezului interior, de 15 Å diametru la deschidere și 10 Å lungime. Este mărginit de o serie de resturi polare. Comparând secvențele de aminoacizi, s-a constatat că glucoamilazele au patru regiuni omoloage, similare conformațional. Prin studii de modificare chimică s-a determinat că aceste regiuni conțin grupări carboxil și Trp, probabil implicate în cataliză, [1.106, 1.114].

**Situsul de legare al amidonului brut.** Formele GAI ale glucoamilazelor fungice prezintă o proprietate unică, aceea că ele digeră nu numai amidonul solubil, ci și granulele de amidon brute [1.115]. Glucoamilazele din *Aspergillus phoenicius*, *Mucor rouxianus*, *Penicillium oxalicum* digeră de asemenea și granulele de amidon. Ambele forme (GAI, GAII) sunt la fel de active asupra amidonului solubil și asupra altor substraturi potrivite. De aceea se crede că segmentul scindat din AGI trebuie să conțină situsul de legare al amidonului brut. Segmente cu aceeași structură se întâlnesc la mai multe  $\alpha$ -amilaze și  $\beta$ -amilaze de diferite surse.

Segmentul C-terminal (471-616) al enzimei din *Aspergillus niger* a fost obținut prin hidroliză proteolitică și a fost purificat până la omogenitate. Peptida se leagă de

amidonul de porumb granular în raport de 1,08 mmol/mg amidon. Cu malto-oligozaharide cu lungimea catenei de 2-11, s-a determinat o stoichiometrie a legăturii de 1 mol substrat/mol proteină [1.116, 1.117].

Domeniul de legare al amidonului din glucoamilaza din *Aspergillus niger* conține un procent ridicat de resturi formând o structură răsucită. Interacțiunea la suprafață constă în primul rând din forțe hidrofobe, implicând mai ales Trp590 și Trp615 [1.118].

S-a postulat că adsorbția la situsul de afinitate determină disocierea moleculelor de apă legate de suprafața granulei de amidon prin legături de hidrogen cu grupările hidroxil. Acest efect determină modificarea structurii locale și permite penetrarea moleculelor de apă în micelii, cu solubilizarea locală a amidonului.

Degradarea granulei de amidon depinde de o serie de factori, cum ar fi raportul amiloză/amilopectină, procentul de cristalinitate, suprafața accesibilă, mărimea particulelor, structura granulară a diferitelor tipuri de amidon. Astfel, se știe că  $\alpha$ -amilaza digeră granulele de amidon de cartofi, porumb, grâu, etc. diferit, așa cum s-a observat prin microscopie electronică. Viteza de hidroliză depinde și de tipul de cristal din granula de amidon. Astfel, amiloza cristalină de tip A este hidrolizată mai rapid decât cea de tip B, probabil datorită unui raport suprafață/volum mai mare în tipul A, deși moleculele de tip B sunt mai slab legate [1.115].

#### 1.4.2. Mecanisme de acțiune

$\alpha$ -Amilazele hidrolizează legăturile  $\alpha$ -1,4 cu retenție de configurație, pe când  $\beta$ -amilazele și glucoamilazele cu inversie de configurație. Diferența de configurație a fost explicată prin existența a două mecanisme diferite [1.106].

##### Mecanismul prin substituție nucleofilă

Koshland a propus pentru prima oară în 1959 mecanismul de substituție nucleofilă pentru enzimele amilolitice. Pentru  $\alpha$ -amilaze, care mențin configurația substratului, s-a propus un mecanism prin două substituții nucleofile consecutive (figura 1.5). Protonarea oxigenului glucozidic prin cataliză generală prin acizi, concertată cu atacul nucleofil al unui anion carboxilat la C<sub>1</sub> rupe legătura glicozidică, cu formarea unui intermediar covalent glucozil-enzimă (un ester-acetal). Esterul intermediar este hidrolizat printr-o altă reacție de substituție catalizată general bazic, cu formarea unui produs cu configurație  $\alpha$  [1.98].

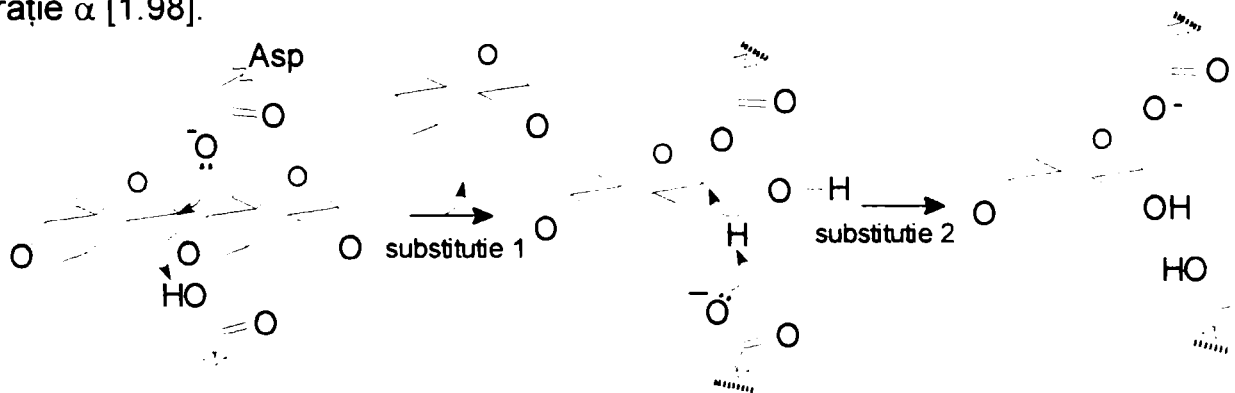


Figura 1.5. Mecanismul de acțiune al  $\alpha$ -amilazelor prin două substituții nucleofile

Pentru  $\beta$ -amilaze, care catalizează hidroliza cu inversie de configurație, reacția decurge printr-o singură substituție (figura 1.6A). O cataliză generală acidă slăbește legătura C-O maltozidică. Atacul moleculei de apă se face pe partea  $\beta$  a substratului și

este asistat prin cataliză generală de către o bază. Același tip de mecanism se aplică și reacțiilor catalizate de glucoamilaze. Inversia de configurație mai poate fi explicată și printr-un mecanism analog cu substituția dublă de la  $\alpha$ -amilaze. În acest caz, molecula de apă atacă astfel atomul de carbon al grupării carboxil încât scindarea legăturii covalente din acetalul-ester să ducă la formarea produsului cu configurație  $\beta$  (figura 1.6B) [1.98].

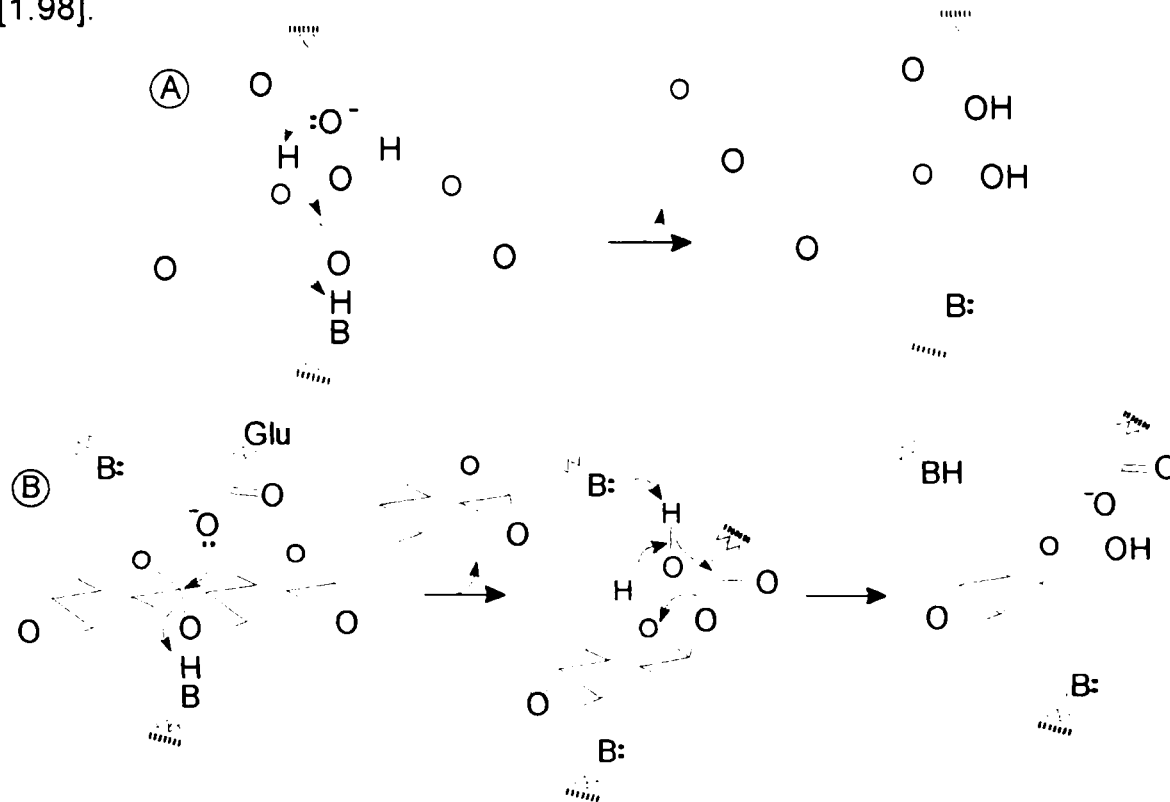


Figura 1.6. Mecanismul de acțiune al  $\beta$ -amilazelor și glucoamilazelor prin substituție simplă (A) sau dublă (B).

### Mecanismul prin ion oxocarboniu

În acest mecanism (figura 1.7) [1.106], protonarea oxigenului glicozidic prin cataliză generală acidă și distorsionarea substratului la o conformație semiscaun indusă de enzimă produc un intermediar ionic oxocarboniu stabilizat de enzimă. Conformația semiscaun reduce încărcarea sterică la atomul C<sub>1</sub> și mărește accesibilitatea carbonului anomerice la atacul frontal al moleculei de apă, asistat de  $\alpha$ -amilază.

Atacul pe la spate, asistat de  $\beta$ -amilază, duce la inversie de configurație. Ambele enzime utilizează un mecanism comun, configurația produsului fiind determinată de direcția de atac a moleculei de apă.

Ionii glicoziloxocarboniu au un timp de viață scurt în soluții apoase ( $k_{\text{HOH}} \sim 10^{-12}\text{s}$ ). Stabilitatea lor este influențată de caracterul nucleofil, interacțiile electrostatice și poziționarea grupărilor catalitice din situsul activ. Formarea completă a intermediarului ion oxocarboniu printr-un mecanism S<sub>N</sub>1 are loc dacă ruperea legăturii precede atacul moleculei de apă, favorizat de o cataliză generală bazică. Pe de altă parte, un intermediar oxocarboniu stabil este improbabil dacă atacul nucleofil are loc înainte de formarea completă a cationului. În acest caz, reacția va urma un mecanism S<sub>N</sub>2, probabil printr-o stare de tranziție cu structură asemănătoare ionului oxocarboniu [1.119].

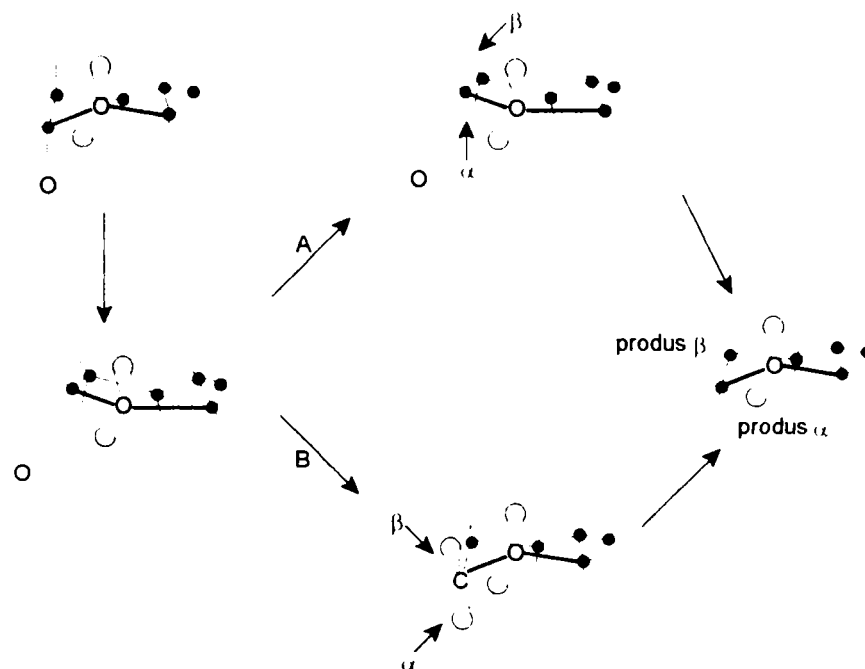


Figura 1.7. Reprezentare schematică a conformațiilor posibile și a intermediarilor în calea de reacție la hidroliza glicopiranozidului catalizată de amilaze.

#### 1.4.2.1. Mecanismul de acțiune al $\alpha$ -amilazei

Toate  $\alpha$ -amilazele cu structuri elucidate conțin ca și resturi catalitice Glu/Asp, fapt susținut prin profilul de pH al activității enzimatice. În enzima din *Aspergillus oryzae*, se pare că Glu230 și Asp297 au rol de acid general și bază generală. În enzima pancreatică porcină s-a identificat de asemenea că resturile Glu233 și Asp300 se află apropiate în situsul activ [1.102, 1.120].

Formarea unui intermediar glicozil-enzimă a fost determinată în cazul  $\alpha$ -amilazei pancreatice prin criogenie, utilizând [ $1-^{13}\text{C}$ ]maltotetraoză ca substrat [1.121].

Într-un alt studiu al structurii cristaline a complexului  $\alpha$ -amilazei pancreatice cu acarboza (inhibitor, analog de stare de tranziție) s-a constatat însă că resturile catalitice Glu233 și Asp300 sunt poziționate la o distanță mai mare de legătura glicozidică decât ne-am aștepta pentru o legătură covalentă. Conform acestui studiu, formarea glicozil-enzimei este improbabilă. În schimb, hidroliza are loc prin cataliză generală acidă, cele două resturi fiind orientate favorabil pentru protonarea oxigenului glicozidic. Catalizatorul acid este probabil Glu233, presupunând un mecanism prin intermediul ionului carboniu. Dacă Glu233 acționează ca un catalizator acid în protonarea oxigenului glicozidic, el trebuie să fie protonat la un pH optim, ~6-7. În structura cristalină a enzimei native, restul Glu233 este poziționat în apropierea ionului  $\text{Cl}^-$  (la ~4,8Å), efectul electrostatic al anionului putând deplasa valoarea pK a grupării carboxil a Glu233 la o valoare mai mare [1.102, 1.120].

#### 1.4.2.2. Mecanismul de acțiune al glucoamilazei

Profilul de pH al glucoamilazei indică o cataliză implicând două grupări carboxil esențiale cu  $\text{pK}_a$  de 2,7 și 5,9. Studii de inhibiție și mutageneză și analize cristalografice au arătat că Glu179 și Asp176 sunt un acid general și o bază generală, cu  $\text{pK}_a$  5,9 și 2,7. Studii structurale asupra complexului enzimei din *Aspergillus awamori* cu 1-deoxinojirimicină sugerează că Glu179 și Glu400 sunt catalizatorul general acid și respectiv bazic. Mutația Glu179>Gln determină o descreștere a  $k_{\text{cat}}$  de 2000 ori, utilizând maltoheptoza ca substrat. O mutație Asp176>Asn duce la o descreștere a  $k_{\text{cat}}$  de numai



1220 de ori, dar o creștere de 4 ori a  $K_m$ . Probabil că Asp 176, localizat lângă subsitusul 1, stabilizează starea de tranziție, prin interacție cu Trp120 la subsitusul 4, deși detaliile nu sunt clare. Studiile cristalografice au arătat că nici Glu179 nici Glu400 nu poate forma o legătură covalentă cu carbonul anomic  $C_1$ , în complexul său cu inhibitorul. Primul rest este blocat de legătura glicozidică iar al doilea de o moleculă de apă. Glu179, legat prin legături de hidrogen de Asp176 și Trp120 se află lângă aglicon, în timp ce catalizatorul bazic Glu400 este localizat de partea cealaltă a nucleofilului. Aceste rezultate sunt luate drept argumente în favoarea căii de reacție implicând un intermediar ion oxocarboniu. Hidroliza are loc prin protonarea agliconului de Glu179 urmată (sau concertată cu) atacul nucleofil de către apă, asistat de o bază generală (Glu400) [1.112, 1.113].

Pe baza unor studii cinetice asupra enzimei de *Rhizopus niveus* modificată cu N-bromsuccinimidă, s-a determinat că un rest Trp este situat în subsitusul 1. Un alt rest esențial, Trp120, se află la/lângă subsitusul 4 și se pare că stabilizează complexul enzimă-substrat în starea de tranziție prin inducerea unor modificări conformaționale la subsitusurile 1 și 2 [1.114].

#### 1.4.2.3. Teoria subsitusurilor [1.106]

Situsul activ al amilazelor constă din mai multe subsitusuri, fiecare interacționând cu o unitate monomerică din substrat. Parametrii de viteză măsurați, constanta Michaelis  $K_m$  și viteza maximă  $V_{max}$  pot fi exprimate în termenii afinității fiecărui substrat. O explicitare a modelului subsitusurilor implică determinarea numărului de subsitusuri, localizarea subsitusului catalitic, determinarea afinității față de subsitus (adică energia de legătură) și viteza de hidroliză.

Aranjamentul subsitusurilor poate fi utilizat pentru a prezice modul predominant de legare productivă și astfel modelul de acțiune al unui substrat dat. Modul de legare cel mai probabil al unui substrat este cel cu cea mai mare afinitate moleculară.  $\alpha$ -Amilaza din *A. oryzae* constă din șapte subsitusuri cu o afinitate relativ mare la subsitusurile 3 și 6 și afinități negative adiacente situsului catalitic. Maltopentoza se leagă productiv de enzimă în așa fel încât substratul este hidrolizat la G3-G4.  $\alpha$ -Amilaza pancreatică porcineă conține cinci subsitusuri, atacul catalitic având loc între subsitusurile 3 și 4. În acest caz maltotrioza este hidrolizată la G1-G2 (la capătul reducător), deși se pot forma doi complecși productivi (figura 1.8).

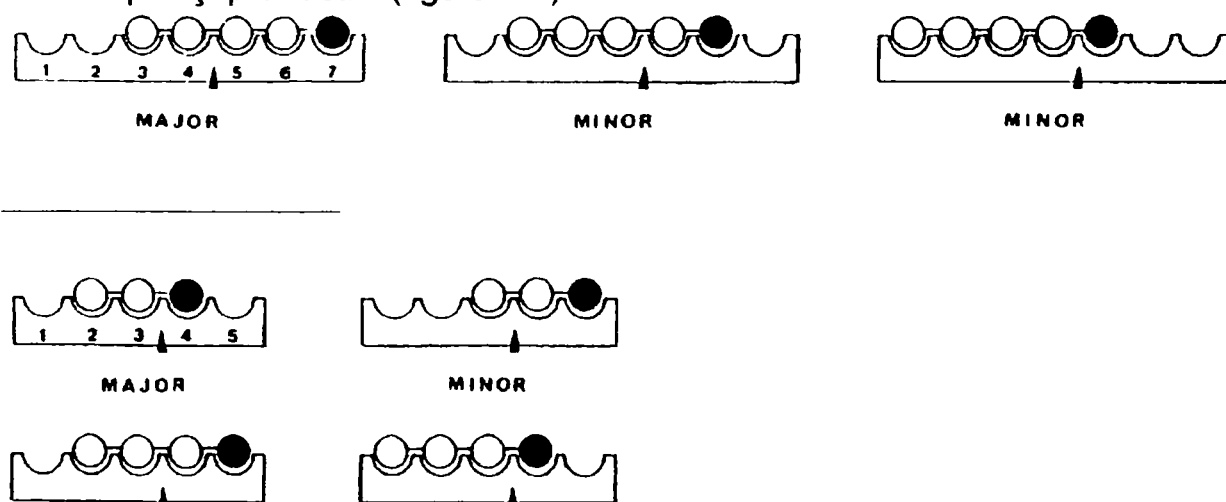


Figura 1.8. Hidroliza maltopentozei (A) de  $\alpha$ -amilazele de *Aspergillus oryzae* și maltotriozei și maltotetrozei (B) de  $\alpha$ -amilaza pancreatică

În cazul glucoamilazelor din *Rhizopus niveus* și *Rhizopus delemar*, situsul activ constă din șapte subsitusuri. Afinitatea subsitusului 1 este zero sau negativă, subsitusul doi are afinitatea cea mai mare, afinitatea de substrat descrește cu creșterea distanței de legătura scindată, spre capătul reducător al substratului. Studii de fluorescență sugerează un mecanism în două etape: o asociere bimoleculară între enzimă și substrat, cu formarea unui complex labil urmat de un proces unimolecular de formare a unui complex puternic ( $E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons E^*S \rightarrow E + P$ ). Maltoza se leagă de enzimă întâi cu restul de glucoză nereducător asociat cu substratul 1, formând complexul ES. În etapa următoare, are loc legarea productivă la subsitusul 2 cu formarea unui complex productiv puternic legat, cu o modificare în conformația enzimei, cu formarea unei structuri cu potrivire indusă (figura 1.9). Această etapă unimoleculară implică restul Trp120, pliat în jurul unității de la capătul nereducător.

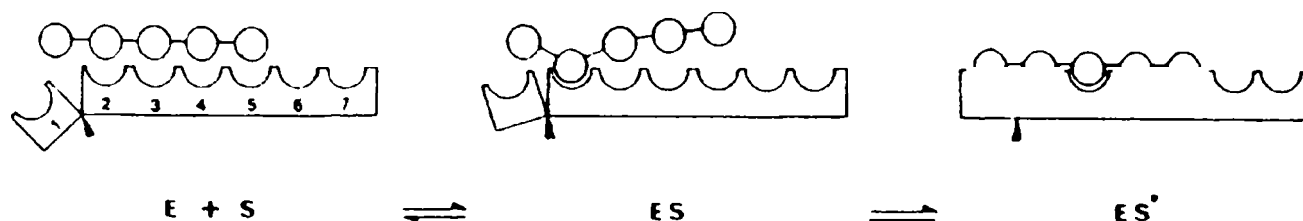


Figura 1.9. Reprezentarea schematică a modelului de "potrivire indusă" la legarea oligozaharidelor de subsitusurile glucoamilazelor.

#### 1.4.2.4. Modele de acțiune

Teoretic acțiunea amilazelor poate fi descrisă prin trei tipuri de mecanisme:

1. **Modelul unicate nar:** amilaza, după ce formează un complex productiv cu molecula de substrat, acționează asupra lui continuu, până la degradare totală.
2. **Modelul multicate nar:** enzima, după ce a scindat molecula de substrat, disociază și atacă o altă moleculă de substrat. Acest model de acțiune duce la scurtarea simultană a tuturor moleculelor de substrat.
3. **Modelul de atac multiplu:** enzima scindează o moleculă de substrat de mai multe ori înainte de a disocia și a forma un nou complex productiv cu o altă moleculă de substrat. La  $\beta$ -amilaza pancreatică porcine, direcția atacului multiplu este de la capătul reducător către cel nereducător. La exo-enzime, ca glucoamilazele, scindarea are loc de la capătul nereducător.

La  $\alpha$ -amilaza pancreatică porcine, pH optim 6,9, atacul multiplu este de trei ori mai probabil decât în cazul amilazei de *Aspergillus oryzae*. La pH alcalin, 10,5, reacția enzimatică decurge printr-un mecanism multicate nar. Și glucoamilaza din *Rhizopus niveus* acționează tot printr-un mecanism multicate nar. AMG din *Aspergillus niger* și *Rhizopus niveus* hidrolizează malto-oligozaharidele predominant prin mecanism multicate nar. În cazul  $\alpha$ -amilazelor bacteriene însă nu s-au găsit dovezi pentru mecanism multicate nar sau atac multiplu.

Atacul multiplu poate decurge pe trei căi (figura 1.10):

1. **Disociere și reasociere completă:** substratul, după scindare, se disociază complet și se reasociază într-o nouă poziție.
2. **Reasociere flexibilă:** substratul, după scindare, rămâne atașat de situsul activ. Un fragment rămâne puternic asociat, în timp ce un alt fragment se detașează și se reaniliază într-o altă poziție. Un astfel de mecanism necesită un anumit grad de flexibilitate fie în substrat, fie în enzimă, fie în amândouă.

3. **Glisare:** substratul nou produs alunecă pe suprafața enzimei până într-o poziție cu energie potențială minimă, cu toate situsurile complet ocupate.

Dacă considerăm că mișcarea moleculelor în variantele 1 și 2 este infimezimal de mică, substratul produs poate fi considerat ca "alunecând" pe enzimă către un alt aliniament cu energie potențială minimă, ca în varianta 3.

Acțiunea  $\alpha$ -amilazei asupra amilopectinei diferă în ceea ce privește hidroliza legăturilor  $\alpha$ -D-1,4- de lângă legăturile  $\alpha$ -D-1,6. Astfel,  $\alpha$ -amilaza pancreatică porcine produce ca dextrină limită 6<sup>3</sup>- $\alpha$ -D-glucopiranozil-maltotetroză, iar  $\alpha$ -amilaza de *Bacillus subtilis* 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -maltozil-maltotrioză (figura 1.11).

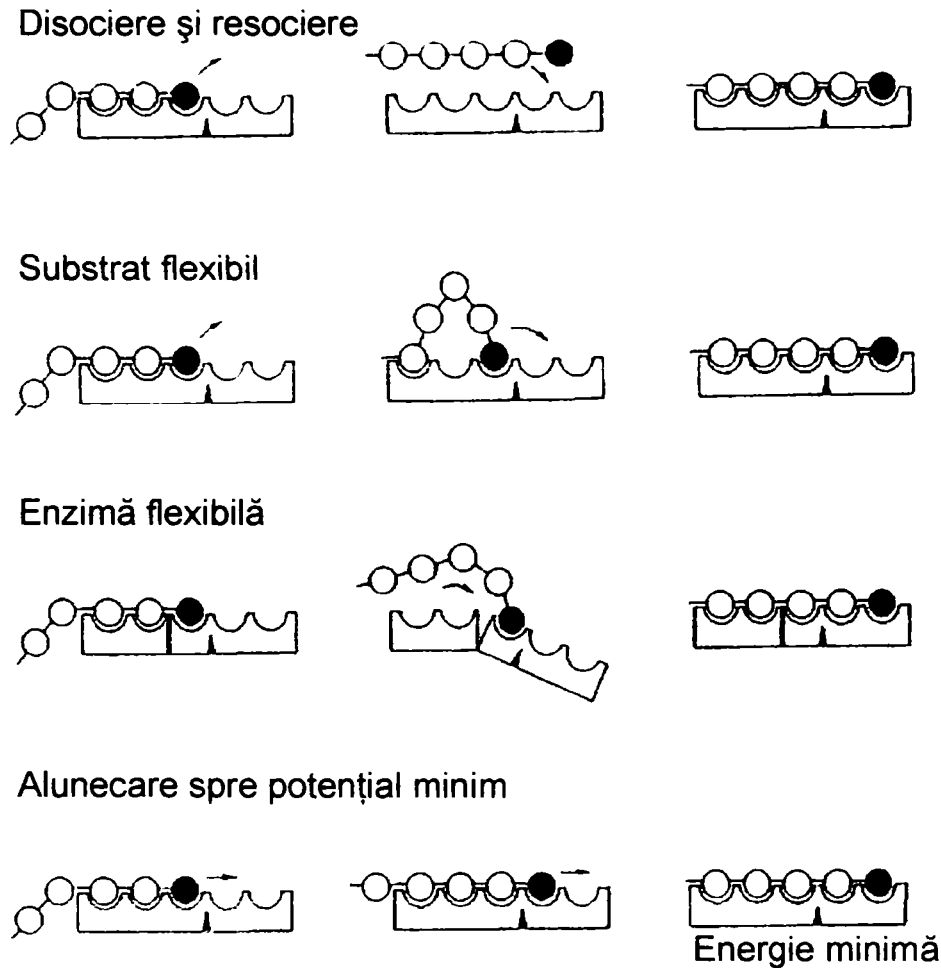


Figura 1.10. Reprezentarea schematică a mecanismelor atacului multiplu. Situsul de scindare este reprezentat printr-un vârf de săgeată.

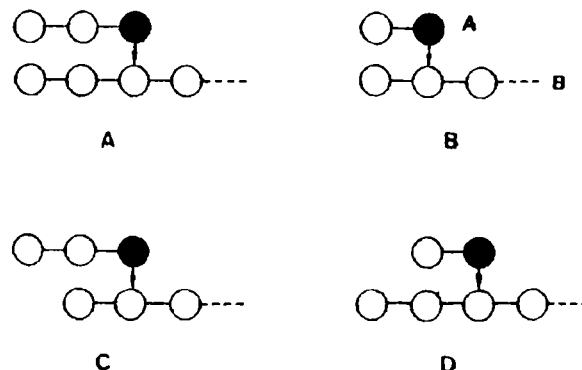


Figura 1.11. Structurile posibile ale  $\alpha$ -dextrinelor limită formate sub acțiunea  $\alpha$ -amilazelor.



### 1.4.2.5. Reacții multimoleculare

$\alpha$ -Amilazele nu catalizează numai reacții de hidroliză unimoleculare simple. În anumite cazuri, degradarea substraturilor decurge prin procese multimoleculare, cum ar fi (figura 1.12):

1. **Condensare:** două substraturi polimerizează și formează o nouă legătură glicozidică, proces urmat de hidroliza rapidă a produsului de condensare.
2. **Legătură deplasată:** două molecule de substrat se leagă la același situs activ, formând un complex doi-unu. În funcție de afinitățile de legare de subsitusurile ocupate, al doilea substrat se poate lega astfel încât să-l împingă pe primul într-o nouă poziție, inducând hidroliza unei alte legături.
3. **Transglicozilare:** o grupare glicozil a substratului donor este transferată la un substrat acceptor, reacție similară cu cea de hidroliză, numai că nu apa este substratul acceptor.

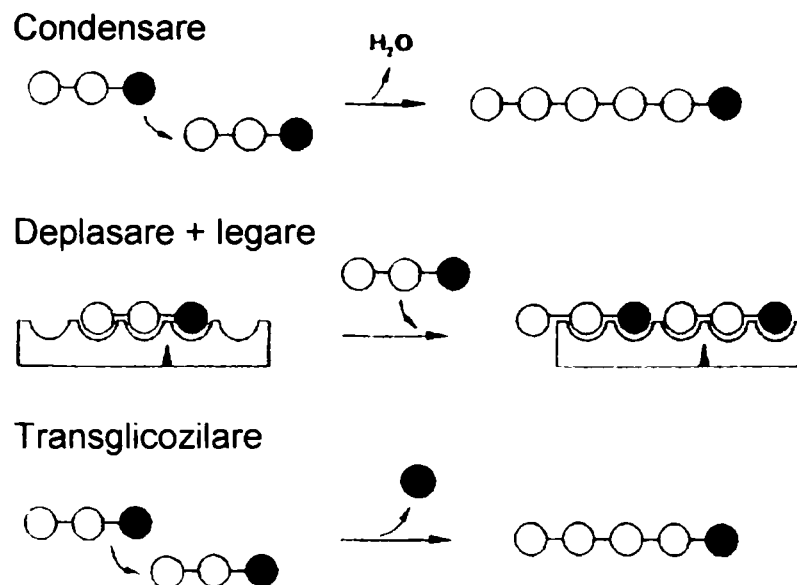


Figura 1.12. Mecanisme cu substrat bimolecular de modificare a modului de acțiune al  $\alpha$ -amilazei pancreatice, la scăderea concentrației de maltotrioză.

Aceste mecanisme alternative depind de concentrația de substrat și de lungimea catenei. Aceste reacții sunt competitive cu procesul de hidroliză. Mecanismele multimoleculare apar atât în cazul  $\alpha$ -amilazelor cât și în cazul amiloglucozidazelor. Astfel, în cazul  $\alpha$ -amilazei de *Aspergillus oryzae*, mecanismul multimolecular major este transglicozilarea. AMG din *Rhizopus niveus* catalizează sinteza maltozei din  $\beta$ -D-glucoză. Catalizează de asemenea transglicozilarea, în cazul substraturilor cu formă anomerică corectă.

### 1.5. Utilizările enzimelor amilolitice

Enzimele amilolitice, datorită utilizărilor lor diverse, sunt produse la scară industrială în întreaga lume [1.122]. La nivelul anului 1985, valoarea amilazelor vândute pe piața SUA se pare că a fost de 38 milioane \$, ele situându-se pe locul doi după proteaze. Principalele ramuri care utilizează enzimele amilolitice, adeseori în combinație cu alte enzime, sunt:

- **industria de panificație**, unde adăugarea de  $\alpha$ -amilază determină ameliorarea calității produselor și prelungirea duratei de menținere a prospețimii, efecte care se datorează acțiunii hidrolitice asupra glucidelor din făină;
- **industria berii**, unde utilizarea preparatelor de  $\alpha$ - și  $\beta$ -amilază face posibilă folosirea ca materii prime a cerealelor nemălțificate (porumb, orz), ceea ce permite reducerea costurilor;
- **industria amidonului**, la obținerea dextrozei, glucozei și izosiroplului;
- **industria sucurilor de fructe**, pentru hidroliza amidonului care rămâne în fructele culese înainte de cocere și care în procesul de obținere al sucurilor devine gelatinos, generând probleme de filtrare;
- **industria textilă**, pentru dezapretarea materialelor la a căror apretare s-a folosit amidon;
- **industria chimică**, pentru zaharificarea mediilor amidonoase, în vederea obținerii alcoolului etilic prin procedee fermentative. Va fi discutată această din urmă aplicație.

Principala sursă de amidon este porumbul, dar se mai utilizează și amidon din grâu, orez, cartofi, și din alte cereale. Pentru a aduce amidonul din plante în formă fermentabilă de către drojzii, el trebuie să fie mai întâi hidratat și gelatinizat prin măcinare și fierbere, apoi scindat la zaharuri fermentabile prin hidroliză cu enzime sau acizi slabi.

Amidonurile sunt hidrolizate rapid de acizi (ex. HCl). În suspensii diluate, randamentele în glucoză sunt aproape cantitative, dar operarea unor soluții diluate nu este economică. Hidroliza acidă comercială lucrează cu suspensii de 20% amidon, dar datorită produșilor de retrosinteză, randamentul în glucoză se reduce simțitor. Hidroliza acidă este utilizată în general până la DE de 18-20 (gradul de hidroliză (DE) este definit ca zaharuri reducătoare exprimate sub formă de dextroză și se calculează ca procent de substanță uscată; el indică deci procentul de legături glicozidice scindate). Hidroliza acidă este urmată de o a doua hidroliză, enzimatică, până la valori mari ale DE, în ceea ce se numește procesul acid/enzimă. Într-o altă variantă, numită procesul enzimă/enzimă, se utilizează o secvență de reacții enzimatică: prima hidroliză este efectuată de o  $\alpha$ -amilază bacteriană, termostabilă, a doua de o glucoamilază fungică. Se disting două etape: gelatinizarea și lichefierea amidonului și respectiv zaharificarea.

### 1.5.1. Gelatinizarea și lichefierea amidonului

Amidonul suspendat în apă se gelatinizează prin încălzire, fără a se utiliza enzime. Soluția coloidală rezultată este însă foarte vâscoasă și foarte greu de manipulat la scară industrială. De aceea, enzimele se adaugă la începutul perioadei de încălzire, așa că hidroliza amidonului începe o dată cu gelifierea.  $\alpha$ -Amilazele fungice sau cerealiere nu sunt suficient de termostabile și se dezactivează la temperatura de gelifiere, în schimb,  $\alpha$ -amilaze bacteriene (din *Bacillus amyloliquefaciens* sau *Bacillus licheniformis*) sunt.

În practică, lichefierea se face la pH 6,5, la concentrații de amidon de 30-40%.  $\alpha$ -Amilaza de *Bacillus amyloliquefaciens* se adaugă de la început. Temperatura se menține o oră la 80°C, apoi se urcă rapid la 140°C, sub presiune. Se răcește apoi la 85°C, se mai adaugă enzimă și se menține temperatura o oră. Enzima de *Bacillus licheniformis*, mai stabilă, se poate adăuga o singură dată. Plămada se trece într-un

fierbător la 105°C timp de 5 minute, apoi temperatura se scade la 85°C și se menține două ore. Se obține un hidrolizat cu DE 8-15.

### 1.5.2. Zaharificarea

Zaharificarea se poate realiza numai prin hidroliză acidă. Așa se obține clasic siropul cu DE 42, care conține 19% glucoză, 14% maltoză, 12% maltotrioză și 55% zaharide mai mari.

Zaharificarea enzimatică se realizează cu  $\alpha$ -amilază fungică și glucoamilază fungică, separat sau în combinație. Uneori se mai adaugă și alte enzime ca  $\beta$ -amilaza. Procesul cel mai comun utilizează o combinație de  $\alpha$ -amilază și glucoamilază fungică.  $\alpha$ -Amilaza fungică produce concentrații relativ mari de maltoză, dar nu poate realiza singură viteze mari de conversie. Ea nu hidrolizează legăturile  $\alpha$ -1,6-glicozidice la punctele de ramificare ale amilopectinei. Pe de altă parte, glucoamilaza fungică scindează rapid legăturile  $\alpha$ -1,4, eliberând glucoză de la capetele nereducătoare ale catenei de amidon. Ea hidrolizează și legăturile  $\alpha$ -1,6, dar cu viteze mai mici.

Procesele comerciale cele mai comune pentru siropurile de porumb de conversie înaltă utilizează preparate enzimatiche de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* sau *Rhizopus oryzae*.

Zaharificarea se realizează la concentrații de solide de 25-40%, utilizând ca substrat amidon lichefiat acid sau enzimatic. Se lucrează la pH 4,5 și temperatură de 60°C, mai coborâtă ca cea de lichefiere. Timpul de reacție este de la 24 la 110 ore, în funcție de gradul de conversie dorit. În final enzima trebuie dezactivată pentru a preveni reacțiile de retrosinteză, proces important mai ales la concentrații mari de substrat.

## 1.6. Bibliografie

- 1.1. R. Kuhn, *Ber.* **57**, 1965 (1924).
- 1.2. T. Shibaoka, K. Ishikura, K. Hiromi, T. Watanabe, *J. Biochem.* **77**, 1215 (1975).
- 1.3. C. Banu, *Biotehnologii în industria alimentară*, Ed. Tehnică, București, 1987, p.46.
- 1.4. G. Mencinicopschi, I. Kathrein, V. Teodoru, *Biotehnologii în prelucrarea produselor alimentare*, Ed. Ceres, București, 1987, p.12-22.
- 1.5. G. Zarnea, Gh. Mencinicopschi, St. Brăgărea, *Bioingineria preparatelor enzimatice microbiene*, Ed. Tehnică, București, 1980, p.249-283.
- 1.6. P. Vallier, J. Bata, L. Colbert, *Ann. Microbiol.* **128B**, 359 (1977).
- 1.7. A. K. Kundu, S. Das, *Appl. Microbiol.* **19**, 598 (1970).
- 1.8. T. Nikolov, T. Kibarska, G. Marinopolski, K. Ilieva, *Dokl. Skh. Akad. Sofia* **8**, 73 (1978).
- 1.9. M. Yakubi, N. Ono, K. Hoshino, S. Fukui, *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 1 (1982).
- 1.10. A. M. Malik, M. I. Chaudhari, *J. Biochem.* **10**, 14 (1977).
- 1.11. J. Meyrath, G. Bayer, *Proc. FEBS Meet. (Ind. Clin. Enzymol.)* **61**, 331 (1980).
- 1.12. R. Ulbrich, G. Kvesitadze, A. Chellenberger, *Acta Biol. Med. Ger.* **41**, 509 (1982).
- 1.13. R. Borriss, G. Eberhardt, brevet german (DDR) nr. 144074, 1980.
- 1.14. M. R. Terebiznik, A. M. R. Pilosof, S. Moreno, *J. Food Biochem.* **19** (5), 341 (1996).
- 1.15. M. A. Murado, M. P. Gonzales, A. Torado, L. M. Pastrana, *Progress Biochem.* **32** (1), 35 (1997).
- 1.16. M. Carlsen, J. Nielsen, J. Villadsen, *J. Biotechnol.* **45** (1), 81 (1996).
- 1.17. A. Spohr, M. Carlsen, J. Nielsen, J. Villadsen, *Biotechnol. Lett.* **19** (3), 257 (1997).
- 1.18. T. Agger, A. B. Spohr, M. Carlsen, J. Nielsen, *Biotechnol. Bioeng.* **57** (3), 321 (1998).
- 1.19. J. Jarniewicz, Z. Włodarczyk, *Acta Aliment. Pol.* **4**, 93 (1978).
- 1.20. Z. Ilczuk, J. Fiedurek, A. Paszczyński, *Stärke* **35**, 397 (1983).
- 1.21. A.M. Abou-Zeid, *Microbios* **89** (358), 55 (1997).
- 1.22. P. Woloshuk, J. R. Cavaletto, T. E. Cleveland, *Phytopathology* **87** (2), 164 (1997).
- 1.23. R. S. Bhella, I. Althosaar, *Can. J. Microbiol.* **31**, 149 (1985).
- 1.24. A. Siedenberg, S. R. Gerlach, A. Czwalińska, K. Schugerl, M. L. F. Giuseppin, J. Hunik, *J. Biotechnol.* **56** (3), 205 (1997).
- 1.25. S. Mikami, K. Iwano, S. Shinoki, T. Shimada, *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2495 (1987).
- 1.26. T. Sugauma, N. Noda, H. Honbo, K. Kitahara, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61** (9), 1617 (1997).
- 1.27. Y. Kajiwara, N. Takeshima, H. Ohba, T. Omori, M. Shimoda, H. Wada, *J. Ferment. Bioeng.* **84** (3), 224 (1997).
- 1.28. F. W. Bergmann, J. Abe, S. Hizukuri, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 447 (1998).
- 1.29. J. Abe, F. W. Bergmann, K. Obata, S. Hizukuri, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 447 (1998).
- 1.30. B. Jensen, J. Olsen, K. Allermann, *Biotechnol. Lett.* **9**, 313 (1987).
- 1.31. N. Ohno, H. Fukuda, H. X. Wang, M. Kasamura, H. Shinoyama, T. Fujii, *J. Soc. Ferm. Bioeng.* **76** (3), 111 (1998).
- 1.32. B. R. Mohapatra, U. C. Banerjee, M. Bapuji, *J. Biotechnol.* **60** (1-2), 113 (1998).

- 1.33. G. M. Frost, D. A. Moss în *Biotechnology*, vol. 7a, *Enzyme Technology*, Ed. John F. Kennedy, VCH, Weinheim, 1987, p. 129.
- 1.34. W. M. Fogarty, C. T. Kally, în *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Ed. W. M. Fogarty, C. T. Kally, 2<sup>nd</sup> Ed., Elsevier, London, 1990, p. 72-132.
- 1.35. K. Anstrup, brevet britanic nr. 1.092.458 (1967).
- 1.36. K. L. Smiley, M. C. Cadmus, D. E. Hensley, A. A. Iagado, *Appl. Microbiol.* **12**, 455 (1964).
- 1.37. M. C. Cadmus, G. Jayko, D. E. Hensley, H. Gasdorf, K. L. Smiley, *Cereal Chem.* **43**, 458 (1966).
- 1.38. R. G. Dworschack, C. A. Nelson, brevet SUA 3.660.236 (1972).
- 1.39. L. Barton, C. E. Georgi, D. R. Lineback, *J. Bacteriol.* **111**, 771 (1972).
- 1.40. G. C. Uguru, J. A. Akinyanju, A. Sani, *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 75 (1986).
- 1.41. G. D. Lasater, M. B. Smith, brevet britanic nr. 2.016.476 (1979).
- 1.42. G.-X. Li, Y.-Y. Linko, P. Linko, *Biotechnol. Lett.* **6**, 645 (1984).
- 1.43. D. R. Lineback, I. J. Russell, C. Rosmunsen, *Arch. Biochem. Biophys.* **134**, 559 (1969).
- 1.44. S. Hayashida, *Agric. Biol. Chem.* **39**, 2093 (1975).
- 1.45. E. Yoshino, S. Hayashida, *J. Ferment. Technol.* **56**, 289 (1978).
- 1.46. S. Hayashida, P. Q. Flor, *Agric. Biol. Chem.* **45**, 2675 (1981).
- 1.47. B. Svensson, T. G. Pederssen, I. Svendsen, T. Sakai, M. Ottesen, *Carlsberg Res. Commun.* **47**, 55 (1982).
- 1.48. B. Svensson, K. Larsen, I. Svendsen, E. Boel, *Carlsberg Res. Commun.* **48**, 529 (1983).
- 1.49. Ş. Jurcoane, T. Vintilă, *Biotehnologia enzimelor*, Editura Mirton, Timișoara, 1999, p. 77-96.
- 1.50. B. M. Brenda, C. Pazos, L. Franco-Fraguas, F. Batista-Viere, *J. Chromatogr., B: Biomed. Appl.* **684** (1+2), 217 (1996).
- 1.51. H.-N. Park, J.-C. Yoo, Y.-K. Yang, *J. Microbiol.* **33** (1), 80 (1995).
- 1.52. V. Blanchot, P. Colonna, *Carbohydr. Res.*, **272**, 97 (1995).
- 1.53. Q.-L. Chang, J.-Y. Chen, *Biotechnol. Bioeng.* **48** (6), 745 (1995).
- 1.54. Q.-L. Chang, J.-Y. Chen, *Chem. Eng. J. (Lausanne)* **59** (3), 303 (1995).
- 1.55. Q.-L. Chang, J.-Y. Chen, *Process Biochem. (Oxford)* **31** (4), 371 (1996).
- 1.56. X. Z. Zhang, L. Song, Q. Wang, X.-X. Wu, X. J. Tang, *Shengwu Huaxue Zazhi*, **11** (2), 224 (1995), cf. *Chem. Abstr.* 123: 106.082b.
- 1.57. E. Stein, E. H. Fisher, *J. Biol. Chem.*, **232**, 857 (1958).
- 1.58. T. Tagheki, *J. Biochem.* **89** (2), 363 (1981).
- 1.59. D. K. Ray, *Ann. Biochem. Exptl. Med.* **16**, 111 (1956).
- 1.60. M. R. Terebiznik, M. P. Buerta, A. M. R. Pilosof, *Food Sci. Technol. (Lebensmittel Wissensch. Und Teknol.)* **30** (5), 513 (1997).
- 1.61. N. A. Zerebtov, Z. K. Avdeea, *Pr. Voronezh. Teknol. Inst.* **18**, 107 (1970).
- 1.62. N. Yamada, K. Tomoda, brevet SUA nr. 3.293.142 (1964).
- 1.63. A. M. Abou-Zeid, *Microbios* **89** (358), 55 (1995).
- 1.64. D. Das, J. Roy, P. Sen Gupta, *Ind. Chem. Eng. Sect. A*, **37** (3), 125 (1995).
- 1.65. Y. Kajiwara, N. Tokemisha, H. Olka, M. Shimoda, H. Wada, *J. Ferm. Bioeng.* **84** (3), 224 (1997).
- 1.66. P. Woloshuk, J. R. Caraletto, T. E. Cleveland, *Phytopathology* **87** (2), 164 (1997).



- 1.67. H.-N. Park, J.-Ch. Yoo, Y.-K. Yang, *J. Microbiol.* **33** (1), 80 (1995).
- 1.68. B. R. Mohapatra, U. C. Banerjee, H. Bapup, *J. Biotechnol.* **60** (1-2), 113 (1998).
- 1.69. N. Ohno, H. X. Wang, M. Kasamura, H. Shimoyama, T. Fujii, *J. Soc. Ferm. Bioeng.* **76** (3), 111 (1998).
- 1.70. \*\*\* Catalog BDH, p. 61.
- 1.71. K. Yutani, I. Sasaki, K. Ogasahara, *J. Biochem.* **74**, 573 (1973).
- 1.72. S. J. Tamazic, A. M. Klibanov, *J. Biol. Chem.* **263**, 3086 (1988).
- 1.73. S. J. Tamazic, A. M. Klibanov, *J. Biol. Chem.* **263**, 3092 (1988).
- 1.74. T. Krishnan, J. K. Csandra, *Appl. Environm. Microbiol.* **46**, 430 (1983).
- 1.75. A. B. Blakeney, B. A. Stone, *FEBS Lett.* **186**, 229 (1985).
- 1.76. A. M. Kanno, *Agric. Biol. Chem.* **50**, 23 (1986).
- 1.77. G. Galos, A. Jakubovski, E. Kwapisz, brevet polonez nr. 35943 (1995), cf. Chem. Abstr. 123;54287a.
- 1.78. M. Albayrak, S. Donmez, M. Balk, *Turk. J. Biol.* **20** (Suppl.) 47 (1996), cf. Chem. Abstr. 125;162919h.
- 1.79. M. O. Ilori, O. O. Amund, O. O. Omidiji, *Folia Microbiol.* **42** (5), 445 (1997).
- 1.80. G. Feller, O. Lee Bussy, C. Houssier, C. Gerday, *J. Biol. Chem.* **271** (39), 23836 (1996).
- 1.81. K. Kusunoki, K. Kawakami, F. Sharaishi, K. Kato, M. Kaim, *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 347 (1982).
- 1.82. Y. Morita, M. Ohga, K. Shimizo, *Agric. Biol. Chem.* **30**, 967 (1966).
- 1.83. K. Ono, *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1707 (1988).
- 1.84. D. Alazard, J. F. Baldensperger, *Carboh. Res.* **107**, 231 (1982).
- 1.85. N. Ramasesh, K. R. Sreekantish, V. S. Murthy, *Starch* **34**, 346 (1982).
- 1.86. K. Ono, *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1689 (1988).
- 1.87. K. Ono, *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1699 (1988).
- 1.88. A. Paszczyński, I. Miedzick, J. Lobarzewski, J. Kochmasker, J. Trojanowski, *FEBS Lett.* **149**, 63 (1982).
- 1.89. M. Yasuda, M. Kuwar, H. Matsu, *Agric. Biol. Chem.* **53**, 247 (1989).
- 1.90. J.-P. Iendus, R. R. Crichton, *Biotechnol. Bioeng.* **34**, 267 (1988).
- 1.91. Y. Ezuri, S. Maruo, M. Kojima, H. Yamashita, M. Sugiyama, *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1073 (1988).
- 1.92. H. Nagamoto, T. Yasuda, H. Inoue, *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 1172 (1986).
- 1.93. R. De Mot, H. Verachtert, *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 1474 (1985).
- 1.94. T. Takahashi, N. Inokuchi, *J. Biochem.* **89** (1), 125 (1981).
- 1.95. H. Toda, K. Kondo, K. Narita, *Proc. Japan Acad.* **58**, Ser. B, 208 (1982).
- 1.96. L. Pasero, Y. Mazzei-Pierron, B. Abadie, Y. Chicheportiche, G. Marchis-Mouren, *Biochim. Biophys. Acta*, **869**, 147 (1986).
- 1.97. R. Nakajimi, T. Imanaka, S. Aiba, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 355 (1986).
- 1.98. Y. Matsuura, M. Kusunoki, W. Harada, M. Kakudo, *J. Biochem.* **95**, 697 (1984).
- 1.99. Y. Matsuura, M. Kusunoki, W. Date, W. Harada, S. Bando, N. Tanaka, M. Kakudo, *J. Biochem.* **86**, 1773 (1979).
- 1.100. Y. Matsuura, M. Kusunoki, W. Harada, N. Tanaka, Y. Iga, N. Yasuoka, N. Toda, K. Harita, M. Kakudo, *J. Biochem.* **87**, 1555 (1980).
- 1.101. E. A. MacGregor, *J. Prof. Chem.* **7**, 399 (1988).
- 1.102. M. Qian, R. Haser, G. Buisson, E. Duee, F. Payan, *Biochemistry* **33**, 6284 (1994).
- 1.103. M. Vihinen, P. Matsala, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **166**, 61 (1990).



- 1.104. K. Ishikawa, I. Matsui, K. Honda, H. Nakatani, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **183**, 286 (1992).
- 1.105. K. Ishikawa, I. Matsui, S. Kobayashi, H. Nakatani, K. Honda, *Biochemistry* **32**, 6259 (1993).
- 1.106. D. W. S. Wong, *Food Enzymes*, Chapman&Hall, New York, 1995, p.37-84.
- 1.107. E. Boel, L. Brady, A. M. Brzozowski, Z. Derewenda, G. G. Dodson, V. J. Jensen, S. B. Petersen, H. Swift, L. Thim, H. F. Woldike, *Biochemistry* **29**, 6244 (1990).
- 1.108. J. H. Pazur, H. R. Knull, A. Cepure, *Carboh. Res.* **20**, 83 (1971).
- 1.109. J. H. Pazur, Y. Tominga, L. S. Forsberg, D. L. Simpson, *Carboh. Res.* **84**, 103 (1980).
- 1.110. J. H. Pazur, B. Liv, S. Tyke, C. R. Baumtacker, *J. Prot. Chem.* **6**, 517 (1987).
- 1.111. B. Svensson, K. Larsen, A. Gunnarsson, *Eur. J. Biochem.* **154**, 497 (1985).
- 1.112. A. Aleshin, A. Golubev, L. M. Firson, R. B. Honzatko, *J. Biol. Chem.* **267**, 19291 (1992).
- 1.113. A. Aleshin, C. Hoffman, L. M. Firson, R. B. Honzatko, *J. Mol. Biol.* **238**, 575 (1994).
- 1.114. M. Ohnishi, Y. Nakamura, M. Murata-Nakai, K. Hiromi, *Carbohydr. Res.* **197**, 237 (1990).
- 1.115. R. L. W. Whistler, J. M. BeMiller, *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*, Eagen Press, St. Paul, Minnesota, 1997, p. 139-141.
- 1.116. G. Williamson, N. J. Belshaw, T. R. Noel, S. G. Ring, M. P. Williamson, *Eur. J. Biochem.* **207**, 661 (1992).
- 1.117. G. Williamson, N. J. Belshaw, D. J. Self, T. R. Noel, S. G. Ring, P. Cairns, V. J. Morris, S. A. Clark, M. L. Parker, *Carbohydr. Polymers* **18**, 179 (1992).
- 1.118. B. Svensson, H. Jespers, M. R. Sierks, E. A. MacGregor, *Biochem. J.* **264**, 309 (1989).
- 1.119. T. Amyes, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 7888 (1989).
- 1.120. M. Qian, R. Haser, F. Payan, *J. Mol. Biol.* **231**, 785 (1993).
- 1.121. B. Y. Tao, P. J. Reilly, J. P. Robyt, *Biochim. Biophys. Acta*, **995**, 214 (1989).
- 1.122. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Ed. V, Vol. A9, Ed. L. Kandy, J. F. Rounsaville, G. Schutz, VCH, 1987, 399-405.

*Motto:*

*...the initiated would never have doubted for a moment that Organic Chemistry, whose birth-place is to be found with the proteins, would eventually turn towards them again.*

Emil Fischer, 1906

## 2. Enzime proteolitice în solvenți organici

### 2.1. Structura și mecanismul de acțiune al subtilizinelor

Termenul de **proteaze** se referă la toate enzimele care hidrolizează legăturile peptidice. Se mai utilizează și alte denumiri ca peptidaze și peptid hidrolaze. Acest grup de enzime poate fi subdivizat în **exopeptidaze** (amino și carboxipeptidaze) și **endopeptidaze** (proteineaze).

**Proteinazele** se clasifică în patru grupe, în funcție de restul catalitic implicat în atacul nucleofil la carbonul carbonilic al legăturii scindabile [2.1-2.4]:

- serin-proteinaze (EC 3.4.21),
- cistein- sau tiol-proteinaze (EC 3.4.22),
- aspartic-proteinaze (EC 3.4.23),
- metalo-proteinaze (EC 3.4.24) [2.27-2.30].

**Serin-proteinazele** sunt o clasă de enzime proteolitice studiate mai mult decât orice alt grup de enzime. Au captat o atenție deosebită două familii de serin-proteinaze: familia tripsinei și cea a subtilizinei. Ambele grupuri conțin o triadă catalitică Ser-His-Asp și un oxianion în situsul activ, aceste resturi catalitice prezentând un grad ridicat de similitudine în aranjamentul lor conformațional. Cu toate acestea, enzimele celor două familii prezintă diferențe în secvența de aminoacizi sau în structura lor tridimensională. Se consideră că cele două familii de enzime au o origine comună și că au evoluat probabil independent din proteine ancestrale înrudite [2.2].

În prezentul capitol vor fi descrise **subtilizinele** (EC 3.4.21.14). Spre deosebire de tripsină și chimotripsină, enzime de origine animală, subtilizinele sunt un grup de serin-proteinaze alcaline secretate de specii de *Bacillus*, cunoscute sub diverse denumiri. Subtilizina BPN' (Nagarase, subtilopeptidaza C) și subtilizina Novo (subtilopeptidaza B), obținute inițial din diverse surse comerciale, sunt astăzi cunoscute ca fiind enzime identice produse de *Bacillus amyloliquefaciens*. Subtilizina Carlsberg este produsă de *Bacillus licheniformis*. Alte subtilizine mai puțin cunoscute sunt subtilizina E și DY izolate din tulpini de *Bacillus subtilis*, și subtilizina Amylosacchariticus din *Bacillus amylosacchariticus*.

#### 2.1.1. Structura subtilizinelor [2.1]

**Secvența de aminoacizi.** Subtilizinele Carlsberg și BPN' constau din 274 și respectiv 275 resturi de aminoacizi. Cele două secvențe sunt 70% identice. Diferențele apar la 84 de resturi, Pro56 lipsind în subtilizina Carlsberg. Secvența de aminoacizi dedusă din secvența de ADN diferă în cazul a cinci resturi din enzima Carlsberg și șase din BPN'. Masele moleculare calculate sunt 27.277 și respectiv 27.537. Se cunoaște secvența și masa moleculară și a celorlalte subtilizine.

Subtilizinele prezintă puține similarități cu serin-proteinazele de mamifere în structura primară. De exemplu, secvența din jurul serinei reactive în subtilizină (Thr-Ser-Met-Ala) diferă de cea din chimotripsină și tripsină. Subtilizina nu conține Cys, dar are un conținut ridicat de Gly și de aminoacizi cu resturi hidrofobe.

**Structura tridimensională.** Se cunoaște structura tridimensională a subtilizinei purificate. Informații structurale s-au mai obținut și din complexii subtilizinei cu diverși inhibitori.

Subtilizina BPN' are o structură globulară cu diametrul de 42 Å. Enzima constă dintr-o structură  $\beta$ -pliată paralelă centrală formată din cinci segmente. Antiparalele cu structura de foi pliate se găsesc opt segmente elicoidale (notate de la A la D), care cuprind 31% din totalul de resturi. Elicele C și F sunt interioare, celelalte se găsesc la suprafața moleculei. Molecula conține astfel o structură de tipul  $\alpha/\beta$  diferită de cea a chimotripsinei, care conține două domenii  $\beta$  antiparalele. Subtilizina Carlsberg are o structură similară. Molecula conține o structură  $\beta$  răsucită din șapte foi  $\beta$  paralele.

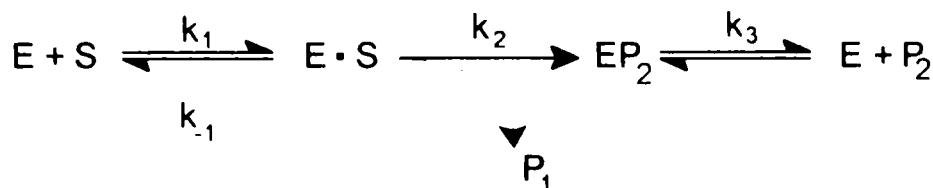
**Situsul activ.** Situsul activ este localizat lângă capătul C-terminal al foii  $\beta$  legate de elicele C și F, într-o depresiune a suprafeței enzimei. Ser221, cu rol catalitic, este restricționată conformațional de o răsucire inversă a catenei, cu formarea unei bucle legate prin legături de hidrogen. His64, esențială, este ținută de asemenea într-o conformație rigidă de către o răsucire de același tip. Restul imidazolic este localizat aproape de OH-ul reactiv al Ser221, însă nu prin legături de hidrogen. Ser-O<sub>γ</sub> este la 3,7 Å de His-N<sub>ε2</sub>, la 2,5 Å de poziția ideală pentru formarea legăturii de hidrogen. Atomul de N<sub>δ1</sub> nu este bine localizat pentru a forma o legătură de hidrogen cu O<sub>δ2</sub> a Asp32, la o distanță N...O de 2,4 Å. O moleculă de apă este localizată lângă Ser-His, putând forma legături de hidrogen cu Ser221-OH, His64-N<sub>ε2</sub> și Asn155-NH<sub>2</sub>.

**Situsul de legare al substratului.** Situsul de legare este o cavitate extinsă care constă din cel puțin 6 subsitusuri (de la S<sub>4</sub> la S<sub>2</sub>'), sau chiar opt subsitusuri (S<sub>5</sub> la S<sub>3</sub>'). Conform nomenclurii subsitus/substrat, situsul catalitic este localizat între S<sub>1</sub> și S<sub>1</sub>'. Substratul (NH<sub>2</sub>-P<sub>n</sub>---P<sub>1</sub>-P<sub>1</sub>'---COOH) are segmentul N-terminal al legăturii scindabile ca grupare acilantă (sau situs de specificitate) și segmentul carboxil ca grupare fugace. Un segment extins Ser125-Gly127 pe o parte a situsului de legătură prezintă o structură de foi  $\beta$  pliate antiparalele prin formarea unui sistem de legături de hidrogen cu partea acilantă a catenei polipeptidice din substrat. Celălalt perete al situsului este alcătuit din catenele laterale și scheletul Ala152-Glu156. Situsurile de legătură P<sub>1</sub>' și P<sub>2</sub>' sunt mai puțin definite și interacțiunile enzimă-substrat sunt mai puțin extinse ca în partea de acilare.

**Situsul de legare al cationului.** Subtilizinele sunt stabilizate împotriva autolizei prin cationi divalenți de calciu. Din structura de raze X a unui complex al subtilizinei Carlsberg s-a dedus existența a două situsuri de legare a calciului (segmentele Ala74-Leu82 și Pro168-Ile175). În primul situs, calciul este legat octaedric de șase atomi de oxigen din grupările carbonil ale Leu75, Thr79 și Val81, și grupările carboamidice ale Gln2 și Asn77. Al doilea situs de legare nu are o geometrie la fel de bine definită. Calciul este înconjurat de atomii de oxigen carbonilici ai Ala167, Tyr171 și Val174. O coordonare similară cu primul situs a fost identificată și în structura cristalină a enzimei de *Bacillus amyloliquefaciens*. Distanțele din al doilea situs sunt însă mai potrivite pentru K<sup>+</sup> ca pentru Ca<sup>2+</sup>.

### 2.1.2. Mecanismul catalitic [2.1-2.6]

Subtilizina catalizează hidroliza esterilor și amidelor. Hidroliza legăturii esterice decurge cu o viteză de câteva ordine de mărime mai mare ca cea a legăturii amidice din substraturile oligopeptidice. Sunt cunoscute constantele cinetice  $k_{cat}$  și  $K_m$  pentru un mare număr de esteri și amide reactive. Reacția de hidroliză catalizată de serin-proteinaze poate fi descrisă de următoarea schemă cinetică:



unde :

- ES = complexul Michaelis
- EP<sub>2</sub> = intermediarul acil-enzimă

Parametrii Michaelis-Menten obținuți din ecuația de stare staționară și sunt:

$$K_m = K_s k_3 / (k_2 + k_3)$$

$$k_{cat} = k_2 k_3 / (k_2 + k_3)$$

În cazul substraturilor esterice reactive, viteza de acilare este mai mare decât cea de dezacilare ( $k_2 \gg k_3$ ),  $K_m \sim K_s k_3 / k_2$ , și etapa determinantă de viteză este cea controlată de  $k_3$  (dezacilarea). În cazul substraturilor amidice și peptidice,  $k_2 \ll k_3$  și  $k_2 \sim k_{cat}$  iar  $K_m \sim K_s$ .

Dependența  $k_{cat}$ -pH a reacțiilor catalizate de serin-proteinaze are forma unei curbe bine profilate, reflectând o activitate maximă la pH 8. Curbele din domeniul acid și bazic corespund la două ionizări importante din punct de vedere cinetic, cu pK de 7 și 9. Ambele etape, de acilare și dezacilare, prezintă un profil  $k_{cat}$ -pH sigmoidal, corespunzând unui grup protoprotic cu pK~7, His, implicată în  $k_{cat}$  ( $k_3$  pentru substratul esteric,  $k_2$  pentru cel amidic). Gruparea ionizabilă cu pK~9 afectează  $K_m$ , adică curba  $1/K_m$  vs. pH are o reprezentare sigmoidală cu pK~9. Creșterea lui  $K_m$  la valori mari ale pH este legată de o modificare conformațională. În chimotripsină, aceasta este cauzată de interconversia între forma activă și inactivă, constând din formarea unei punți de sare între Ile16-Asp194. Totuși, în reacțiile catalizate de subtilizină,  $K_m$  nu se modifică cu pH-ul, sugerând că nu apar modificări conformaționale în domeniul alcalin.

Mecanismul catalitic general al serin-proteinazelor de scindare a legăturii amidice este reprezentat prin două reacții parțiale (figura 2.1):

- **Acilarea:** transferul grupării acilante a substratului la Ser reactivă a enzimei;
- **Dezacilarea:** gruparea acil din acil-enzimă este înlocuită de apă (sau alt nucleofil), transformându-se în grupare fugace.

Cele două reacții parțiale constau din următoarele etape:

- Formarea complexului Michaelis (ES) între enzimă și substrat, necovalent și reversibil.
- Formarea unui intermediar tetraedric covalent prin atacul nucleofil al Ser221-O<sub>y</sub>, reactiv, asupra carbonului carbonilic al legăturii scindabile a substratului, etapă facilitată de o cataliză bazică generală, prin His64.
- Descompunerea intermediarului acil-enzimă prin protonarea grupării fugace (segmentul C-terminal) a substratului de His64.
- Atacul nucleofil al apei, asistat de un catalizator bazic general, His64, cu formarea unui alt intermediar tetraedric.
- Scindarea intermediarului prin protonarea catalizată de His64 a Ser220-O<sub>y</sub>, cu eliberarea restului acil (segmentul N-terminal) al substratului, sub formă de acid.

**Triada catalitică.** Triada catalitică din serin-proteinaze funcționează sinergetic, având drept consecință creșterea vitezei de hidroliză de  $\sim 2 \times 10^6$  ori, comparativ cu reacția neenzimatică, așa cum s-a demonstrat prin studii de mutagenză direcționată a

subtilizinei. Înlocuirea individuală a Ser221, His64 sau Asp32 duce la o descreștere semnificativă a  $k_{cat}$  de  $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  și respectiv  $3 \times 10^4$  ori, în timp ce valorile  $K_m$  se modifică doar puțin [2.7].

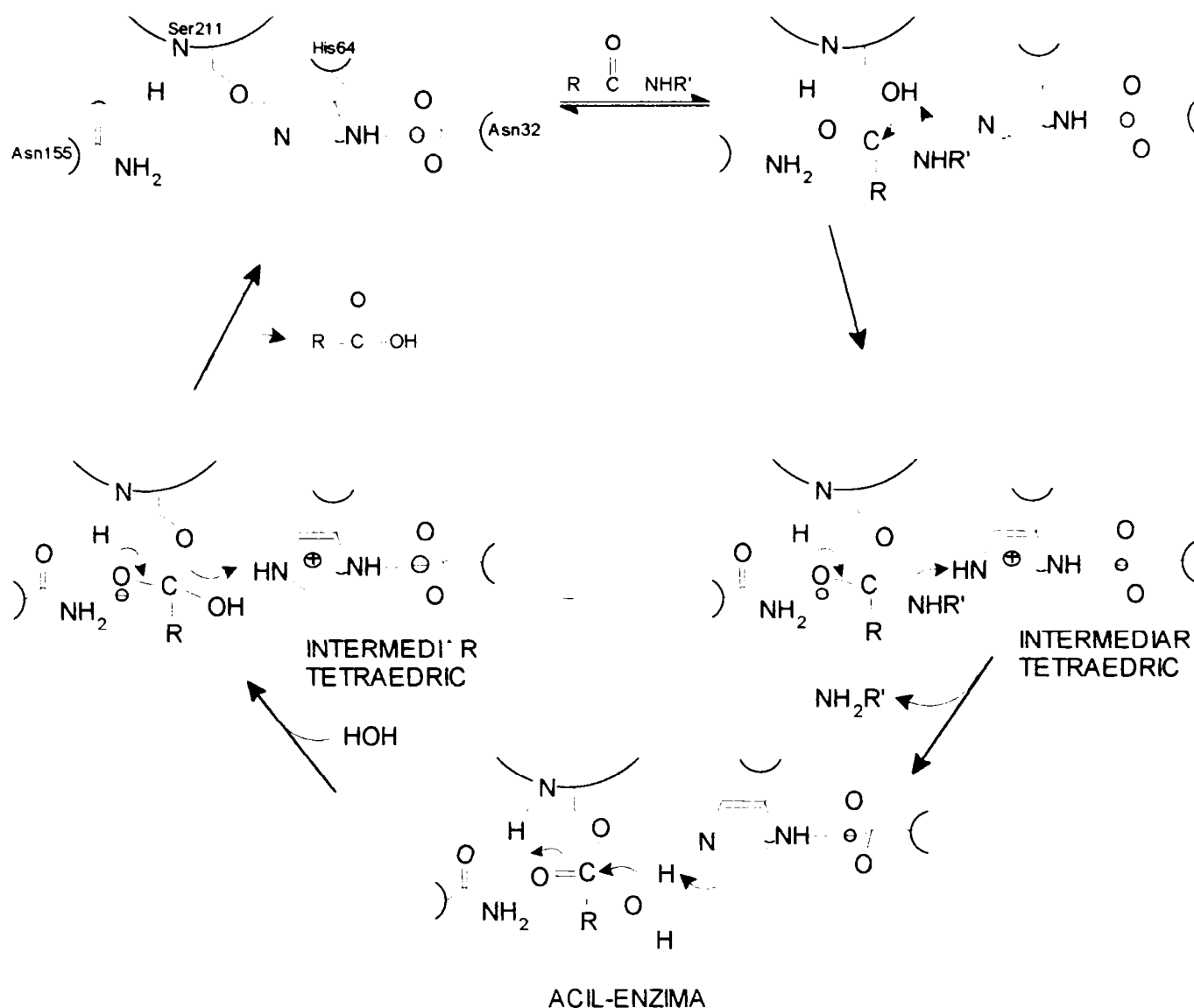


Figura 2.1. Mecanismul de reacție al subtilizinei

**Protonarea și distribuția de sarcini.** Rolul Ser221 ca nucleofil în formarea legăturii covalente între oxigenul hidroxilic și carbonul carbonilic al substratului este bine stabilit. Subtilizinele au în comun cu celelalte serin-proteinaze faptul că sunt inhibate de diizopropilfluorofosfat. Distribuția de sarcini și starea de protonare a His esențiale, ca și cea a Asp32, au constituit un subiect de dezbateri intense, încă de la descrierea sistemului de transfer de sarcină a chimotripsinei. Acest sistem implică un transfer dublu și concertat de protoni de la Ser221 la His64- $N_{\delta 2}$  și de la His64- $N_{\delta 1}$  la Asp32- $O_{\delta 2}$ , cu o reprezentare schematică  $[-COOH...N-Im-NH...O-CH_2^-]$ . O serie de calcule moleculare au susținut această schemă de transfer dublu de protoni [2.8]. Însă, o serie de studii au stabilit că al doilea transfer nu are loc și protonul este la imidazol și nu la aspartat. Astfel, calculele teoretice de potențiale electrostatice la situsul activ al chimotripsinei și subtilizinei înlocuind Asp cu Asn au sugerat că Asp din triadă trebuie să rămână ionizat. Un transfer al protonului de la His la Asp va cauza o creștere nefavorabilă de  $\sim 10$  kcal/mol în energia liberă a stării de tranziție [2.9, 2.10].



**Rolul Asp32.** Se crede că ionul carboxilat al Asp32 din triadă stabilizează sarcina pozitivă formată la His, esențială în starea de tranziție. Diferența de energie între perechea de ioni Asp-His și resturile neîncărcate este de ~4 kcal/mol, în acord cu efectul de stabilizare observat în studiile de mutageneză direcționată. Interacția de sarcini între resturile triadei [Asp<sup>-</sup>His<sup>+</sup>Ser<sup>-</sup>] joacă un rol semnificativ în scăderea energiei de activare a reacției către starea de tranziție. Energia de stabilizare estimată este de 27 kcal/mol (figura 2.2) [2.11].

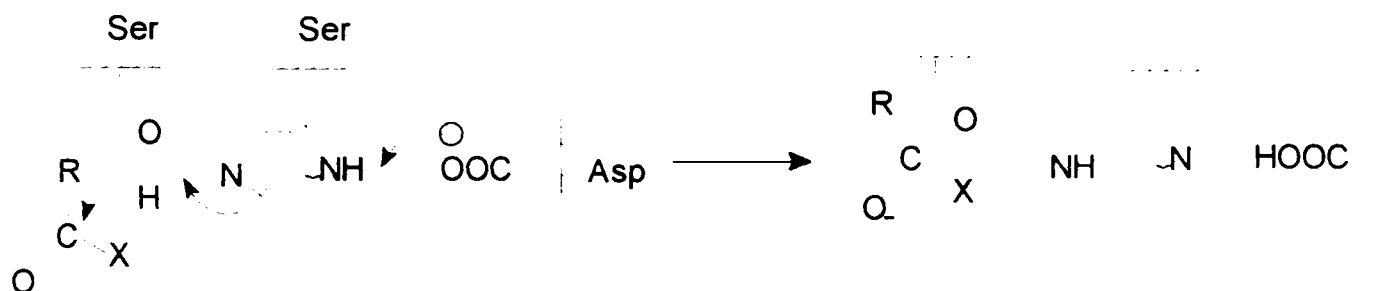


Figura 2.2. Sistemul de transfer de sarcină (triada catalitică) al subtilizinei

Pe lângă funcțiile descrise, Asp32 poate asista la orientarea imidazolului din His64 în stereochemia corectă pentru ca transferul de proton să aibă loc în timpul catalizei. Mai mult, ionul carboxilat din Asp modifică micromediul local dielectric și electrostatic al restului imidazolic din His esențială prin formarea transferului de sarcini în triada [Asp<sup>-</sup>His<sup>+</sup>Ser<sup>-</sup>] și a intermediarului tetraedric încărcat negativ. Valoarea pK a His64 este mărită de la o valoare normală de 7,2 în enzima nativă la ~9,5, comparabilă cu cea a azotului grupării fugace a substratului în intermediarul tetraedric [2.1].

**Valoarea pK a His64.** Modificarea pK și deci a afinității protonului His64 în tranziția spre formarea intermediarului tetraedric are implicații în mecanismul catalizei. Dacă pK a imidazolului histidinic ar rămâne la 7,2 în starea de tranziție, protonul Ser-O<sub>γ</sub> ar fi transferat azotului grupării fugace, cu un pK mai mare, de 8-11, înainte ca intermediarul tetraedric să se poată forma (înainte de formarea legăturii între carbonul carbonilic al amidei și Ser-O<sub>γ</sub>).

His64 are un rol bifuncțional, acționând ca un catalizator bazic pentru a extrage un proton din Ser221-OH și, într-o etapă ulterioară, ca un acid, protonând gruparea fugace a substratului. Primul este necesar pentru atacul covalent al oxigenului din Ser221 la carbonul carbonilic al substratului. Etapa de protonare este necesară deoarece amina neprotonată este o grupare fugace slabă. Din motive similare, intermediarul tetraedric are oxigenul carbonilic sub formă de anion [2.12].

**Cavitatea oxianionică.** Oxigenul anionic din carbonilul substratului format în intermediarul tetraedric este legat prin legături de hidrogen de Asn155-N<sub>δ2</sub> și de NH din Ser221. Mutația Asn155 la Ala duce la o reducere a k<sub>cat</sub> de 200-300 de ori. Legătura de hidrogen cu oxianionul Asn155 contribuie cu 3,7 kcal/mol la stabilizarea stării de tranziție [2.13]. A fost găsită de asemenea o legătură de hidrogen între oxianion și gruparea γ-hidroxică a Thr220, legătură care furnizează 1,8-2,0 kcal/mol de stabilizare în oxianion. Contribuția totală prin legături de hidrogen în cavitatea oxianionică este de ~14 kcal/mol. Această energie de stabilizare, precum și interacția între perechile de ioni din Asp32 și His64 sunt responsabile de accelerarea vitezei globale de hidroliză [2.11].

**Complexul Michaelis.** În complexul de legare a substratului de subtilizină nu există o legătură de hidrogen între Ser221 și imidazolul His64. Nici legătura de hidrogen dintre His din situsul activ și Asp nu există în enzima nativă. Molecula de apă care în enzima liberă blochează cavitatea oxianionică, localizată lângă Ser221-O<sub>γ</sub> și His64-N<sub>γ</sub>,



este eliminată în complex. Nu există legături de hidrogen între oxigenul carbonilic al substratului și  $\text{NH}_2$  al Ser221 sau Asn155- $\text{N}_{\delta 2}$  din cavitatea oxianionică. În complex nu există legături de hidrogen  $\text{S}_1\text{-P}_1$  între hidrogenul azotului amidic al  $\text{P}_1$  și oxigenul carboxilic al Ser125, deși cele două grupări sunt bine poziționate pentru a forma o astfel de legătură. Totuși, carbonul carbonilic al legăturii scindabile din substrat este poziționat favorabil atacului nucleofil al Ser221- $\text{O}_\gamma$  și protonării azotului de His64 [2.14].

**Intermediarul tetraedric.** În tranziția de la complexul Michaelis la intermediarul tetraedric există o serie de etape cheie [2.9, 2.11]:

- Transferul protonului Ser221- $\text{O}_\gamma$  la His64- $\text{N}_{\epsilon 2}$  mărește nucleofilicitatea oxigenului hidroxilic pentru atacul la carbonul carbonilic al legăturii scindabile din substrat. Probabil atacul nucleofil prin Ser- $\text{O}_\gamma$  și transferul protonului la His- $\text{N}_{\epsilon 2}$  au loc simultan.
- Formarea legăturii covalente între Ser221- $\text{O}_\gamma$  și carbonul carbonilic determină modificări conformaționale la carbonul central (de la geometrie  $\text{sp}^2$  la  $\text{sp}^3$ ), astfel că oxigenul carbonilic este deplasat într-o poziție favorabilă formării unei legături de hidrogen cu NH din Ser221 și Asp155- $\text{NH}_{\delta 2}$ .
- Substratul formează un sistem de legături de hidrogen de structură antiparalelă  $\beta$  cu un segment extins în situsul de legare a enzimei.

Încercările de detectare directă a acumulării de intermediar tetraedric în hidroliza amidelor catalizată de serin-proteinaze (prin experimente de tip 'stopped-flow' sau prin spectrometrie  $^{13}\text{C}$ -RMN) nu au furnizat dovezi concludente, deși există numeroase date care susțin existența lui: studii de structură-reactivitate în cataliza substraturilor, studii cristalografice, analize spectroscopice de legare de inhibitori sau analogi de substrat (clormetilcetona) [2.15].

Indiferent dacă există sau nu un aduct tetraedric stabil, starea de tranziție trebuie să semene structural cu acesta. Presupunând că s-a format un intermediar tetraedric stabil, trebuie să existe două stări de tranziție,  $\text{ST}_1$  și  $\text{ST}_2$ , de formare și respectiv de descompunere a acestuia (figura 2.3).

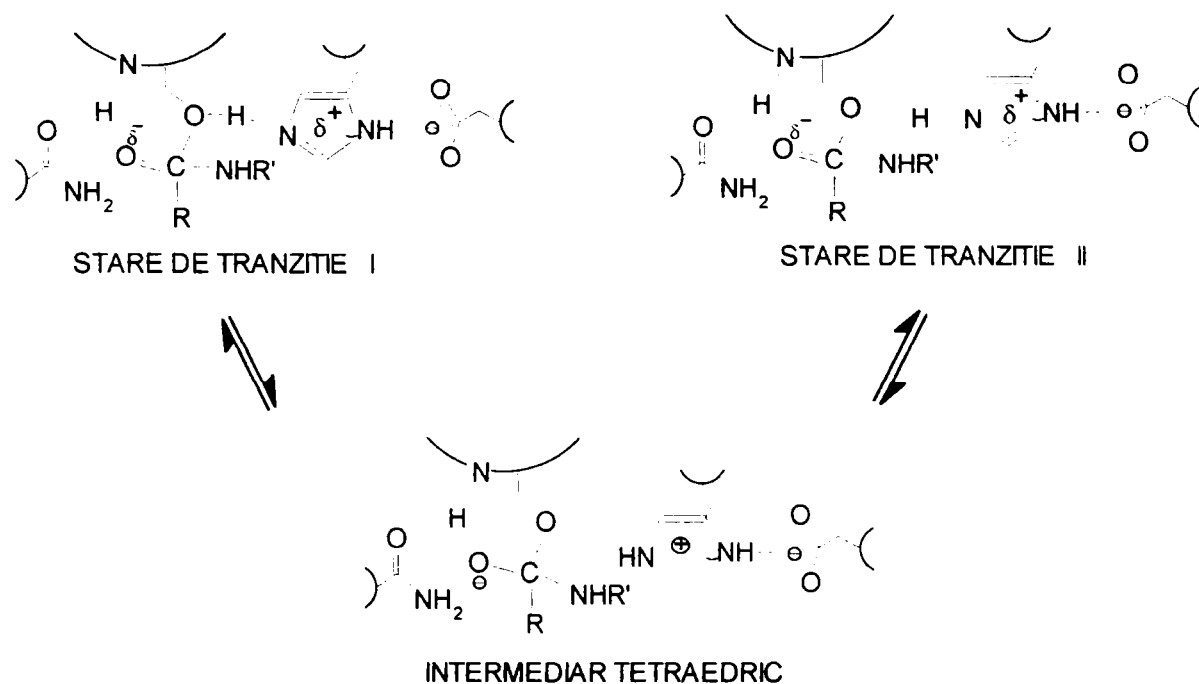


Figura 2.3. Stările de tranziție ale intermediarului tetraedric cu formarea și ruperea legăturilor în triadă și în cavitatea oxianionică în etapa de acilare.

**Acil-enzima.** Conversia intermediarului tetraedric în acil-enzimă necesită protonarea azotului amidic din legătura peptidică scindabilă a grupării fugace. Aceasta duce la ruperea legăturii peptidice, iar carbonul carbonilic își revine conformația plană. Legătura în acil-enzimă prezintă un spectru de absorbție și frecvențe de rezonanță Raman corespunzătoare mai degrabă unei aldehide decât unui ester. Această distorsiune conformațională poate mări susceptibilitatea la atac nucleofil a carbonilului acil-enzimei și facilita astfel descompunerea sa. De fapt, se știe că acil-enzimele sunt hidrolizate cu o viteză de  $10^9$  ori mai mare decât esterii serinici cu structuri similare [2.16].

Analiza spectrelor vibraționale Raman ale grupărilor acilcarbonil dintr-o serie de acil-subtilizine demonstrează o creștere în caracterul de legătură simplă al carbonilului. Această creștere în lungime atinge 7% din modificarea așteptată la trecerea de la C=O la C-O. O astfel de distorsionare a structurii fundamentale scade energia liberă de transformare în următoarea stare de tranziție și contribuie la o descreștere în energia de activare a etapei de dezacilare. Mai mult, toate aceste modificări care în ultimă instanță se reflectă în creșterea de viteză observată pot fi atribuite formării de legături de hidrogen de către oxianion [2.17, 2.18].

Rezultatele unui studiu combinat de crioenzimologie și spectroscopie de dublă rezonanță nucleară și electronică demonstrează că formarea unei acil-enzime de către chimotripsină este însoțită de o torsionare semnificativă a conformației substratului în timpul legării. Apariția unei astfel de conformații instabile în substrat la legarea enzimei este în concordanță cu teoria stării de tranziție, conform căreia situsul activ al enzimei este complementar nu cu structura stării fundamentale a substratului, ci cu o formă modificată, mai apropiată de starea de tranziție [2.19].

### 2.1.3. Specificitatea de substrat

Caracteristicile subsitusurilor și interacțiile lor cu substraturile sunt determinate prin studierea complexilor enzimei cu diferite substraturi sau diferiți inhibitori.

Situsul de legare al subtilizinelor constă în cel puțin șase subsitusuri,  $S_4$ ,  $S_3$ ,  $S_2$ ,  $S_1$ ,  $S_1'$ ,  $S_2'$ . Au fost descrise de asemenea interacții implicând opt subsitusuri. Resturile din gruparea acilantă au mai multe interacții cu subsitusurile decât resturile grupării fugace.  $S_1$  și  $S_4$ , realizează toate contactele intermoleculare [2.20].

În toate studiile de legare ale subtilizinelor și tripsinelor, subsitusurile  $S_1$ ,  $S_2$  și  $S_3$  se complexează cu  $P_1$ ,  $P_2$  și  $P_3$  ale substraturilor oligopeptidice formând un sistem de legături de hidrogen cu structură de foi  $\beta$  antiparalele. În subtilizina BPN', cele trei subsitusuri implică segmentul de catenă cu resturile Ser125-Leu126-Gly127.

Subtilizina, ca și chimotripsina de altfel, prezintă o preferință pentru grupările aromatice și apolare la  $P_1$ . Chimotripsina prezintă afinitate pentru resturi hidrofobe mari, în timp ce tripsina rupe peptide cu resturi Arg/Lys la  $P_1$ . Specificitatea  $P_1$  în subtilizina este mai largă decât cea a chimotripsinei. Astfel subsitusul  $S_1$  este o cavitate mare, deschisă, mărginită de numeroase resturi hidrofobe. În cazul enzimei de *Bacillus amyloliquefaciens*, aceasta include Ala152-Glu156, Met124-Leu126, și Thr164-Tyr167. Mutația direcționată a Gly166 cu 12 resturi neionice evidențiază mari modificări în specificitatea față de substraturi cu diferite mărimi și hidrofobități. Eficacitatea catalitică  $k_{cat}/K_m$  crește cu creșterea hidrofobității substituției, dar este afectată negativ prin repulsia sterică a resturilor  $S_1$ - $P_1$ . Mărirea catenei laterale a restului 166 determină o descreștere în  $k_{cat}/K_m$ , proporțională cu mărimea restului substratului  $P_1$  [2.21].

Pe lângă resturile apolare aromatice, cu  $S_1$  interacționează și Lys în  $P_1$ , într-un mod de legare productiv. Analiza cristalografică a subtilizinei BPN' arată că NH-ul Lys

peptidei  $P_1$  formează o legătură de hidrogen cu oxigenul din Ser125, în timp ce azotul  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> formează o pereche de ioni cu Glu156-O. În enzima Carlsberg, Glu156 este substituită de Ser. O mutație Glu156→Ser în enzima de *Bacillus amyloliquefaciens* determină o creștere în  $k_{cat}/K_m$  pentru Glu în  $P_1$ , și o descreștere pentru Lys, datorită modificărilor în  $K_m$  [2.22].

Situsul de legare a  $P_2$  este situat în buzunarul hidrofob și este compus din inelul imidazolic al His64 și catena laterală a Leu96. Subtilizina prezintă o preferință  $P_2$  pentru aminoacizi alifatici, substratul optim fiind Ala.  $P_2$  Ala-C $\beta$  interacționează cu His64 și Leu96-C $\delta_1$ . Resturi cu catene laterale mari pot determina interferențe sterice [2.21].

Interacția  $S_3$ - $P_3$  este unică în aceea că restul substratului  $P_3$  se orientează către solvent, fără să prezinte un contact specific cu enzima [2.20, 2.23].

Situsul de legare  $P_4$  prezintă o afinitate chiar mai mare ca cea a subsitusului  $S_1$  pentru resturile aromatice. La aceasta se adaugă o largă specificitate de substrat la  $P_1$ . Tripsina și chimotripsina contrastează în aceea că interacțiile implicând substratul  $P_1$  au contribuția maximă în specificitatea de substrat. Catena laterală a  $P_4$  se potrivește în pachetul hidrofob  $S_4$  mărginit de catenele laterale ale Tyr104, Ile107, Leu126 și Leu135, și catenele de bază ale Ser101, Gly102, Gly127 și Gly128. Subsitusul  $S_4$ , cu o mărime flexibilă, poate să accepte substraturi  $P_4$  cu resturi voluminoase [2.20].

Subsitusul  $S_1'$  în subtilizina BPN' este o mică cavitate mărginită de resturile Tyr217, His64 și Met222. El acceptă bine aminoacizi mici, Ala sau Gly, prezentând valori  $k_{cat}/K_m$  mari. Peptidele cu Asp la  $P_1'$  sunt hidrolizate cu viteze mici. Aminoacizii  $\beta$ -ramificați produc împiedecări sterice. Val și Ile determină o descreștere în  $k_{cat}$ . Introducerea Pro la  $P_1'$  duce la inhibarea hidrolizei, Pro neputând fi protonată în etapa de acilare.

În subtilizina BPN', situsul de legare  $P_2'$  este mărginit de catenele extinse ale Asn218, Gly219 și Phe189. Substraturi cu Leu la  $P_2'$  prezintă o valoare mare a  $k_{cat}/K_m$  datorită afinității mari. Azotul amidic  $P_2'$  și oxigenul carbonilic formează legături de hidrogen cu oxigenul carbonilic din catena de bază și gruparea amido a Asn218.  $S_2'$  a enzimei are afinitate pentru aminoacizii alifatici și aromatici. Arg încărcată pozitiv este bine hidrolizată, în timp ce Pro determină o descreștere semnificativă a  $k_{cat}/K_m$  [2.23].

## 2.2. Parametrii care guvernează cataliza enzimatică în mediu organic

În ultimele decenii s-a înregistrat un progres remarcabil în înțelegerea proprietăților enzimelor în mediu organic. Deși cataliza cu enzime suspendate în solvenți organici a fost observată pentru prima dată cu aproape 40 de ani în urmă, cercetarea în acest domeniu a progresat doar într-o măsură limitată până la începutul anilor 1980. Primele rapoarte acopereau majoritar enzimele hidrolitice și aveau de-a face în principal cu aspectele aplicative ale biocatalizei în mediu neapos, fără a se concentra asupra aspectelor mecaniciste ale acestui fenomen. Cataliza enzimatică în medii neapoase nu a fost acceptată și recunoscută ca un fenomen general, până când nu a fost realizat un studiu fundamental al unui număr mare de biocatalizatori [2.24].

Se crede acum că enzimele sunt catalitic active în solvenți organici deoarece ele rămân blocate în conformația lor nativă. Incapacitatea proteinei de a se denatura în medii neapoase se datorează, în parte, interacțiunilor electrostatice mărite în solvenți organici (datorită constantei dielectrice scăzute a majorității solvenților) precum și unei rețele crescute de legături de hidrogen intramoleculare [2.25].

Este o chestiune intuitivă faptul că stabilitatea proteică în medii neapoase ar trebui să fie radical diferită față de cea din apă. Din moment ce moleculele de apă care

înconjoară o enzimă într-o soluție apoasă contribuie la toate forțele majore care stabilizează conformația pliată, inclusiv interacțiunile Van der Waals, punțile de sare și legăturile de hidrogen, îndepărtarea apei din jurul proteinei ar altera stabilitatea acesteia. Din moment ce apa joacă un rol crucial în interacțiunile enzimă-substrat, specificitatea de substrat a enzimelor în medii neapoase ar trebui să fie modificată.

Deși se acceptă astăzi existența efectului solventului asupra specificității și a stabilității, mecanismul stabilizării proteinelor în solvenți organici și dependența parametrilor catalitici de caracteristicile solventului nu au fost încă pe deplin elucidate.

Utilizarea enzimelor în medii neapoase reprezintă o direcție de cercetare plină de perspective, mai ales în cazul sistemelor organice monofazice, unde enzima nu se mai găsește într-un mediu predominant apos. Din acest motiv, nu se mai poate face o asociere directă cu caracteristicile cinetice și mecanicistice cunoscute din enzimologia în soluții apoase. Nu se cunoaște încă influența tuturor factorilor care afectează cataliza enzimatică în solvenți organici monofazici, în majoritatea cazurilor fiind clare doar o serie de tendințe generale.

### 2.2.1. Rolul apei în cataliza enzimatică în mediu organic

Proprietățile fizice și chimice ale enzimelor depind foarte mult de rolul direct sau indirect al apei în interacțiunile necovalente (electrostatice, legături de hidrogen, Van der Waals, hidrofobe) care ajută la menținerea conformației catalitic active a enzimei. Înlocuirea apei cu un solvent organic ar distorsiona în principiu structura nativă a proteinei și ar distruge activitatea enzimatică. De fapt, nici un solvent complet anhidru nu a fost capabil să mențină activitatea enzimatică (activitatea crește pe măsură ce gradul de hidratare al enzimei crește), deoarece o cantitate minimă de apă rămâne necesară pentru cataliză. Este clar că enzimele necesită apă, însă nu este clar încă în ce cantitate. În schimb, prea multă apă va facilita agregarea enzimei, ceea ce va duce la o descreștere de activitate. Acest mecanism nu a fost studiat în detaliu, deși se sugerează că pare a fi importantă formarea de punți disulfurice [2.26].

Există dovezi care sugerează că o moleculă de enzimă în soluție apoasă este complet hidratată, atunci când este înconjurată de câteva straturi de apă [2.27]. Estimările grosimii stratului de apă sunt încă o pură speculație. O ipoteză acceptată este aceea că molecula de enzimă necesită un strat de hidratare subțire care acționează ca un tampon între suprafața enzimei și mediul de reacție. De aceea este foarte improbabil ca molecula de enzimă să fie afectată de faza apoasă de dincolo de stratul de hidratare, dacă nu se produce o alterare semnificativă a micromediului enzimatic [2.28, 2.29].

De aici rezultă că ar fi posibil să menținem o enzimă, complet hidratată și activă, într-o cantitate mică de apă, masa de soluție constând dintr-un solvent organic care nu va afecta micromediul enzimei. Acesta este principiul de bază al catalizei enzimatică în medii cu conținut redus de apă (aproape anhidre) [2.24, 2.30].

La adăugare de apă în solventul organic, ea se repartizează între solvent, substrat, enzimă și suport (dacă acesta există). Activitatea enzimei este dependentă de apa asociată de aceasta, și, într-o mai mică măsură, de conținutul de apă al întregului sistem [2.27]. Câtă apă este necesară pentru cataliza enzimatică în solvenți organici? Răspunsul pare a fi dependent de natura enzimei.

Astfel, chimotripsina suspendată în octan rămâne catalitic activă dacă sunt prezente numai 50 de molecule de apă/moleculă de enzimă [2.31]. Alte enzime hidrolitice, ca subtilizina și diferite lipaze, necesită concentrații foarte mici de apă [2.27, 2.32, 2.33]. Altele este nevoie de mult mai multă apă. Fiecare enzimă trebuie să fie



examinată la niveluri diferite de hidratare în solvenți și este foarte probabil ca enzimele raportate anterior ca fiind inactive, să nu fie folosite la niveluri de hidratare optime.

Un aspect interesant al catalizei enzimatică în medii cu conținut redus de apă este efectul pH-ului de reacție. În soluții organice care nu au o fază apoasă distinctă, măsurarea pH-ului nu este tehnic posibilă, deși va exista o concentrație mică de protoni în vecinătatea enzimei. Dar, indiferent dacă putem sau nu măsura pH-ul în mediu organic, grupările ionizabile ale enzimei vor răspunde condițiilor de mediu. Într-un tampon apos aceste grupări se găsesc într-o stare ionizată dependentă de pH-ul soluției. În solvenți organici, nu există o forță motrice care să determine schimbarea stării de ionizare a grupărilor încărcate din proteină și astfel starea chimică a unei enzime rămâne neschimbată față de cea a soluției apoase din care a fost ultima oară separată [2.8]. Se utilizează adesea enzime liofilizate dintr-un tampon și la un pH adecvat [2.31].

pH-ul influențează de asemenea reacțiile secundare posibile. Deși viteza reacției de hidroliză catalizate de esteraze este mai rapidă la pH slab alcalin, este indicat să se micșoreze pH-ul astfel încât hidroliza bazică, neenzimatică, să fie minimă, iar excesul enantiomeric mai mare. Ajustarea pH-ului poate fi deci foarte utilă la optimizarea reacțiilor de sinteză catalizate de enzime.

Influența apei asupra activității enzimatică se poate explica și prin faptul că ea mărește flexibilitatea și polaritatea tuturor regiunilor proteinei native, inclusiv pe cea a situsului activ, acționând ca un plastifiant, așa cum s-a arătat pentru subtilizină, de exemplu în tetrahidrofuran [2.34, 2.35].

Unele dintre proprietățile noi ale enzimelor în mediu organic se pot datora rigidității conformaționale mari în absența apei, și aceste efecte pot fi modificate prin mărirea flexibilității datorate apei. Russell și Klibanov [2.36] au obținut o creștere de 100 ori în activitatea subtilizinei în solvent anhidru dacă enzima a fost liofilizată din soluție apoasă conținând inhibitori competitivi, comparativ cu enzima liofilizată în absența unor astfel de liganzi. Adăugarea de apă, totuși, înlătură această "memorie moleculară" prin creșterea flexibilității proteinei.

O activitate constantă a apei în solvenți poate fi realizată pe cel puțin trei căi:

- preechilibrarea separată a soluției de substrat și a preparatului enzimatic cu o soluție apoasă saturată a unei sări,
- adăugarea directă a unei sări hidratate la sistemul de reacție,
- adăugarea unei cantități fixe, dar diferite de apă la fiecare solvent.

Metoda a doua, introdusă de Halling [2.37], a fost utilizată în cazul subtilizinei și a  $\alpha$ -chimotripsinei [2.38, 2.39]. Dacă activitatea apei nu este controlată, poate să apară o creștere a conținutului optim de apă (pentru o activitate catalitică maximă) pe măsură ce polaritatea solventului crește [2.40, 2.41].

Dependența activitate enzimatică-activitatea apei variază de la enzimă la enzimă. Astfel, chimotripsina suspendată în solvenți organici catalizează sinteza de peptide dacă activitatea apei este controlată de o sare hidratată ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ), deși toate componentele implicate (enzimă, substraturi, produși, sare hidratată) sunt insolubile în solvent. Probabil că reacția are loc în stratul de apă care înconjoară molecula enzimatică [2.42].

### 2.2.2. Efectul solventului organic asupra biocatalizei

Natura solventului organic afectează reacțiile enzimatică în mai multe moduri, prin interacție cu enzima și apa asociată de aceasta, cu substraturile și produșii.



### 2.2.2.1. Efectul solventului asupra enzimei

**Integritatea structurală în solvenți organici.** Își menține o proteină conformația sa nativă când este transferată din tampon apos în mediu neapos? Ne-am aștepta ca ea să-și piardă activitatea. Această idee preconcepută a inhibat dezvoltarea enzimologiei neapoase pentru mulți ani. Ipoteza curentă este aceea că atunci când o enzimă preparată adecvat este plasată într-un solvent organic anhidru, ea este cinetic (dar nu și termodinamic), blocată în conformația sa nativă [2.27]. Integritatea structurală a proteinelor în medii neapoase a fost susținută de experimente ce includ  $^{15}\text{N}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN în stare solidă [2.43] și cristalografie de raze X [2.44].

Într-un studiu  $^{13}\text{C}$ -RMN al integrității situsului activ a  $\alpha$ -chimotripsinei în solvenți organici, Burke și colab [2.45] au dovedit că situsul activ este similar atât în pudră liofilizată cât și în solvenți organici. Prin studii de  $^{15}\text{N}$ -RMN, Burke și colab. au arătat de asemenea că structura tautomeră și legăturile de hidrogen ale triadei catalitice din centrul activ al proteazei  $\alpha$ -litice sunt identice în acetonă, octan și apă. Deoarece triada catalitică implică resturi de aminoacizi distanțate unele de altele în lanțul polipeptidic, integritatea sa sugerează că nu există o distorsionare semnificativă a structurii native a proteinei, atunci când enzima este plasată în solvenții anhidri [2.43]. În plus, structura tridimensională a subtilizinei Carlsberg în acetonitril, determinată prin cristalografie de raze X, este identică cu cea în apă [2.44].

Studii cristalografice ale  $\gamma$ -chimotripsinei dizolvate sau suspendate în soluții apoase și neapoase au relevat că conformația ei globală este neschimbată la înlocuirea apei cu hexan, deși la plasarea enzimei în mediu organic au loc modificări ale poziției catenelor laterale, care pot fi responsabile de alterarea specificității de substrat [2.46].

Rigiditatea structurală a enzimei în solvenți organici a fost indirect demonstrată și prin teste de activitate enzimatică. De exemplu, activitatea  $\alpha$ -chimotripsinei în octan este dependentă de pH-ul soluției apoase din care enzima a fost liofilizată. Explicația este aceea că grupările ionogene ale enzimei se găsesc în starea de ionizare corespunzătoare pH-ului soluției apoase și această stare este apoi reținută în timpul liofilizării și al dispersării în solventul organic, datorită rigidității ei conformaționale [2.27].

**Influența solventului asupra conformației proteinei.** Solventul poate modifica conformația nativă a proteinei rupând legăturile de hidrogen și distrugând interacțiunile hidrofobe, ducând astfel la o activitate și stabilitate redusă. Aceasta este o problemă majoră a enzimelor solubile în sisteme bifazice și sisteme apoase cu concentrații scăzute de solvenți miscibili în apă [2.47]. Insolubilitatea enzimelor în solvenți organici monofazici pare să preîntâmpine enzima să sufere o inactivare puternică în prezența solventului. Incapacitatea enzimelor de a se dizolva în solvenți organici păstrează enzima blocată în propria sa orientare pentru activitatea catalitică [2.48].

**Influența solventului asupra dinamicii proteinelor.** Prin spectroscopie RPE și simulări de dinamică moleculară în diverși solvenți organici s-a arătat că mișcarea în regiunea situsului activ al  $\alpha$ -chimotripsinei a scăzut o dată cu descreșterea constantei dielectrice a solventului [2.49].

În schimb, prin RMN de stare solidă, Burke și colab. au arătat că nu se poate face o corelare clară între mobilitatea inelului tirozinic din proteaza  $\alpha$ -litică și activitatea enzimatică sau constanta dielectrică. Activitățile specifice ale proteazei  $\alpha$ -litice au fost aproape aceleași în terț-butilmetileter și dioxan, deși enzima a prezentat nivele dinamice

diferite, în timp ce în dioxan și acetonitril, unde enzima a prezentat mobilități similare ale inelului tirozinic, activitățile enzimatică erau complet diferite [2.50].

**Influența solventului asupra centrului activ.** Solventul poate afecta activitatea enzimatică și prin distrugerea unor centri activi. Prin titrarea în mediu neapós a situsului activ, Zaks și Klivanov au arătat că concentrația situsului activ din  $\alpha$ -chimotripsină în apă nu este afectată prin adăugarea a trei solvenți polari aprotici: până la 32% dioxan, 14% acetonă și 13% acetonitril, dar numai două treimi din numărul total de molecule de  $\alpha$ -chimotripsină sunt active catalitic în octan uscat [2.27]. Studii ulterioare au arătat că această pierdere de situs activ nu este cauzată numai de octan ci și de liofilizarea enzimei. Distrugerea centrului activ indusă de solvent poate fi rezultatul unei combinații între dehidratarea și/sau denaturarea enzimei. Deși activitatea enzimatică mai mică în mediu organic comparativ cu cea din apă poate fi explicabilă în parte prin distrugerea centrilor activi, nu este încă clar dacă pierderea de activitate se datorează denaturării sau reducerii de dinamică moleculară [2.50].

O altă cale de interacțiune între solvent și enzimă este competiția cu substratul pentru legarea la situsul activ. Acest efect poate fi mai semnificativ în cazul solvenților mai puțin polari. În plus, moleculele de solvent pot penetra în situsul activ al enzimei și pot determina descreșterea polarității locale a situsului activ, crescând astfel repulsia electrostatică între enzimă și substrat, și descreșcând legarea. Acestă inhibiție competitivă poate fi cauza creșterii majore a valorilor  $K_m$  pentru substraturi cu enzime în solvenți organici ca dioxanul și acetonitrilul [2.51].

### 2.2.2.2. Efectul solventului asupra apei asociate de enzimă

Solventul organic poate interacționa direct cu apa esențială din vecinătatea enzimei. Chiar dacă această interacțiune poate să nu afecteze în mod direct enzima, ea are consecințe majore pentru cataliză. Solvenții puternic polari sunt capabili să solubilizeze mari cantități de apă și au tendința de a îndepărta straturile de apă esențială de la enzimă, cauzând inactivarea. În schimb, solvenții hidrofobi sunt mai puțin capabili să îndepărteze apa asociată, fiind puțin probabil ca ei să determine inactivarea.

Chiar dacă acest tip de efect al solventului pare a fi adevărat pentru majoritatea enzimelor, există unele excepții de reamărcat. Este surprinzătoare astfel capacitatea subtilizinei de a rămăne catalitic activă în dimetilformamidă anhidră (singura apă prezentă este cea din enzima însăși), ceea ce sugerează că enzima este capabilă să rețină apa sa legată chiar în prezența unui solvent miscibil cu apa [2.52].

Solvenții relativ hidrofobi sunt capabili să stripeze chiar și apa esențială de pe suprafața enzimei, lăsând o moleculă insuficient hidratată, cu o activitate enzimatică redusă. Striparea apei de către solvent de pe chimotripsină sau subtilizină a fost corelată cu polaritatea acestuia ( $1/\epsilon$ ) și, într-o mai mică măsură, cu hidrofobicitatea sa ( $\log P$ ). De exemplu, metanolul desoarbe ~60% din apa legată de enzime, în timp ce hexanul desoarbe numai 0,55% [2.53]. Luând toate acestea în considerare, nu este surprinzător că s-a găsit o corelare liniară bună între conținutul optim de apă (pentru activitate optimă) și  $\log P$  al solventului, în cazul esterificărilor catalizate de papaină. Conținutul optim de apă varia de la 4% în acetonitril la 0,05% în tetracloremetan [2.54].

### 2.2.2.3. Efectul solventului asupra substraturilor și produșilor

Solvenții pot interacționa direct sau indirect cu substraturile și produșii. Ei afectează activitatea enzimatică deoarece pot modifica concentrațiile substraturilor

și/sau produșilor în stratul apos din jurul enzimei, substraturile trebuind să penetreze în acest strat apos iar produșii trebuind să-l părăsească, pentru ca reacția să continue.

### 2.3. Mecanismul de acțiune al enzimelor în mediu neapos

Știm deci că enzimele sunt intacte structural în mediu organic. Se pune în continuare următoarea întrebare: va determina solventul o modificare în mecanismul unei reacții biocatalitice date?

Impactul cineticii enzimatică neapoase a devenit evident când s-a descoperit că lipazele și serin-proteinazele ar putea cataliza reacții de transesterificare în absența apei. În soluție apoasă aceste enzime catalizează hidroliza esterilor prin mecanism acil-enzimă, similar cu scindarea legăturilor amidice (cap. 2.1.2). Este foarte important de știut dacă mecanismul acil-enzimă apare și în reacțiile de transesterificare între un ester și un alcool, catalizate de serin-proteaze în solvenți organici.

Klibanov și colab. au analizat mecanismul transesterificarilor catalizate de subtilizină și  $\alpha$ -chimotripsină [2.27] în diverși solvenți. Comportarea cinetică observată indică faptul că toate enzimele testate urmează cinetica clasică Michaelis-Menten.

Mecanismul similar al serin-proteazelor în mediu apos și neapos a fost susținut și prin analiza Hammett a scindării acetatilor de fenil para-substituiți, catalizată de subtilizina Carlsberg. Când constanta de specificitate ( $k_{cat}/K_m$ ) a fost reprezentată grafic în funcție de constanta substituent ( $\sigma^{-1}$ ) a substratului, s-au obținut corelări liniare pentru șase solvenți, inclusiv apa, care diferă foarte mult prin hidrofobicitate și polaritate. Constantele de reacție ( $\rho$ ) determinate din corelări liniare sunt independente de natura solventului. Valoarea  $\rho$ , care reflectă distribuția de sarcini în starea de tranziție, este foarte sensibilă la mecanismul enzimatic și de aceea datele sugerează că structura stării de tranziție formate prin acilarea subtilizinei cu acetatii de fenil, este aceeași, indiferent de solvent [2.55].

Starea de tranziție pentru etapa de dezacilare a fost comparată în diferiți solvenți prin investigarea efectelor izotopice cinetice într-o reacție de transesterificare model între butiratul de vinil și 1-butanol (BuOH sau BuOD) catalizată de subtilizină sau lipază. Același efect izotopic cinetic al deuteriului a fost observat pentru ambele enzime. Raporturile  $^H V/^D V$  și  $^H K_m^{alcohol}/^D K_m^{alcohol}$  sunt asemănătoare în solvenți diferiți și egale cu  $^H k_3/^D k_3$  ( $k_3$  este constanta de viteză a etapei de dezacilare), indicând că structura stării de tranziție pentru dezacilare este independentă de natura mediului de reacție [2.56].

Chatterjee și Russell au demonstrat existența unui intermediar stabil acil-enzimă, într-o serie de studii cinetice de stare staționară, în reacția de transesterificare catalizată de subtilizină. În hexan, acetonitril și dioxan s-a observat o reacție parțială între enzimă și butirat de p-nitrofenil, în absența unui alcool, ceea ce susține mecanismul acil-enzimă de tip ping-pong (figura 2.4) [2.57].

Dependența liniară a  $1/k_{cat}$  și a  $1/K_m$  de  $1/[S_2]$  și independența a  $k_{cat}/K_m$  de  $[S_2]$  au fost confirmate experimental, așa cum era de așteptat conform mecanismului acil-enzimă. Mai mult, la 43°C, când dezacilarea este etapa determinantă de viteză, reacția de transesterificare între Ac-Phe-OMe sau Ac-Phe-OEt și un amestec de propanol/butanol are ca rezultat același raport de ester propilic și butilic și transesterificarea esterilor metilici și etilici ai fenilalaninei cu propanol duce la formarea esterului propilic cu aceeași viteză, ceea ce denotă că dezacilarea are loc pornind de la același intermediar acil-enzimă. Toate aceste date experimentale confirmă menținerea mecanismului acil-enzimă în medii organice.

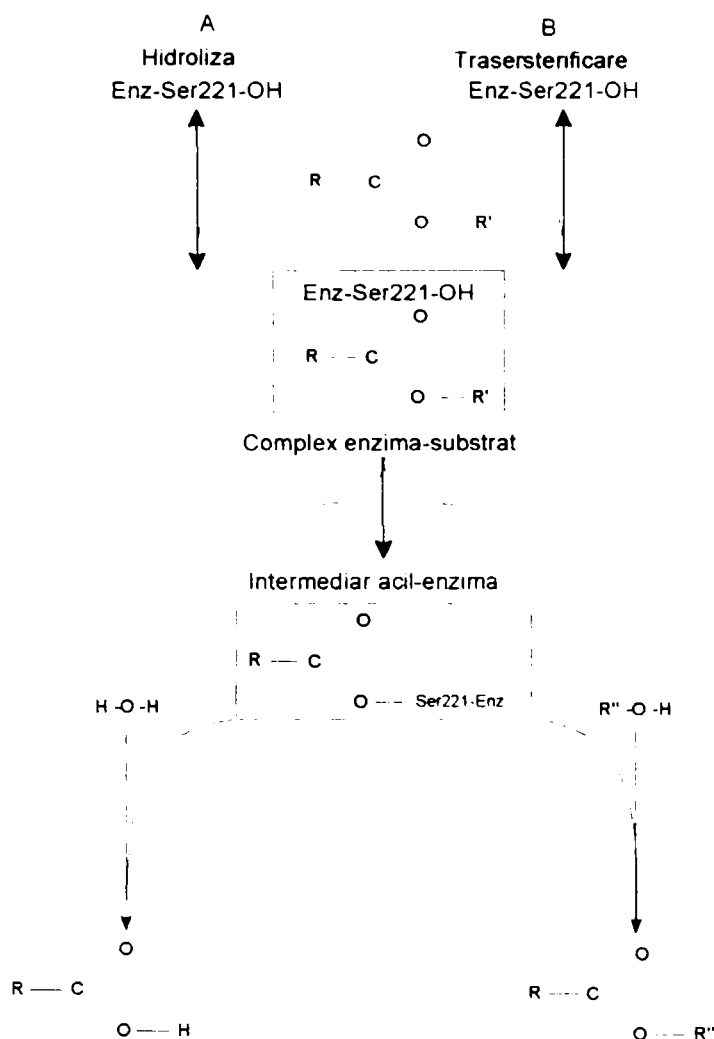


Figura 2.4. Mecanismul acil-enzimă pentru hidroliza și transesterificarea catalizată de subtilizină.

## 2.4. Cinetica și termodinamica proceselor enzimatică în mediu neapós

### 2.4.1. Modele

Deoarece activitatea enzimatică în diferiți solvenți organici variază semnificativ (de exemplu viteza de transesterificare catalizată de chimotripsină crește de 43.000 ori la înlocuirea dimetilformamidei cu hexadecan [2.27]), există probabil corelări cantitative între proprietățile solventului și activitatea enzimatică. Studiul unor astfel de corelări a provocat dezbateri active în literatura de specialitate.

Au fost concepute o serie de modele care corelează caracteristicile fizico-chimice ale solventilor cu activitatea enzimatică. Un prim model, introdus de Brink și Tramber pentru epoxidarea propenei, utilizează parametrul de solubilitate Hildebrand [2.58].

Cel mai popular descriptor de solvent introdus de Laane și colab. este  $\log P$  [2.59]. Ei au găsit o relație cantitativă între hidrofobicitatea solventului și activitatea biocatalitică și au arătat că solventii optimi pentru activitate sunt cei care au valori ridicate ale  $\log P$ . Ei au constatat menținerea activității biocatalitice în reacția de epoxidare a propenei în solventi cu valori ale  $\log P > 4$  (decanol, hexadecan, diftalat, esteri, etc.). Solvenți cu  $\log P < 2$  (alcooli cu catenă scurtă, solventi miscibili cu apa, esteri și eteri cu catenă scurtă, etc.) erau nepotriviți pentru biocataliză. Aceste date sunt în acord cu capacitatea solventilor hidrofilii de a îndepărta apa esențială pentru cataliză din enzimă. Totuși, modelul nu poate explica de exemplu activitatea surprinzător de mare a lipazei



pancreatice porcine în piridină, a subtilizinei în dimetilformamidă sau activitatea ridicată a peroxidazei din hrean în solvenți hidrofilii nemiscibili cu apa.

Această lipsă a modelului fost corectată într-o oarecare măsură prin includerea unui termen în expresia lui  $\log P$  pentru puterea de solubilizare a apei de către solvent. Pentru solvenții saturați cu apă, această expresie e dată de ecuația:

$$\text{Log}P_{\text{corr}} = (1-x) \log P_{\text{solvent}} + x \log P_{\text{apă}}$$

unde  $x$  este solubilitatea apei în fracții molare. Modelul acesta corectat explică activitatea în solvenți ca acetatul de etil și dietileterul, dar nu în solvenții miscibili în apă.

Activitatea enzimatică a fost legată și de alți parametri de solvent. Deoarece o abordare uniparametrică nu poate reflecta complexitatea interacțiunilor enzimă-solvent, este necesară introducerea unor parametri multidimensionali. Pentru a explica denaturarea reversibilă a unor proteine prin striparea apei indusă de solvent, Khmelnsky și colab. au realizat un model termodinamic care leagă pragul de concentrație al solventului organic (concentrația la care o enzimă în apă începe să se dezactiveze) cu hidrofobicitatea, capacitatea de solvatare și geometria moleculară a solventului. Pe baza acestui model ei au propus un parametru cantitativ, capacitatea de denaturare, ca o măsură a puterii denaturante a solventului [2.60].

Deși s-au realizat numeroase studii, nu este încă clar care dintre caracteristicile solventului organic sunt importante pentru activitatea enzimatică. Imiscibilitatea și nepolaritatea solventului nu sunt proprietăți în mod necesar utile și suficiente în prezicerea eficacității catalitice a enzimelor. Pe lângă proprietățile fizico-chimice ale solventului, și geometria (chiralitatea) acestuia poate influența activitatea enzimatică în mediu organic [2.61].

#### 2.4.2. Constante cinetice aparente și constante de viteză individuale

Efectele apei și a solventului asupra activității enzimatică sunt descrise cel mai adesea prin modificările  $K_m$  și  $V$  pentru perechea enzimă-substrat.

De exemplu, în reacția de esterificare în solvenți organici catalizată de  $\alpha$ -chimotripsină,  $V$  a crescut semnificativ, dar  $K_m$  a scăzut lent, la o creștere a  $\log P$  [2.62]. S-a observat o scădere a lui  $K_m$  pentru subtilizina BPN' în tetrahidrofuran, la adăugare de 5  $\mu\text{l/ml}$  apă [2.63].

Un studiu cinetic al tripsinei a arătat că creșterea conținutului de solvent miscibil cu apa (9:1 amestec dimetilformamidă și dimetilsulfoxid) a redus  $k_{\text{cat}}$  pentru activitatea amidazică, față de cea esterazică, în timp ce  $K_m$  a crescut mult pentru ambele reacții [2.64]. O scădere a activității amidazice, concomitent cu menținerea unei activități esterazice ridicate în prezența solvenților organici miscibili în apă a fost observată și pentru  $\alpha$ -chimotripsină, papaină și subtilizină. Ele pot fi deci utilizate ca peptid-ligaze în sinteza de peptide, peptidele rezultate nefiind supuse hidrolizei secundare [2.65].

Valorile  $K_m$  și  $k_{\text{cat}}$  ( $V$ ) de mai sus sunt de fapt constante cinetice aparente. Măsurând aceste constante cinetice și corelându-le cu natura mediului se pot obține informații despre structura și funcționarea enzimei. Dar, constantele cinetice aparente pot fi funcție nu numai de constantele de viteză individuale ale unui anumit mecanism, ci și de orice alt factor care afectează activitatea enzimatică (modificările în etapa determinantă de viteză, limitările de transfer de masă, concentrațiile de substrat). De aceea, pentru a înțelege în detaliu interacțiunile enzimă-solvent, este necesară măsurarea constantelor de viteză individuale.



Chatterjee și Russell [2.66] au determinat constantele de viteză individuale pentru reacții în solvenți aproape anhidri. Utilizând metoda nucleofilului adăugat, ei au măsurat efectul modificării solventului asupra etapelor de legare și catalitică a reacției de transesterificare catalizată de subtilizină (figura 2.5). Rezultatele lor au indicat că descreșterea globală de activitate a subtilizinei în solvenți organici se datorează în principal valorilor mari ale constantei de asociere enzimă-substrat ( $K_s$ ), care descrește la creșterea  $\log P$  a solventului. Constantele de viteză pentru acilare ( $k_2$ ) și dezacilare ( $k_3$ ) au crescut cu creșterea lui  $\log P$  și respectiv a constantei dielectrice a mediului. Variația lui  $k_3$  cu dielectricul mediului a subliniat faptul că intermediarul tetraedric implicat în etapa de dezacilare în solvenți organici era încărcat.

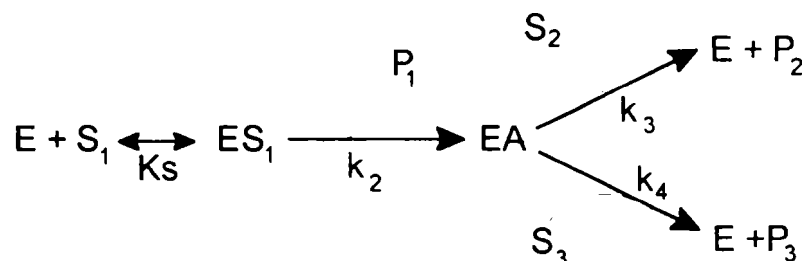


Figura 2.5. Schema cinetică și ecuațiile pentru determinarea constantelor individuale de viteză pentru reacția de transesterificare în solvenți organici, catalizată de subtilizină, prin metoda nucleofilului adăugat.

Wankigar și colab. au găsit de asemenea că etapa determinantă de viteză în mediu anhidru este acilarea, dar la adăugarea de 2% apă, subtilizina inversează etapa determinantă de viteză, aceasta devenind dezacilarea, în primul rând datorită creșterii vitezei de acilare. Etapa determinantă de viteză în hidroliza aceluiași ester în soluție apoasă este dezacilarea. Astfel, etapa determinantă de viteză poate fi modificată atât de solvent, cât și prin adăugarea de apă într-un anumit solvent [2.67].

Wankigar și colab. au legat modificarea vitezei individuale în solvenți de capacitatea acestora de a stabili starea de tranziție. Deoarece transesterificarea catalizată de subtilizină în solvenți organici urmează mecanismul acil-enzimă, implicând o stare de tranziție polară încărcată, ea trebuie să fie stabilizată de un mediu polar. Într-adevăr, starea de tranziție a subtilizinei BPN' este intrinsec mai stabilă în acetonă (mai polară) decât în hexan (nepolar) (diferența în energiile libere intrinseci de stabilizare a stării de tranziție între hexan și acetonă este de 1,75 kcal/mol). Faptul că stabilizarea stării de tranziție se corelează mai bine cu polaritatea solventului decât cu hidrofobicitatea acestuia sugerează că efectul solventului este în primul rând electrostatic, așa cum ne-am aștepta de la o stare de tranziție încărcată.

Xu și colab. au confirmat că polaritatea este un factor important în stabilizarea stării de tranziție încărcate și că viteza unei reacții enzimatice care are loc prin intermediul unei astfel de stări de tranziție poate fi mărită prin creșterea polarității situsului activ (de exemplu prin adăugare de apă) [2.63].

Este important să distingem între efectele solventului asupra funcționării enzimei atât în termeni cinetici cât și termodinamici. Un solvent poate afecta activitatea și specificitatea enzimei modificând partiția substraturilor și produșilor între faza organică și faza micro-apoasă de la situsul activ. Acest efect de partiție poate fi utilizat pentru a explica creșterea generală în valorile aparente ale  $K_m$  dacă enzima este plasată într-un solvent organic, și nu în mediu apos. Dordick [2.68] a arătat că eficiența catalitică depinde de caracteristicile fizico-chimice ale substratului (hidrofobicitate și proprietăți electrice) și solventului (polaritate și hidrofobicitate). Ele determină partiția substratului

între mediul de reacție și situsul activ al enzimei. Partiția este redusă prin creșterea hidrofobicității substratului și solventului. Acest lucru implică o mai mare concentrație a substratului pentru a satura enzima, ceea ce duce la o creștere a  $K_m$  aparent în mediu organic, față de cel apos.

Pe baza efectului de solvatare a substratului, Halling [2.40] a sugerat că este necesar să se distingă două tipuri de constante Michaelis: un  $K_m$  real ( $K_{ma}$ , pe baza concentrațiilor măsurate în faza apoasă), care reflectă efectul intrinsec al solventului asupra catalizei enzimatică și un  $K_m$  aparent ( $K_{mo}$ , pe baza concentrațiilor în faza organică). Pentru transesterificarea catalizată de subtilizină între esterul p-nitrofenilic de N-CBZ-L-alanină (sau leucină) și 1-butanol, valorile  $K_m$  aparente pentru ester au crescut cu creșterea solubilității substratului în solvent, dar valorile corectate ale lui  $K_m$  ( $K_m/S_s$ ) au indicat o tendință diametral opusă [2.69].

### 2.4.3. Efectul mediului organic asupra poziției de echilibru

Se cunoaște că un mediu cu conținut redus de apă este favorabil pentru deplasarea echilibrului hidrolitic în direcția sintezei. O concentrație redusă de apă și partiția între substraturi și produși sunt factorii de care depinde gradul de deplasare al echilibrului [2.40].

Efectul solventului asupra echilibrului a fost mai puțin studiat. Halling [2.70] a studiat acest efect asupra poziției de echilibru a reacțiilor organice și arătat că reacțiile de esterificare sunt de  $>10^4$  ori mai favorabile în solvenți nepolari (ex. hexan) decât în solvenți polari (ex. eter etilic). Constantele de echilibru se corelează bine cu solubilitatea apei în solvent. Această regulă pare să se aplice și pentru alte reacții de echilibru.

## 2.5. Noi proprietăți ale enzimelor în mediu organic

Se acceptă în general că, atunci când enzimele sunt plasate în mediul organic, ele manifestă proprietăți schimbate, cum ar fi :

- specificitate de substrat, stereo-, regeo- și chemostabilitate modificată,
- memorie moleculară,
- capacitate de a cataliza reacții cinetic sau termodinamic imposibile în soluții apoase,
- termostabilitate crescută.

### 2.5.1. Specificitatea de substrat a enzimelor în mediu neapos

Rigiditatea enzimelor în solvenți organici are drept consecință modificarea specificității de substrat. Este bine cunoscut faptul că legarea enzimei de substrat este forța motrice a catalizei enzimatică. Deoarece această legătură este determinată de diferența între energia complexului enzimă-substrat și energia enzimei și a substratului în soluție, legătura este întotdeauna influențată de solvent.

Zaks și Klibanov [2.31] au arătat că specificitatea de substrat a  $\alpha$ -chimotripsinei, subtilizinei și esterazei s-a schimbat radical prin înlocuirea mediului apos cu un solvent organic. Astfel, specificitatea de substrat a chimotripsinei în octan s-a inversat față de cea din apă. Deoarece interacțiunile hidrofobe contribuie în mod semnificativ la legarea de substrat a  $\alpha$ -chimotripsinei în apă, s-a sugerat că inversarea specificității de substrat în solvenți organici s-ar datora lipsei interacțiunilor hidrofobe în mediile neapoase.

Rezultate similare calitativ au fost obținute cu  $\alpha$ -chimotripsină modificată cu PEG, tripsină și subtilizină în benzen. În timp ce pentru chimotripsină în apă  $k_{cat}/K_m$  a variat

între aminoacizii aromatici și cei bazici cu mai mult de trei ordine de mărime, în benzen, valorile  $k_{cat}/K_m$  erau similare. Mai mult, N-Bz-L-Lys-OMe, hidrolizată în apă cu o viteză de 1/15 din cea a N-Bz-L-Tyr-OEt, a devenit un substrat de trei ori mai reactiv în benzen. Autorii au arătat că specificitatea  $\alpha$ -chimotripsinei față de inhibitorii specifici ai situsului activ în solvenți organici era de asemenea inversată. Fluorura de fenilmetilsulfonil, care reacționează cu serina din situsul activ și inactivează rapid enzima în apă, are un efect slab asupra chimotripsinei în benzen [2.71].

Clapés și Adlecreutz [2.72] au studiat esterificarea aminoacizilor N-acetilați catalizată de  $\alpha$ -chimotripsină în medii organice. Au găsit că în timp ce specificitatea enzimei pentru catena laterală a aminoacidului în acetat de etil și acetonitril era aproximativ aceeași ca și în apă, specificitatea față de grupările N-protejate era inversă. Au observat o viteză mult mai mare la derivații N-acetil față de cei N-benziloxycarbonil. Autorii au sugerat că interacțiunile hidrofobe mai importante erau responsabile pentru viteza mai mare de hidroliză în apă a substraturilor cu grupări protectoare nepolare mari. În solvenții organici, unde interacțiunile hidrofobe nu joacă nici un rol, substraturile mai puțin blocate steric, cu grupări N-protejate mai mici, precum acetil, devin mult mai favorabile. Această explicație era de asemenea în acord cu faptul că în solvenții organici  $\log(k_{cat}/K_m)$  se corela mai bine cu refractivitatea molară a catenei laterale a aminoacidului (o măsură a masei substituentului) decât cu hidrofobicitatea sa.

Lipsa interacțiunilor hidrofobe în medii organice a fost responsabilă pentru modificarea specificității proteazelor față de nucleofili. Autorii au demonstrat că reactivitatea grupării amino neprotejate a amidelor aminoacizilor într-o reacție de transfer de acil în apă era în principal determinată de partiția nucleofilului din mediu la subsitusul de legare a enzimei și se corela bine cu hidrofobicitatea nucleofilului. Deloc surprinzător, specificitatea  $\alpha$ -chimotripsinei față de amidele aminoacizilor în solvenți organici nu depindea de hidrofobicitatea lor, dar se corela cu volumul Van der Waals normalizat al aminoacidului, care este determinat de mărimea catenei laterale [2.73].

Un model termodinamic care prezice specificitatea de substrat a subtilizinei Carlsberg în medii neapoase pe baza specificității enzimei în apă și a caracteristicilor fizico-chimice ale solventului, a fost conceput de Wescott și Klibanov [2.74]. Autorii au determinat  $k_{cat}/K_m$  pentru transesterificarea N-acetil-L-fenilalaninei și N-acetil-L-serinei cu propanol în 20 de solvenți anhidri și au găsit că  $(k_{cat}/K_m)_{Ser}/(k_{cat}/K_m)_{Phe}$  varia de 68 de ori. Ei au dedus o relație:

$$\log [(k_{cat}/K_m)_{Ser}/(k_{cat}/K_m)_{Phe}]_{solvent} = \log(P_{Phe}/P_{Ser}) + \log [(k_{cat}/K_m)_{Ser}/(k_{cat}/K_m)_{Phe}]_{apă}$$

care permite corelarea raportului parametrilor de specificitate a două substraturi în orice solvent organic cu cel din apă, cu condiția ca să fie cunoscuți coeficienții de partiție pentru substraturi. Deoarece modelul termodinamic elaborat este independent de enzimă, ar trebui să fie aplicabil oricărui cuplu enzimă-substrat. Pe baza rezultatelor experimentale obținute ei au concluzionat că schimbarea specificității de substrat a enzimelor în solvenți organici se datorează într-o mare măsură energiei de dizolvare a substratului.

Klibanov și colab. [2.36, 2.75] au utilizat și o altă metodă de modificare a specificității de substrat a enzimelor într-un solvent dat. Liofilizarea chimotripsinei și subtilizinei din soluții apoase ce conțin inhibitori competitivi a dus atât la creșterea activității enzimatice de până la 100 de ori, ci și la schimbarea specificității de substrat. Astfel, valorile  $k_{cat}/K_m$  ale subtilizinei liofilizate din tampon fosfat 10 mM, pH 7,8 în octanol la transesterificarea N-Ac-L-Phe-OMe și N-Ac-L-Ala-OMe cu propanol erau

similare. Totuși, enzima recuperată din soluția conținând un inhibitor competitiv, N-Ac-L-Tyr-NH<sub>2</sub>, a reacționat de 10 ori mai eficient cu ultimul substrat decât cu primul. S-a presupus că atunci când un ligand se leagă la o enzimă în mediu apos, induce schimbări conformaționale (analoage cu reglarea prin receptori alosterici) care rămân nemodificate în timpul liofilizării și ulterior, în solvent, după ce ligandul este îndepărtat prin spălare. Într-un studiu ulterior s-a găsit că liganzii nu numai că induc schimbări ale specificității de substrat a enzimelor, dar și protejează enzimele împotriva denaturării reversibile în timpul liofilizării [2.76].

### 2.5.2. Stereoselectivitatea enzimelor în mediu neapos

Enantioselectivitatea, probabil cea mai atractivă caracteristică a sintezei enzimatică, se datorează abilității unice a enzimelor de a discrimina între enantiomerii unei perechi racemice. Ea se bazează pe diferența de energie liberă  $\Delta\Delta G^\ddagger$  a stărilor de tranziție diastereoizomere ale celor doi enantiomeri. Raportul produșilor enantiomeri este egal cu raportul constantelor de viteză de ordinul doi corespunzătoare. Pentru a realiza o reacție enantioselectivă cu un exces enantiomeric ee de 99,9% este nevoie de  $\Delta\Delta G^\ddagger = 4,5$  kcal/mol. Pentru a atinge un produs cu ee de 90%,  $\Delta\Delta G^\ddagger = 1,74$  kcal/mol. Această valoare a energiei libere corespunde la una sau două legături de hidrogen iar condițiile de reacție pot fi modificate adesea suficient pentru a mări enantioselectivitatea unei anumite reacții.

Există puține metode despre care se știe că afectează enantioselectivitatea reacțiilor enzimatică:

- mutageneza direcționată,
- inhibitorii enantioselectivi,
- analogii coenzimelor,
- sărurile biliare,
- substraturile cu substituenți sau grupări protectoare cu efect asupra enantioselectivității,
- temperatura,
- cosolvenții miscibili cu apa.

Principalul mijloc de modificare a enantioselectivității rămâne modificarea condițiilor de reacție, și anume mărirea cantității de solvent organic, ajustarea pH-ului și uneori chiar a temperaturii de reacție. Folosirea solvenților neapoși este, probabil, cel mai flexibil instrument de schimbare a stereoselectivității enzimelor.

O serie de studii [2.77-2.80] au indicat că enantiospecificitatea reacțiilor de hidroliză a L- și D-esterilor catalizate de subtilizină și chimotripsină în soluții apoase este mai mare pentru substraturile hidrofobe decât pentru cele hidrofile. În solvenți organici, enantiospecificitatea se reduce semnificativ, iar substraturile hidrofile devin mai reactive decât cele hidrofobe, cauza fiind diferența de partiție a substratului între situsul activ și mediu; această modificare se reflectă în valorile lui  $K_m$ . Drept explicație, s-a considerat că la legarea L-esterului la situsul activ al subtilizinei, din situsul de legare hidrofob al enzimei s-a eliminat un număr mai mare de molecule de apă decât la legarea D-esterului. Dar, această eliminare este mai puțin favorabilă în mediu hidrofob decât în apă. Astfel, reactivitatea L-esterului în mediu hidrofob scade mult, iar discriminarea între esterii D și L se reduce. În literatură există numeroase studii privind influența solvenților organici asupra selectivității enzimelor, însă relațiile dintre proprietățile solventului și selectivitate nu pot fi de obicei generalizate.



Sunt cunoscute și cazuri de inversie a enantioselectivității de către solvenții organici [2.79, 2.80]. Nu se cunoaște exact dacă această inversie este cauzată direct de solvent sau de modificarea structurii enzimei în prezența solventului.

Margolin și colaboratorii [2.81] au determinat că enantiospecificitatea subtilizinei în solvenți organici era diferită față de cea în apă, ceea ce a permis autorilor să elaboreze o tehnică de încorporare facilă a D-aminoacizilor în peptide în condiții neapoase. Enantiospecificitatea subtilizinelor Carlsberg și BPN', elastazei, proteazei  $\alpha$ -litice,  $\alpha$ -chimotripsinei și tripsinei este mai mică în medii neapoase decât în apă [2.77].

Dewar și Storch [2.82] au observat la transesterificarea esterului cloretilic al N-acetilalaninei cu propanol o corelare inversă între enantiospecificitatea subtilizinei și hidrofobicitatea solventului. Astfel, enantiospecificitatea enzimei era mai scăzută în solvenți cu hidrofobicitate mai mare. Autorii au explicat că legarea substratului la subtilizină este însoțită de eliberarea de molecule de apă din enzimă. Legarea productivă a D-aminoacidului nu implică o încorporare a catenei laterale a aminoacidului în situsul de legare hidrofob al enzimei, și de aceea e însoțită de eliberarea a mai puține molecule de apă, comparativ cu legarea izomerului L. Autorii au concluzionat că din moment ce eliberarea moleculelor de apă într-un solvent hidrofob e termodinamic nefavorabilă, reactivitatea L-enantiomerului în acești solvenți e diminuată într-o mai mare măsură decât cea a D-enantiomerului și acest lucru explică scăderea în enantiospecificitate. Modelul a prezis de asemenea că diferența între enantiospecificitatea în apă și cea în solvent organic ar trebui să fie mai mare în cazul substraturilor cu catene laterale voluminoase. Acest fapt a fost dovedit și experimental.

Sakurai și colab. [2.77] au găsit o bună corelație între hidrofobicitatea solventului și enantiospecificitate în reacția de transesterificare a N-acetil aminoacizilor catalizată de subtilizina Carsberg. Același tip de corelație pentru transesterificarea catalizată de subtilizină a butiratului de vinil cu sec-fenetolul a dat însă rezultate slabe [2.82]. În schimb, factorul de enantiospecificitate al subtilizinei  $(k_{cat}/K_m)_S/(k_{cat}/K_m)_R$  s-a corelat bine cu momentul dipol și constanta dielectrică a mediului. Această deosebire a fost atribuită legării substratului esteric și a celui alcoolic la situsuri de legare diferite, ceea ce a dus la introducerea unui nou model care să explice efectul solventului asupra selectivității substratului alcoolic. Modelul implică prezența unei cavități mari și a uneia mici în situsul de legare al subtilizinei. Autorii au sugerat că legarea enantiomerului care reacționează mai încet cu sec-fenetolul a creat o împiedicare sterică mare între gruparea fenil și situsul mic de legare al enzimei. Astfel, orice descreștere a rigidității proteinei care diminuează împiedicarea sterică ar trebui să crească reactivitatea enantiomerului care reacționează mai încet într-o măsură mai mare decât a enantiomerului ce reacționează mai rapid, deoarece cel din urmă nu a suportat o împiedicare sterică în primul loc. Din moment ce rigiditatea proteinei are ca bază în principal interacțiunile electrostatice și legăturile de hidrogen intramoleculare, ea este mai mare în solvenți cu constantă dielectrică scăzută (dioxan) decât în cei cu constanta dielectrică mare (acetonitril). De aceea, enantiospecificitatea subtilizinei în dioxan este mai mare.

Modelul a fost validat prin modelare pe calculator, care a arătat că gruparea fenil a S-enantiomerului fenetolului ocupa cavitatea cea mai spațioasă, în timp ce gruparea metil era comprimată într-o cavitate mică a situsului activ. Legarea enantiomerului R se face exact invers. În conformitate cu modelul, s-a constatat o modificare semnificativă de reactivitate a R-enantiomerului, cu viteză de reacție mai mică, la trecerea din dioxan în acetonitril și o scădere a enantioselectivității la adăugarea de apă și de substanțe care imită apa, precum formamida, care sunt cunoscute că determină creșterea flexibilității proteinelor [2.83].



Tawaki și Klivanov [2.80] au demonstrat că enantiospecificitatea proteazei din *Aspergillus oryzae* poate fi inversată de către mediul de reacție. În timp ce reacția de transesterificare a esterului cloretic al N-acetil-fenilalaninei cu propanol în solvenți hidrofilii ca acetonitrilul, DMF și piridină este mai rapidă pentru enantiomerul L, în toluen, octan și tetraclormetan, toate hidrofobe, se întâmplă tocmai invers. Autorii au explicat acest fenomen pe baza existenței a două moduri alternative de legare pentru enantiomerii L și D. Într-un mod productiv, L-enantiomerul se leagă la enzimă în așa fel încât gruparea benzil e poziționată în cavitatea hidrofobă. În schimb, D-izomerul, pentru a avea o legătură scindabilă într-un aranjament adecvat, are catena laterală hidrofobă poziționată în solvent. Partiția preferențială a catenei hidrofobe în solvenți hidrofobi favorizează legarea productivă și în consecință hidroliza mai rapidă a D-enantiomerului.

Majoritatea informațiilor asupra efectului apei și al solvenților care imită apa asupra selectivității enzimelor în medii organice indică faptul că enantioselectivitatea enzimelor se mărește cu creșterea conținutului în apă al mediului, până la o anumită valoare. Deși nu a fost dată nici o explicație a acestui fenomen, se poate argumenta că din moment ce în majoritatea cazurilor creșterea enantioselectivității a fost însoțită de creșterea vitezei de reacție, adăugarea apei micșorează interacțiunile enzimă-solvent nefavorabile și restabilește conformația nativă, mult mai selectivă, a enzimei.

### 2.5.3. Termostabilitatea enzimelor în mediu neapos

Multe enzime sunt mai termostabile în solvenți organici decât în apă. Este acceptat faptul că rigiditatea structurală crescută și viteza mai scăzută de denaturare chimică sunt factorii responsabili pentru stabilitatea termică ridicată a multor proteine în solvenți organici. Totuși, expunerea prelungită a proteinelor la temperaturi crescute chiar în condiții aparent anhidre duce la inactivarea lor.

Deoarece solvenții hidrofobi sunt inerti față de interacțiunile cu proteinele, termostabilitatea proteinelor suspendate în medii hidrofobe e de obicei mai mare decât în medii hidrofile. Mai mult, în solvenți hidrofobi enzimele prezintă temperaturi de denaturare termică mărite, care cresc o dată cu scăderea conținutului de apă în proteină. De exemplu, timpul de înjumătățire al chimotripsinei la 100°C [2.27] și cel al subtilizinei la 110°C [2.36] în octan uscat au fost de 270 și respectiv 80 minute. Spre comparație,  $t_{1/2}$  al chimotripsinei în soluție apoasă la pH 8,0 la 55°C este de numai 55 min.

Stabilitatea termică a  $\alpha$ -chimotripsinei în octan depinde puternic de pH-ul soluției apoase din care proteina a fost liofilizată [2.84]. S-a arătat apoi că nu numai pH-ul ci și prezența în soluțiile apoase ale proteinelor, înainte de liofilizare, a analogilor de substrat și a sărurilor simple afectează stabilitatea lor în solvenți organici [2.38].

Mărimea efectului pH-ului asupra stabilității depinde de condițiile experimentale și variază de la proteină la proteină. Astfel,  $t_{1/2}$  al subtilizinei BPN' recuperată dintr-o soluție cu pH 7,9 în DMF la 45°C, este de 25 de ori mai mare decât cel al enzimei liofilizate din aceeași soluție la pH 6,0 [2.85]. S-a observat că inactivarea termică a subtilizinei BPN' în alcool terț-amilic anhidru diferă de inactivarea în soluție apoasă. În solvent organic subtilizina a suferit o inactivare reversibilă, iar contribuția majoră la acest proces a avut-o dehidratatrea (separarea apei esențiale din enzimă în masa de solvent). Când enzima a fost analizată în mediu apos, inactivarea nu a fost detectată, deoarece prezența apei esențiale a fost restabilă. Adăugarea de puțină apă exogenă la solventul organic ar trebui să prevină separarea apei esențiale și să stabilizeze enzima împotriva inactivării reversibile. Adăugarea de 2% apă în alcool terț-amilic a dus la o stabilizare semnificativă

a subtilizinei, în schimb cantități de apă mai mari de 4% au destabilizat-o. Substraturile esterice au mărit stabilitatea subtilizinelor Carlsberg și BPN' în solvenți organici, probabil prin formarea de acil-enzimă [2.85].

Reticularea chimică a cristalelor enzimatică determină o creștere a stabilității termice a unui mare număr de proteine. În timp ce activitatea termolizinei reticulate, după o incubare de 18 zile în acetat de etil la 55°C a rămas virtual neschimbată, termolizina liberă a fost inactivată complet după 4 zile [2.86].

Activitatea și stabilitatea enzimelor în solvenți organici și amestecuri apos organice pot fi mărite prin inginerie genetică [2.87]. Prin incorporarea aminoacizilor care pot forma legături de hidrogen interne poate crește numărul punților de sare și gradul de reticulare mărit ar trebui să determine creșterea rezistenței la solvenți. A fost obținută o subtilizină E mutantă care avea timpul de înjumătățire în DMF 40% la 50°C dublu, comparativ cu cel al enzimei inițiale.

Pentru a investiga relația între sarcina de pe suprafața unei enzime și stabilitatea în solvenți neapoși, Martinez și Arnold au substituit patru resturi încărcate de pe suprafața proteazei  $\alpha$ -litice cu diferiți aminoacizi și au observat că înlocuirea unui aminoacid încărcat cu unul hidrofob a înlăturat interacțiunile nefavorabile proteină-solvent și a dus la o stabilitate proteică mărită [2.88].

Prin mutageneză aleatoare au fost obținute enzime mai active și solvent-rezistente. Astfel, o variantă a subtilizinei E hidrolizează un substrat peptidic într-un amestec DMF/apă, de 256 de ori mai repede decât tipul sălbatic. Efectul mutagenezei asupra stabilității a fost însă mai mic, cel mai stabil mutant fiind doar de două ori mai stabil în DMF 40% la 50°C, decât enzima inițială [2.89]. Un alt mutant al subtilizinei, cu șase mutații stabilizatoare, a prezentat un timp de înjumătățire în DMF-anhidră de 50 de ori mai mare față de cel al enzimei native [2.87].

## 2.6. Concluzii

Pentru ca enzimologia neapoasă să se dezvolte în continuare trebuie rezolvate o serie de probleme fundamentale. În primul rând trebuie să avem o înțelegere detaliată a relației între structura unui biocatalizator (dinamică, conformație, structura situsului activ) și funcția sa catalitică (activitate, stabilitate, specificitate). Apoi mai trebuie încă investigat rolul apei și a solventului asupra acțiunii enzimelor în solvenți organici. De exemplu, de ce diferite enzime au dependențe în conținutul de apă al solventului diferite? Cât privește solventul, acesta are două efecte majore și anume modificarea distribuției apei esențiale la enzimă și a concentrației de substrat în vecinătatea enzimei prin solvatarea acestuia. Ambele efecte sunt importante în definirea activității unei enzime într-un solvent dat. Chiar dacă aceste efecte au fost determinate (fie prin controlarea activității apei fie prin considerarea partiției substratului), mai trebuie ținut cont de efectele particulare, intrinseci ale diferiților solvenți asupra funcționării enzimei în mediu neapos. Mai este apoi necesară o modelare matematică cantitativă a cineticii și termodinamicii reacțiilor enzimatică în mediu neapos. Aceasta pentru că este improbabil ca eficacitatea catalitică a enzimelor în mediu neapos să fie controlată de un singur mecanism. Factori precum cantitatea și localizarea apei, interacțiunile între apă, solvent și enzimă conduc împreună la o anumită activitate, specificitate și stabilitate.

În concluzie, există numeroase dovezi că proteinele suspendate în solvenți organici nu se denaturează. Ele își mențin o conformație asemănătoare celei native cu flexibilitate modificată. Înțelegând cum solventul poate afecta structura și mobilitatea proteinelor, vom ști cum să modificăm funcțiile enzimelor, prin "inginerie de solvent".

## 2.7. Bibliografie

- 2.1. D. W. S. Wong, *Food Enzymes*, Chapman&Hall, New York, 1995, p. 124-138.
- 2.2. J. D. Rawn, *Biochemistry*, Neil Patterson Publ., Burlington, 1989, p. 149-165.
- 2.3. N. C. Price, L. Stevens, *Fundamentals of Enzimology*, Oxford University Press, Oxford, 1982, p. 161-205.
- 2.4. R. H. Garrett, C. M. Grisham, *Biochemistry*, Harcourt Brace Colledge Publishers, Fort Worth, 1995, p. 436-443.
- 2.5. A. Cornish-Bowden, C. W. Wharton, *Enzyme Kinetics*, IRL Press, Oxford, 1988, p. 60-63.
- 2.6. D. V. Roberts, *Enzyme Kinetics*, Cambridge University Press, Cambridge, 1977, p.1-43.
- 2.7. P. Carter, J. A. Wells, *Nature* **332**, 564 (1988).
- 2.8. S. Scheiner, W. N. Lipscomb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 432 (1976).
- 2.9. P. A. Kollman, D. M. Hayes, *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 2955 (1981).
- 2.10. A. Warshel, S. Russell, *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 6569 (1986).
- 2.11. V. Daggett, S. Schroder, P. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 8926 (1991).
- 2.12. M. Komiyama, M. L. Bender, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 557 (1979).
- 2.13. P. Bryan, M. W. Pantoliano, S. G. Quill, H.-Y. Hsiao, T. Poulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3743 (1986).
- 2.14. F. Jordan, L. Polgar, *Biochemistry*, **20**, 6366 (1981).
- 2.15. M. L. Bender, M. Philipp, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 1665 (1973).
- 2.16. R. L. Stein, J. P. Elrod, R. L. Showen, *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 2446 (1983).
- 2.17. P. J. Tonge, P. R. Corey, *Biochemistry*, **29**, 10723 (1990).
- 2.18. P. J. Tonge, P. R. Corey, *Biochemistry*, **31**, 9122 (1992).
- 2.19. G. B. Wells, D. Mustafi, M. W. Makinen, *J. Biol. Chem.* **269**, 4577 (1994).
- 2.20. C. A. McPhalen, I. Svendsen, I. Jonassen, M. N. G. James, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7242 (1985).
- 2.21. D. A. Estell, T. P. Graycar, J. V. Miller, D. b. Powers, j. P. Burnier, P. G. Ng, J. A. Wells, *Science*, **233**, 659 (1986).
- 2.22. J. A. Wells, D. B. Powers, R. R. Bott, T. P. Graycar, D. A. Estell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1219 (1987).
- 2.23. H. Gron, m. Meldal, K. Breddman, *Biochemistry* **31**, 6011 (1992).
- 2.24. A. M. Klibanov, *Chemtech* **16**, 354 (1986).
- 2.25. D. S. Hartsough, J. K. M. Mertz, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6529 (1993).
- 2.26. W.R. Liu, R.L. Langer, A.M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 177 (1991).
- 2.27. A. Zaks, A.M. Klibanov, *J. Biol. Chem.* **263**, 8017 (1988).
- 2.28. A. Zaks, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3192 (1985).
- 2.29. S. Fukui, A. Tanaka, T. Iida în *Biocatalysis in Organic Media*, Ed. C. Laane, J. Tramper, M. D. Lilly, Elsevier, Amsterdam, 1987, p. 21-41.
- 2.30. C. Laane, J. Tramper, M. D. Lilly (Ed.), *Biocatalysis in Organic Media*, Elsevier, Amsterdam, 1987.
- 2.31. A. Zaks, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2767 (1986).
- 2.32. A. Margolin, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3802 (1987).
- 2.33. M. Therisod, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 5638 (1986).
- 2.34. R. Affleck, C. A. Heynes, D. S. Clark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5167 (1992).
- 2.35. R. Affleck, Z.-F Xu, V. Suzawa, K. Focht, D. S. Clark, J. S. Dordick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1100 (1992).

- 2.36. A. J. Russell, A. M. Klivanov, *J. Biol. Chem.* **263**, 11624 (1988).
- 2.37. P. J. Halling, *Biotechnol. Techniques* **6**, 271 (1992).
- 2.38. P. Kuhl, P. J. Halling, *Biochim. Biophys. Acta* **1078**, 326 (1991).
- 2.39. Z. Yang, D. Zacherl, A. J. Russell, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12251 (1993).
- 2.40. P. J. Halling, *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 178 (1994).
- 2.41. L. Kittingen, B. Sjursnes, T. Anthonsen, P. J. Halling, *Tetrahedron* **48**, 2793 (1992).
- 2.42. P. Kuhl, P. J. Halling, H.-D. Jakubke, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 5213 (1992).
- 2.43. P. A. Burke, S. O. Smith, W. W. Bachovchin, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 8290 (1989).
- 2.44. P. A. Fitzpatrick, A. C. U. Steinmetz, D. Ringe, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8653 (1993).
- 2.45. P. A. Burke, R. G. Griffin, A. M. Klivanov, *J. Biol. Chem.* **267**, 20057 (1992).
- 2.46. H. P. Yennawar, N. H. Yennawar, G. K. Farber, *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 577 (1995).
- 2.47. A. C. Williams, J. M. Woodley, P. A. Ellis, M. D. Lilly în *Biocatalysis in Organic Media*, Ed. C. Laane, J. Tramper, M. D. Lilly, Elsevier, Amsterdam, 1987, p. 399-404.
- 2.48. R. Z. Kazandjian, J. S. Dordick, A. M. Klivanov, *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 417 (1986).
- 2.49. R. Affleck, Z.-F. Xu, V. Suzawa, K. Focht, D. S. Clark, J. S. Dordick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1100 (1992).
- 2.50. P. A. Burke, R. G. Griffin, A. M. Klivanov, *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 87 (1993).
- 2.51. V. Kasche, G. Michaelis, B. Galunsky, *Biotechnol. Lett.* **13**, 75 (1991).
- 2.52. S. Riva, J. Chopineau, A. P. G. Kieboom, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 584 (1988).
- 2.53. L. A. S. Gorman, J. S. Dordick, *Biotechnol. Bioeng.* **39**, 392 (1992).
- 2.54. D. E. Stevenson, A. C. Storer, *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 519 (1991).
- 2.55. L. T. Kanerva, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 6864 (1989).
- 2.56. K. A. H. Adams, S.-H. Chung, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9418 (1990).
- 2.57. S. Chatterjee, A. J. Russell, *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 1022 (1993).
- 2.58. L. E. S. Brink, J. Tramper, *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 1258 (1985).
- 2.59. C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger, *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 81 (1987).
- 2.60. Y. L. Khmel'nitsky, V. V. Mozhaev, A. B. Belova, M. V. Sergeeva, K. Martinek, *Eur. J. Biochem.* **198**, 31 (1991).
- 2.61. G. Ottolina, F. Gianinetti, S. Riva, G. Carrea, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 535 (1994).
- 2.62. M. Reslow, P. Adlerkreutz, B. Mattiasson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1 (1987).
- 2.63. Z.-F. Xu, R. Affleck, P. Wangikar, V. Suzawa, J. S. Dordick, D. S. Clark, *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 515 (1994).
- 2.64. R. M. Guinn, H. W. Blanch, D. S. Clark, *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 320 (1991).
- 2.65. C. F. Barbas, I. J. R. Matos, J. B. West, C.-H. Vong, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5162 (1988).
- 2.66. S. Chatterjee, A. J. Russell, *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 1069 (1992).
- 2.67. P. P. Wangikar, T. P. Graycar, D. A. Estell, D. S. Clark, J. S. Dordick, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 12231 (1993).



- 2.68. K. Ryu, J. S. Dordick, *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 8026 (1989).
- 2.69. A. Reinmann, D. A. Robb, P. J. Halling, *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 1081 (1994).
- 2.70. P. J. Halling, *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 691 (1990).
- 2.71. H. Gaertner, A. Puigserver, *Eur. J. Biochem.* **181**, 207 (1989).
- 2.72. P. Clapés, P. Adlercreutz, *Biochim. Biophys. Acta*, **1118**, 70 (1991).
- 2.73. M. Y. Golobov, T. L. Voyushina, V. M. Stepanov, P. Adlercreutz, *FEBS Lett.* **307** (3), 309 (1992).
- 2.74. C. R. Wescott, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 1629 (1993).
- 2.75. A. Zaks, A. M. Klibanov, *J. Biol. Chem.* **263**, 3194 (1988).
- 2.76. K. Dabulis, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **41**, 566 (1993).
- 2.77. T. Sakurai, A.L. Margolin, A. J. Russel, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7236 (1988).
- 2.78. F. Terradas, M. Teston-Henry, P.A. Fitzpatrick, A.M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 390 (1993).
- 2.79. S.-h Wu, K.-T. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1**, 399 (1991).
- 2.80. S. Tawaki, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 1882 (1992).
- 2.81. A. L. Margolin, D.-F. Tai, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 7885 (1987).
- 2.82. M. J. S. Dewar, D. M. Storch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 2225 (1985).
- 2.83. P. A. Fitzpatrick, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 3166 (1991).
- 2.84. A. Zaks, A.M. Klibanov, *Science*, **224**, 1249 (1984).
- 2.85. B. Schulze, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 1001 (1991).
- 2.86. N. L. St. Clair, M. A. Navia, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 7314 (1992).
- 2.87. C.-H. Wong, S.T. Chen, W.J. Hennen, *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 945 (1990)
- 2.88. P. Martinez, F. H. Arnold, *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 6336 (1991).
- 2.89. K. Chen, F. H. Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5618 (1993).



*Motto:*

*Das eine Molekül hat ein anderes geboren.*

Emil Fischer

### 3. Studii privind sinteza $\alpha$ -aminoacizilor optic activi

$\alpha$ -Aminoacizii sunt o clasă reprezentativă de produși naturali cu funcții biologice și fiziologice importante și diverse.

Se împart în aminoacizi proteinogeni și neproteinogeni. Numărul de structuri naturale neuzuale, adică neproteinogene cunoscute a crescut și crește constant, fiind de 700 în 1985 [3.1].

Pe lângă rolul lor de constituenți ai peptidelor, proteinelor și poliglicanilor din celulele bacteriene, aminoacizii au de asemenea o funcție importantă în transmiterea semnalului neuronal (glicina, glutationul) și sunt metabolizați în continuare, de exemplu la poliamine. Structurile neuzuale sunt produse mai ales de diferite microorganisme și au evoluat pentru a interfera în căile biochimice ale altor organisme. Prin analogie, un mare număr de aminoacizi naturali, dar și nenaturali, și-au găsit numeroase aplicații în medicină și farmacie, ca regulatori de creștere ai plantelor, în combaterea bolilor lor, etc.

Cu excepția glicinei, toți  $\alpha$ -aminoacizii au structuri chirale și majoritatea celor naturali aparțin seriei L care, în cele mai multe cazuri, corespunde configurației S după regula Cahn-Ingold-Prelog. Un efort considerabil a fost depus pentru obținerea aminoacizilor optic activi enantiomeric puri, de ambele configurații, subiect acoperit de numeroase referate de literatură [3.2-3.7].

Aminoacizii sunt compuși larg utilizați în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică și de asemenea ca materii prime în sinteza organică. Pentru aplicații în industria alimentară și în nutriție numai L-izomerul aminoacizilor este biologic activ. Se cunosc multe metode chimice de sinteză a aminoacizilor, dar produșii de reacție sunt amestecuri racemice. Biosinteza aminoacizilor cu microorganisme sau sisteme enzimatiche izolate conduce în exclusivitate la L-izomeri. Din acest motiv metodele biologice sunt în general preferate, iar pentru obținerea unei eficiențe ridicate a procesului de fabricare a aminoacizilor optic activi s-au folosit biocatalizatori imobilizați.

Compușii optic activi în general, și aminoacizii în particular, se obțin folosind ca materii prime:

- produse naturale chirale accesibile;
- compuși prochirali;
- racemice.

În figura 3.1 se prezintă diferitele metode de obținere a compușilor optic activi pornind de la cele trei categorii de substanțe enumerate mai sus.

Factorii care determină eficiența diferitelor căi de obținere a unui produs și metodele utilizate variază de la un produs la altul.

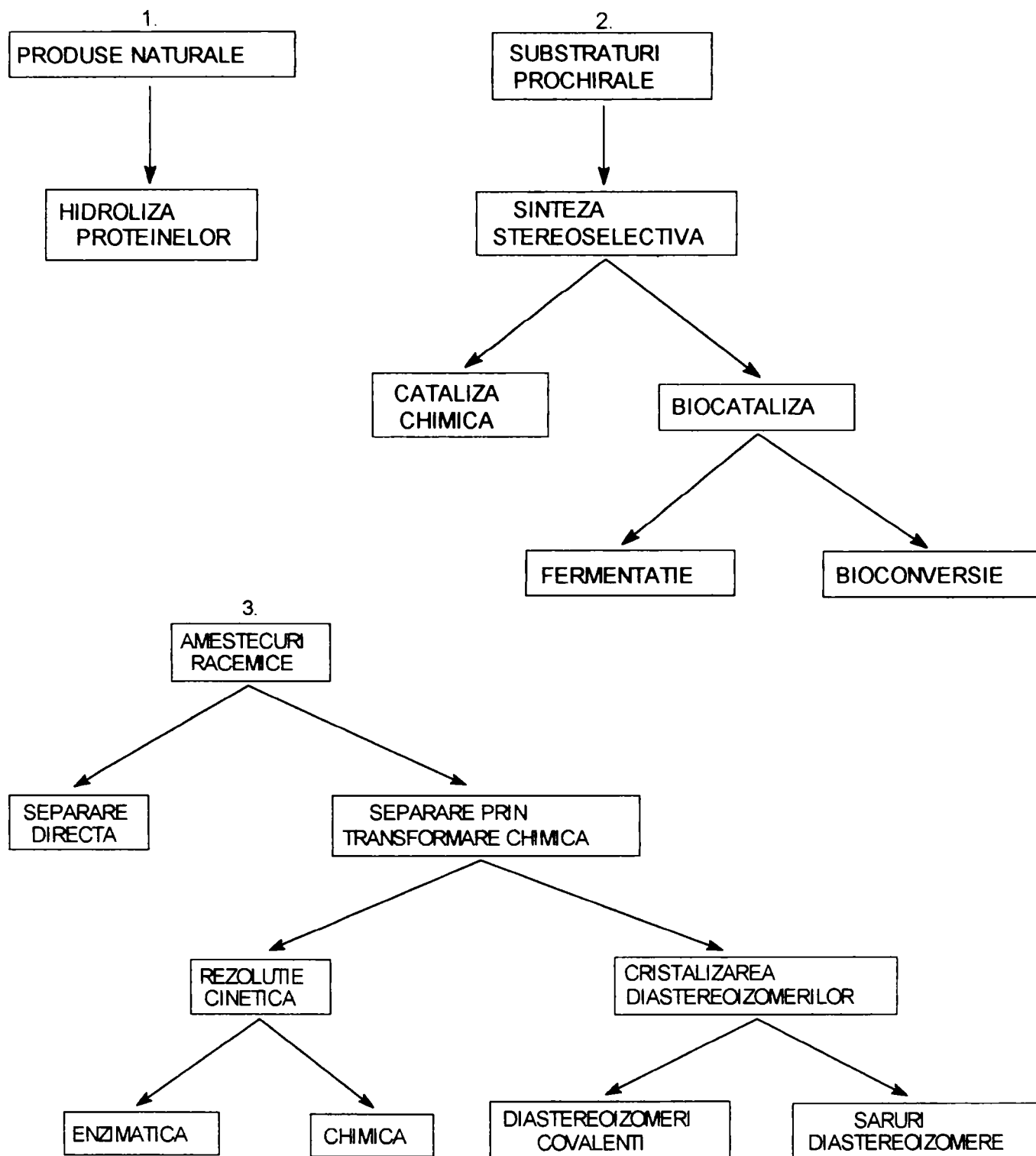


Figura 3.1. Căi de obținere a aminoacizilor optic activi

### 3.1. Produse naturale chirale, surse de L- $\alpha$ -aminoacizi

Sursele naturale de obținere a aminoacizilor sunt proteinele. Acestea conțin 20 de aminoacizi esențiali sub formă de acizi L- $\alpha$ -aminocarboxilici. În natură există o gamă largă de aminoacizi, inclusiv D-aminoacizi, dar care nu sunt conținuți în proteine. Aminoacizii se obțin din proteine prin hidroliză acidă, bazică sau enzimatică [3.8-3.14].

### 3.1.1. Hidroliza acidă

Importanță practică are numai procedeul clasic al hidrolizei acide. Pentru câțiva aminoacizi (cisteina, tirozina, prolina), această metodă de izolare din produse naturale chirale accesibile (atât vegetale cât și animale de natură proteică: cheratină, colagen, gluten, drojdii) a rămas încă una dintre cele mai economice variante.

Hidroliza clasică acidă lucrează cu HCl 6N (110°C) sau cu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8N. La neutralizarea hidrolizatului acid precipită o fracțiune bogată în L-cistină și L-tirozină, aminoacizi cu solubilitate scăzută în apă, care se separă din amestec prin cristalizare fracționată (figura 3.2).

Soluția rămasă mai conține aproximativ 18 aminoacizi. Prin concentrare se obțin aminoacizi cu solubilitate medie în apă (alături de săruri anorganice), din care se separă, prin cristalizare fracționată, L-leucina și L-izoleucina, alături de alți aminoacizi greu solubili.

Filtratul rămas, care conține aproximativ 16 aminoacizi, se separă în continuare prin metode cromatografice (cromatografie pe schimbători de ioni, gel-filtrare) sau extractive (figura 3.3). În general se utilizează schimbătorii de ioni clasici, pe bază de polistiren reticulat și funcționalizat cu grupări anionice sau cationice (sulfonice, carboxilice, aminice).

Prin separarea cromatografică a aminoacizilor la scară industrială se obțin fracții îmbogățite în anumiți aminoacizi. Uneori este necesară și o a doua separare cromatografică pe schimbători de ioni. Separarea se face pe grupe de aminoacizi bazici, neutri și acizi. Frațiunile cu mai mulți aminoacizi se cromatografiază din nou sau se separă prin cristalizare fracționată. Uneori aminoacizii se transformă în clorhidrați sau alte săruri care se purifică prin cristalizare fracționată, apoi aminoacizii liberi se pun în libertate prin trecere pe schimbători de ioni. În hidroliza clasică acidă cu HCl triptofanul este complet distrus, serina și treonina în proporție de până la 10%, asparagina și glutamina trec în acizii corespunzători.

Hidroliza acidă se mai poate face și cu acid propionic/HCl 12N în raport 1:1, 15 min la 160°C sau 2h la 130°C, cu acid 4-toluensulfonic 3N, cu acid mercapto-etansulfonic 3N, 24h la 110°C. Ultima metodă este potrivită mai ales în scopuri analitice, deoarece triptofanul rămâne nedistrus în proporție de 93%.

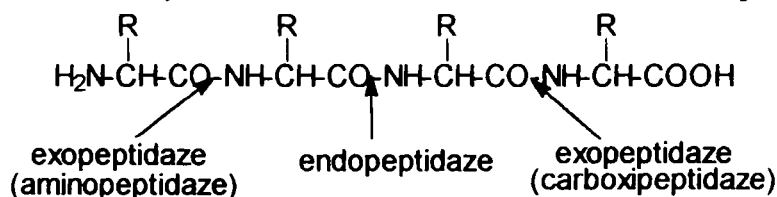
### 3.1.2. Hidroliza alcalină

Hidroliza alcalină cu NaOH 5N în prezență de amidon solubilizat evită descompunerea triptofanului dar determină pierderi în cazul aminoacizilor cu sulf, asparaginei și glutaminei, fiind mai distructivă decât hidroliza acidă.

Hidroliza alcalină cu Ba(OH)<sub>2</sub> 6N în autoclavă la 700 kPa distruge cisteina și hidroxiaminoacizii, dar păstrează triptofanul neatins.

### 3.1.3. Hidroliza enzimatică

Hidroliza enzimatică este singura metodă nedistructivă de obținere a aminoacizilor. În hidroliza proteinelor se folosesc atât exo- cât și endopeptidaze.



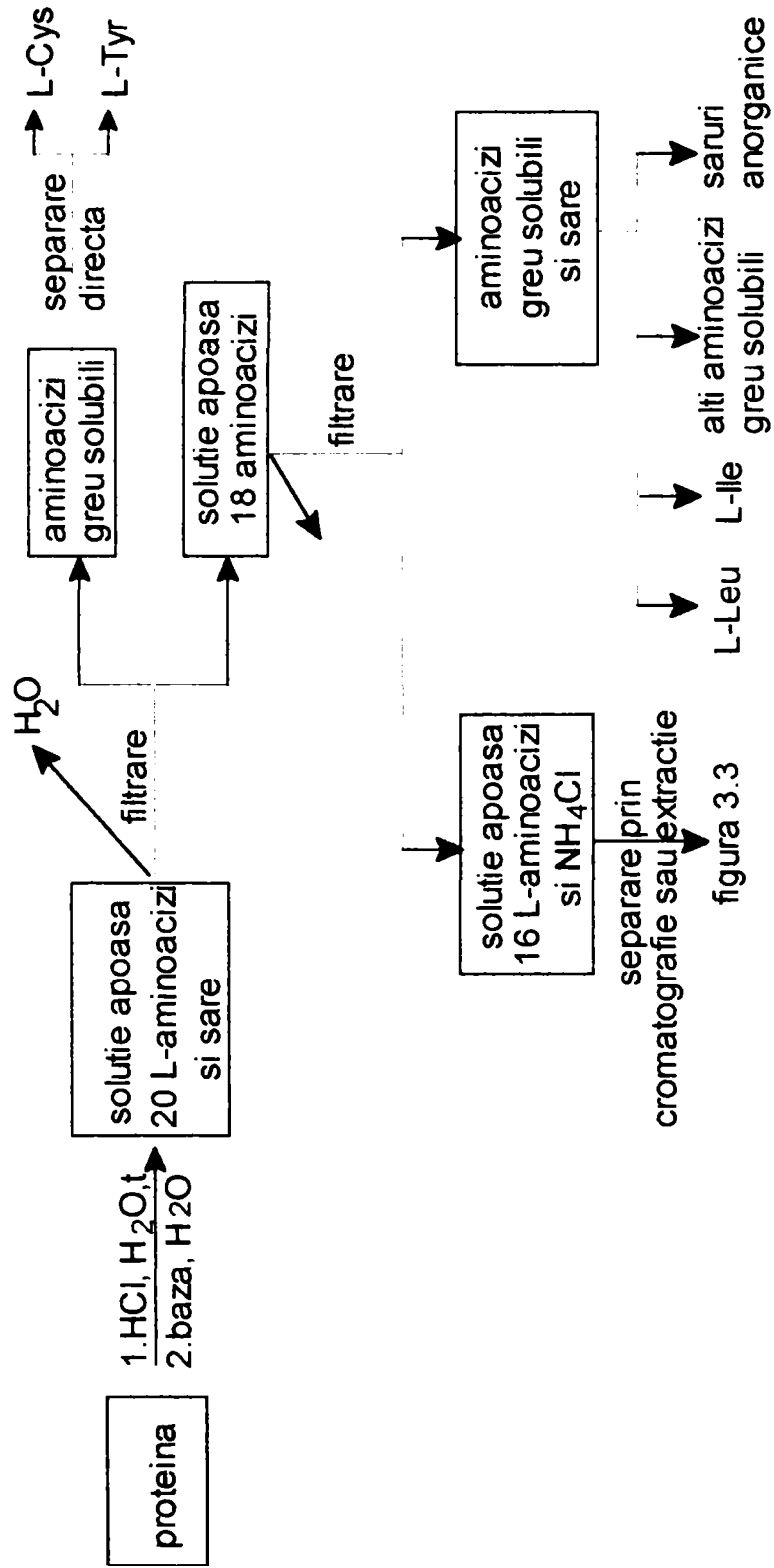


Figura 3.2. Hidroliza proteinelor și separarea aminoacizilor dintr-o proteină conținând cisteină

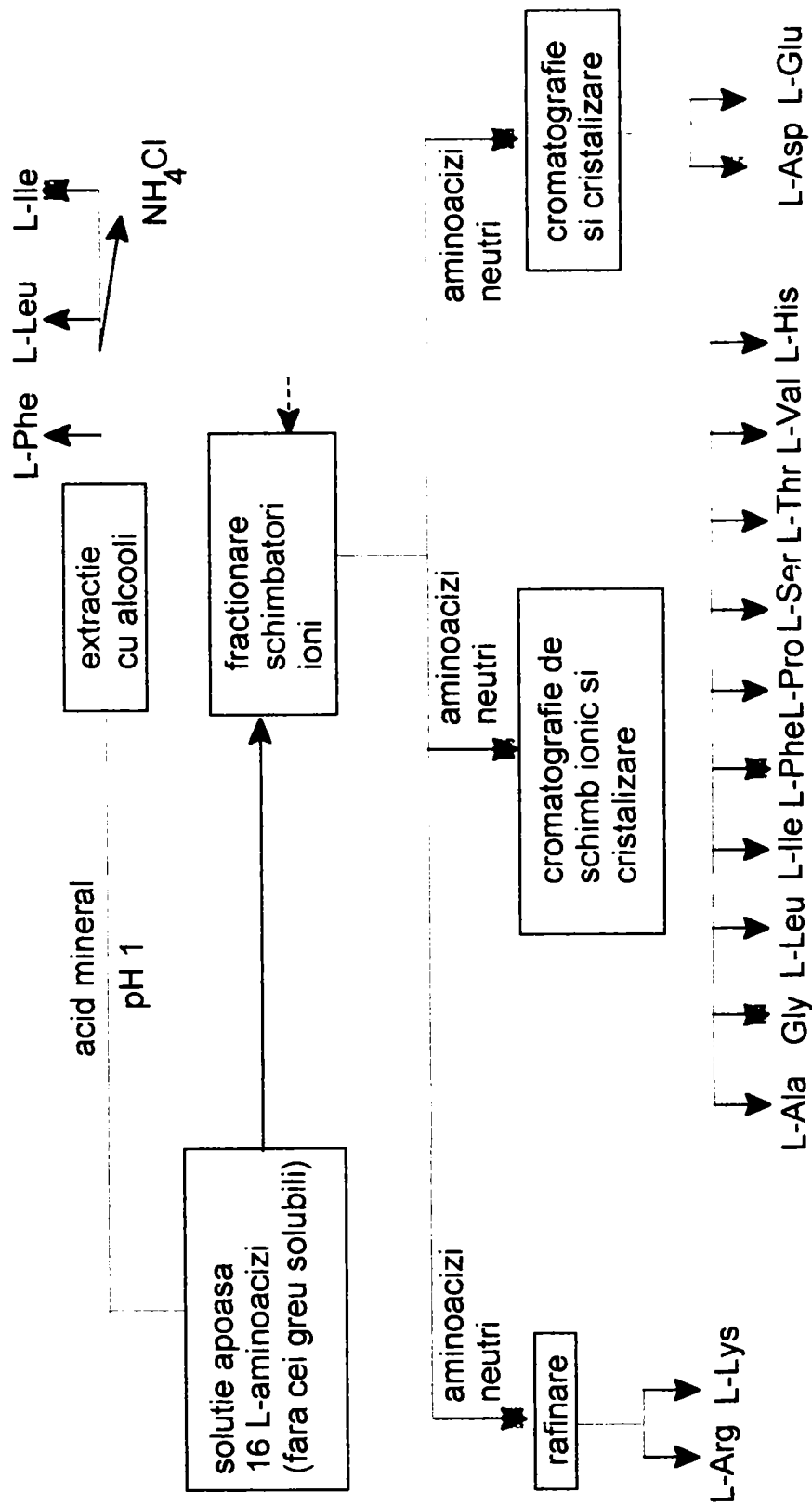


Figura 3.3. Separarea aminoacizilor din hidrolizatul proteic



Endopeptidazele hidrolizează legăturile peptidice din interiorul catenei peptidice, scindând proteinele mari în fragmente mai mici de polipeptide. Unele endopeptidaze sunt specifice scindării legăturilor amidice din vecinătatea unui anumit aminoacid. Astfel pepsina hidrolizează legăturile peptidice de la capătul carboxilic al unui rest de fenilalanină sau tirozină, iar tripsina scindează legăturile peptidice de la capătul carboxilic al lizinei și argininei.

Enzimele care hidrolizează legăturile marginale ale polipeptidelor (aminoacizi terminali) se numesc exopeptidaze. Aceste enzime au de asemenea specificitate absolută. Carboxipeptidazele scindează legăturile de la capătul carboxilic al catenei, scindând aminoacidul C-terminal, iar aminopeptidazele scindează aminoacidul de la capătul N-terminal al catenei. Numeroase enzime din această categorie au și specificitate pentru legăturile vecine unui anumit aminoacid.

Pentru hidroliza totală a proteinelor sunt necesare amestecuri de diferite proteaze cu pH-uri și temperaturi optime diferite. De aceea este necesară ajustarea pH-ului și temperaturii în timpul procesului de hidroliză.

Deși este complet nedistructivă, hidroliza enzimatică are trei dezavantaje importante:

- se lucrează în soluții diluate;
- durează timp îndelungat;
- este condusă greu până la hidroliza totală.

Aceste dezavantaje au fost rezolvate, în parte, prin folosirea de proteaze comerciale și microbiene pe diferite suporturi și punerea la punct a unor tehnologii care utilizează enzime cu specificități foarte diferite, dar care lucrează în aceleași condiții de pH și temperatură [3.10].

Amestecul de aminoacizi liberi obținut în urma hidrolizei este trecut pe coloane de schimbători de ioni (schimbători de ioni acizi, la pH 2, ca de exemplu copolimer polistiren sulfonat/divinilbenzen). Eluarea se face cu serii de tamponi cu pH și tărâie ionică crescătoare. Aminoacizii se colectează treptat, fracțiunile putând fi supuse unor separări ulterioare [3.12].

Există și alte variante de separare ca:

- cristalizarea directă a acidului glutamic în prezența HCl,
- absorbția selectivă a aminoacizilor aromatici pe cărbune activ,
- separarea aminoacizilor acizi, bazici sau neutri prin electroforeză.

La acestea se adaugă o serie de metode clasice, ca de exemplu distilarea fracționată a esterilor aminoacizilor, extracția monoaminoacizilor cu alcool etilic sau aminoalcooli [3.8].

Dintre toate metodele de separare amintite, studiile cele mai numeroase au fost consacrate cromatografiei de lichide [3.15-3.18], de gaze [3.19], de schimb ionic [3.12, 3.20] sau de schimb de liganzi [3.21-3.25].

## 3.2. Aminoacizi optic activi din substraturi prochirale

### 3.2.1. Metode biocatalitice de obținere a aminoacizilor optic activi

#### 3.2.1.1. Obținerea aminoacizilor optic activi prin fermentație

Celula microbiană este „reactantul enzimatic tip membrană” cel mai specializat în utilizarea sistemelor multienzimatice pentru obținerea de substanțe utile.

##### 3.2.1.1.1. Producerea directă de aminoacizi din diverse surse de carbon

Toți cei 19 aminoacizi proteinoși se pot obține în principiu prin fermentație ca metaboliți primari. Totuși, majoritatea tulpinilor sălbatice izolate din natură nu pot produce cantități semnificative din punct de vedere industrial deoarece supra-producția de aminoacid este prevenită prin mecanisme de reglare metabolică (inhibiție prin *feed-back*), una dintre problemele majore în biosinteza de aminoacizi. Mai mult, membrana celulară a reprezentat o barieră în eliminarea aminoacidului în mediu, ceea ce a constituit o altă problemă importantă a fermentației.

Descoperirea primelor bacterii producătoare de aminoacizi datează din 1957 [3.26, 3.27] și descoperirea sintezei microbiene viabile comercial marchează momentul fondării industriei fermentative de aminoacizi în Japonia. Au fost găsite numeroase tulpini de *Brevibacterium* și *Corynebacterium* producătoare de acid L-glutamic.

Obținerea pe cale fermentativă a acidului L-glutamic reprezintă modelul clasic de obținere microbiană a aminoacizilor (figura 3.4) [3.20].

Tulpini sălbatice de *Brevibacterium* și *Corynebacterium* transformă D-glucoza în acid oxalilacetic care este metabolizat în acid  $\alpha$ -oxo-glutaric. Acesta din urmă prin aminare reductivă se transformă în acid L-glutamic.

În cazul tulpinilor sălbatice de *Brevibacterium flavum* sau *Corynebacterium glutamicum* sau al mutanților acestora, producerea metaboliților este reglată prin *feed-back*, astfel că multe microorganisme produc acid glutamic la nivelul necesarului pentru creștere și înmulțire.

Procesul fermentativ submers de obținere a acidului L-glutamic parcurge etapele normale ale fermentației: inocul (Erlenmayer), prefermentator (100-500 l), fermentator intermediar (5-10 m<sup>3</sup> volum util), fermentator de producție.

Principalele **surse de carbon** utilizate sunt glucoza, melasa de trestie sau sfeclă, hidrolizatul de amidon. Au fost de asemenea adaptate tehnologii care utilizează etanol, acid acetic sau hidrocarburi. Ca **surse de azot** se utilizează uree sau amoniac gazos. Datorită necesarului mare de azot, sursa de azot este esențială pentru obținerea unor productivități mari. Ca substanțe nutritive se mai folosesc vitamine, precum și substanțe minerale necesare creșterii.

Pentru mărirea permeabilității celulare, este esențială introducerea în mediu a unor cantități suboptimale de biotină sau înlocuitori ai acesteia, cum sunt penicilina, acizii grași saturați C<sub>16</sub> și C<sub>18</sub> și acidul oleic.

Principalii factori care controlează biosinteza de aminoacid sunt sterilizarea echipamentului, mediului și aerului, controlul pH-ului, temperaturii și spumării, aerarea și agitarea.

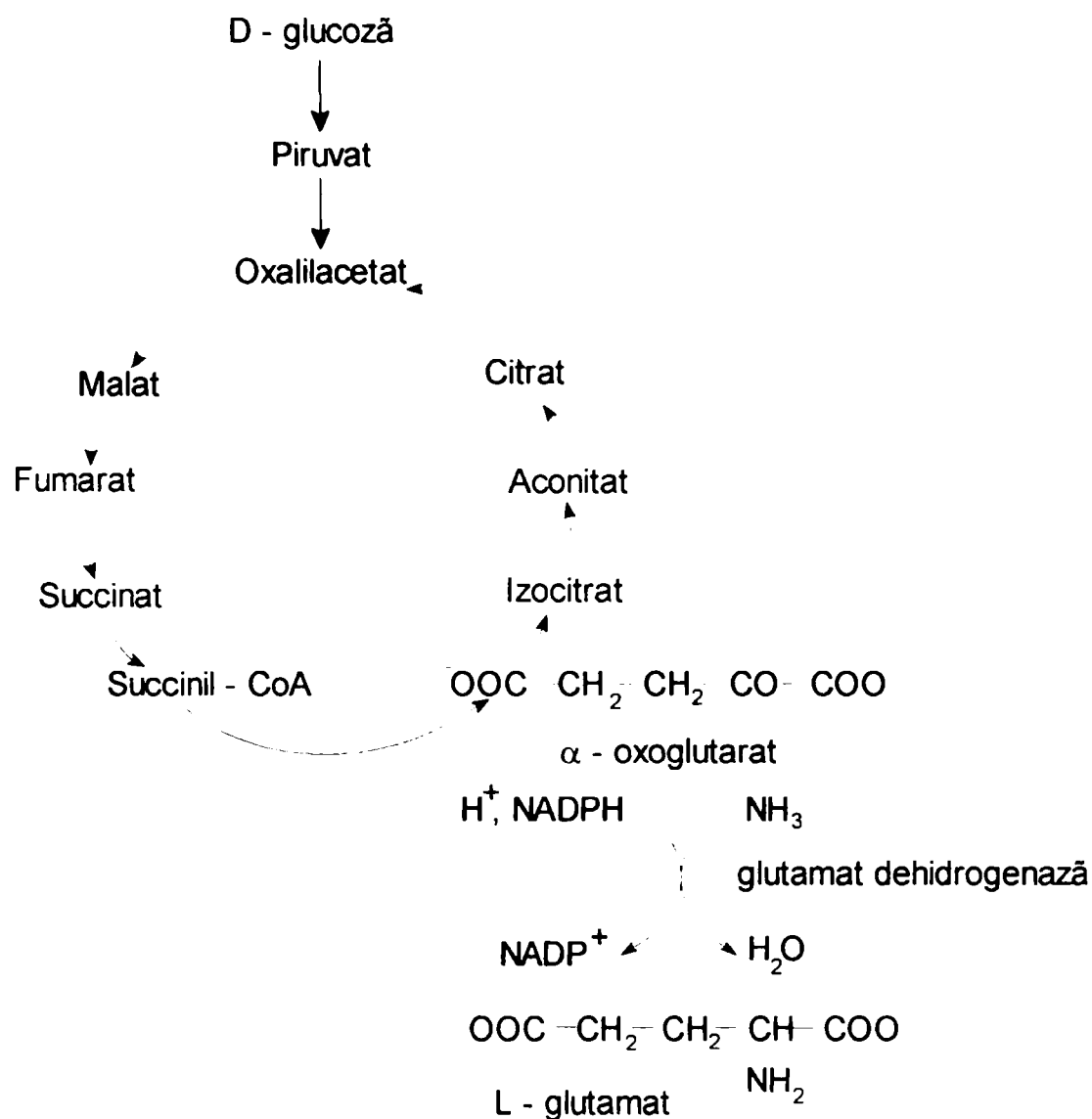
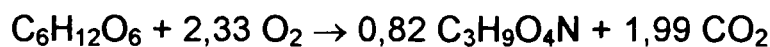


Figura 3.4. Biosinteza acidului L-glutamic

Sterilizarea este importantă nu pentru că bacteriile ar avea contaminanți specifici ci pentru că aminoacidul din mediul de cultură este nutrient pentru multe microorganisme, ceea ce poate cauza scăderea productivității. Consumul de oxigen și transferul termic pe unitatea de volum și de timp sunt mari. Procesul este aerob iar consumul de oxigen mare, de aceea agitarea și aerarea sunt esențiale:



Deoarece moleculele de aminoacizi conțin mult azot, selectarea unei surse corespunzătoare și în cantități adecvate este esențială pentru performanțele fermentației. Utilizarea amoniacului gazos ca sursă de azot și ca agent de control al pH-ului rezolvă o serie de probleme tehnologice: evită diluția culturii, controlul pH-ului este mai precis, echipamentul de operare mai simplu. Spumarea de obicei se controlează prin adăugarea automată de antispumanti. În timpul fermentației, temperatura se menține la 35°C, iar timpul optim de fermentare este de aproximativ 2 zile.

Separarea aminoacidului rezultat în urma fermentației se efectuează conform următoarei scheme generale (figura 3.5) [3.20].

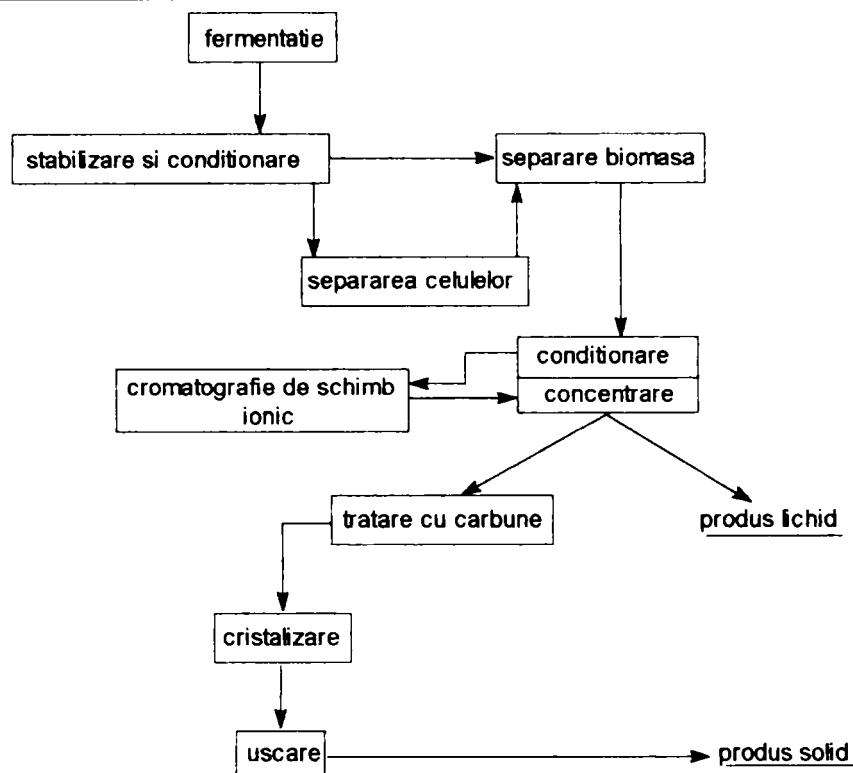


Figura 3.5. Izolarea aminoacizilor obținuți prin fermentație

Pe lângă acid L-glutamic, prin biosinteză s-au mai obținut și alți aminoacizi: L-Lys, L-Thr, L-Pro, L-Phe, L-Trp [3.26]. Deși la ora actuală este posibilă prepararea tuturor aminoacizilor prin biosinteză, aplicații industriale pe scară largă prezintă numai procesele de obținere a acidului L-glutamic, L-lizinei, L-alaninei și L-valinei. Astfel, acidul L-glutamic și L-lizina se obțin la o scară de 350.000 și respectiv 70.000 tone/an. În tabelul 3.1 sunt prezentate câteva exemple de tulpini microbiene care produc L-aminoacizi și concentrația finală în mediul de cultură [3.26].

Tabelul 3.1. Obținerea aminoacizilor prin fermentație

Nr. crt.	L-aminoacid	Conc. Finală (g/l)	Tulpina microbiană
1.	alanina	40	<i>Corynebacterium gelatinosum</i>
2.	arginina	35	<i>Brevibacterium flavum</i>
3.	acid glutamic	39 100	<i>Brevibacterium flavum</i> <i>Corynebacterium sp.</i>
4.	histidina	10 15	<i>Brevibacterium flavum</i> <i>Corynebacterium glutamicum</i>
5.	izoleucina	30	<i>Brevibacterium flavum</i>
6.	leucina	30	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>
7.	lizina	32 70 44	<i>Brevibacterium flavum</i> <i>Brevibacterium lactofermentum</i> <i>Corynebacterium flavum</i>
8.	fenilalanina	25 6	<i>Brevibacterium lactofermentum</i> <i>Bacillus subtilis</i>
9.	ornitina	26	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
10.	prolina	35	<i>Brevibacterium flavum</i>
11.	treonina	18 25	<i>Brevibacterium flavum</i> <i>Serratia narcescens</i>
12.	triptofan	20 6,1	<i>Brevibacterium flavum</i> <i>Bacillus subtilis</i>
13.	valina	23 30	<i>Brevibacterium lactofermentum</i> <i>Corynebacterium glutamicum</i>

Proprietățile tulpinilor pot fi modificate prin selecție și mutații repetate, în genul geneticii clasice sau, cum se realizează în prezent, prin metoda manipulării genetice directe. Aplicarea tehnologiei ADN recombinant a dus la obținerea de tulpini mult îmbunătățite.

Fermentația este în general un proces discontinuu. Acesta poate fi condus și în mod continuu prin cuplarea fazelor de creștere a microorganismelor cu faza de producție și totodată cu procesele de prelucrare a soluțiilor finale, de exemplu prin folosirea membranelor. Izolarea aminoacidului din soluțiile relativ diluate și separarea din biomasă a numeroșilor produși secundari formați sunt factori determinanți în alegerea modului de operare, continuu sau discontinuu, al procesului.

Eficacitatea fermentațiilor și prețurile de cost depind de volumul de producție necesar pentru a susține o cercetare corespunzătoare. Este cazul L-Phe a cărui proces fermentativ a fost mult îmbunătățit odată cu utilizarea sa în sinteza aspartamului și respectiv a L-Pro, sinton chiral în sinteza unor medicamente antihipertensive, și anume ACE-inhibitorii.

Fermentația nu este totdeauna cea mai economică metodă de producere de aminoacizi. De exemplu acidul aspartic, materia primă pentru aspartam, se obține mai economic prin adăugarea enzimatică a amoniacului la acid fumaric, catalizată de aspartaza din celulele imobilizate de *Escherichia coli*, într-un proces continuu.

### 3.2.1.1.2. Metoda precursorilor

Pentru unii aminoacizi, ca L-Trp sau L-Ser, fermentația directă a fost foarte greu de realizat, din cauza dificultății de a evita controlul metabolic. Pentru ei a fost dezvoltată metoda fermentației precursorilor. Ca precursori se utilizează unii metaboliți intermediari din calea metabolică de sinteză a aminoacidului respectiv. Biosinteza de aminoacid este însoțită de o serie de reacții secundare, ca de exemplu sinteza de ATP și de aceea se utilizează și surse obișnuite de carbon, așa cum este glucoza.

Astfel, L-Trp se obține din tulpini de *Hansenula anomala*, utilizând ca precursori acid antranilic sau indol, ca surse de carbon glucoză, etanol sau glicerină, obținându-se concentrații de 3 mg/l și un randament de 90%. L-Ser se obține din culturi de *Corynebacterium glycinophilum*, utilizând ca sursă de carbon glucoza și ca precursor glicina, la o concentrație de 10 mg/l. Un alt exemplu este bioconversia acidului  $\alpha$ -cetoizocaproic în L-leucină, cu tulpini de *Corynebacterium glutamicum* [3.28].

### 3.2.1.2. Aminoacizi optic activi prin sinteză enzimatică asimetrică din precursori prochirali

O transformare microbiană (biotransformare, bioconversie) reprezintă transformarea unui substrat prin intermediul unui microorganism sau a produșilor acestuia. Este o reacție catalizată de enzime izolate sau celule întregi, viabile sau nu, în procese nefermentative. În timp ce fermentația utilizează surse de carbon și azot și produsul util este un metabolit al microorganismului, produs în fazele sale de creștere și înmulțire, în transformarea microbiană microorganismul este folosit ca sursă, ca purtător de enzime, nefiind esențială activitatea sa metabolică. Biotransformarea duce la o modificare simplă și specifică în molecula de substrat, natural sau nenatural.

Ca substraturi se utilizează derivați sau precursori de aminoacizi. Se obține doar un singur stereozomer, iar procesul nu este însoțit de reacții secundare. Ca precursori



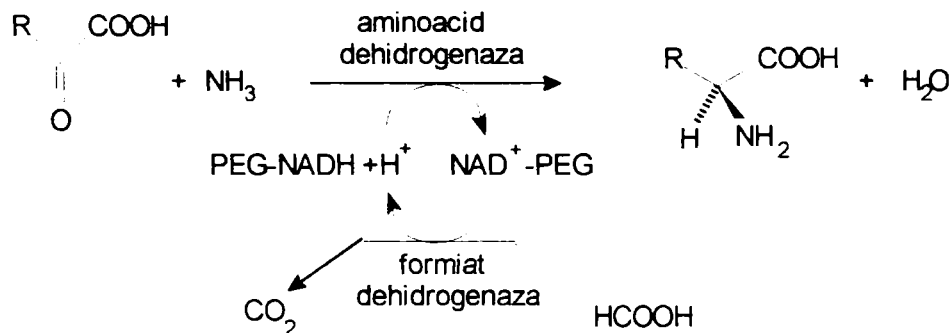
se utilizează  $\alpha$ -cetoacizi,  $\alpha$ -hidroxiacizi, acizi carboxilici  $\alpha,\beta$ -nesaturați iar ca enzime aminotransferaze, dehidrogenaze, liaze, decarboxilaze [3.4, 3.29]. Toate aceste clase de enzime necesită cofactor, astfel că apare în plus problema regenerării și recirculării acestuia. Dintre sistemele studiate, reactorul membrană dezvoltat de Wandrey și colab., care permite regenerarea cofactorului, pare viabil comercial. A fost pus la punct un proces de sinteză continuă de L-aminoacizi și 2-hidroxiacizi la scară de laborator și pilot cu un consum minim de coenzimă [3.29].

Vor fi prezentate câteva exemple reprezentative, în funcție de tipul de enzimă utilizat.

### 3.2.1.2.1. Dehidrogenaze

Reducerea enantioselectivă a legăturii C=N prin procedee enzimatică se poate face cu transaminaze (E.C. 2.6.1) sau aminoacid dehidrogenaze (E.C. 1.4.1.).

Aminoacid dehidrogenazele catalizează aminarea reductivă enantioselectivă a  $\alpha$ -cetoacizilor la L-aminoacizi, cu consumarea unui echivalent de cofactor (NADH sau NADPH) (figura 3.6). Reacția este un echilibru, în cele mai multe cazuri el fiind deplasat către produsul aminat. Derivații imino, conținând legătura C=N, sunt intermediari de reacție între cetoacizi și aminoacizi. Toate aminoacid dehidrogenazele catalizează reducerea cetoacizilor prochirali la L-aminoacizi (configurație S). Nu s-au găsit încă D-aminoacid dehidrogenaze. Cele mai importante dehidrogenaze sunt alanin dehidrogenaza (AlaDH, E.C. 1.4.1.1, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Halobacterium*), fenilalanin dehidrogenaza (PheDH, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Rhodococcus*), leucin dehidrogenaza (LeuDH, E.C. 1.4.1.9, *Bacillus*, *Clostridium*), glutamat dehidrogenaza (E.C.1.4.1.2-1.4.1.4, din bacterii, fungi, drojdii, surse animale), cea mai studiată dintre ele. LeuDH catalizează sinteza de aminoacizi ramificați, proteinogeni (Val, Leu, Ile) sau nenaturali (*terț*-Leu, L- $\beta$ -hidroxivalină), AlaDH, cu o specificitate de substrat mai redusă, de analogi de L-Ala, inclusiv marcați cu  $^{15}\text{N}$ , iar PheDH de L-Phe, L-His, L-Ile, dar și de L-homofenilalanină, componentă a ACE-inhibitorilor [3.30]. Exploatarea comercială a acestui proces depinde de găsirea unei metode economice de regenerare a NADH, ceea ce se poate realiza de exemplu prin utilizarea formiat dehidrogenazei (E.C. 1.2.1.43) [3.31, 3.32].



R	Enzima	Produs
CH <sub>3</sub>	L-alanin dehidrogenază	L-Ala
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub>	L-leucin dehidrogenază	L-Leu
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH	L-leucin dehidrogenază	L-Val
(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C	L-leucin dehidrogenază	L- <i>terț</i> -Leu
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	L-fenilalanin dehidrogenază	L-Phe

Figura 3.6. Aminarea reductivă enantioselectivă a  $\alpha$ -cetoacizilor cu regenerarea *in situ* a cofactorului, într-un bioreactor membrană

O altă problemă este separarea substratului și produșilor de NADH. Acest lucru a fost rezolvat prin legarea celui din urmă de PEG (M 20.000) și imobilizarea conjugatului PEG-NAD(H) pe una din fețele unei membrane de ultrafiltrare. Un astfel de proces și de bioreactor membrană cu operare continuă au fost elaborate de Wandrey și colab. și comercializate de Degussa pentru producerea de L-alanină, dar și pentru alți aminoacizi (capacitate 250 t/an, 1987). Astfel, L-Leu a fost obținută la o productivitate de 200 g/l-zi, la o recirculare a PEG-cofactorului de 70000 [3.29].

O variantă a acestui sistem este cuplarea unei  $\alpha$ -hidroxiacid dehidrogenaze cu o aminoacid dehidrogenază într-un reactor membrană, pentru transformarea unui  $\alpha$ -hidroxiacid la un L-aminoacid prin formarea *in situ* a cetoacidului [3.29]. Cuplarea celor două reacții face ca să nu mai apară un consum net de NADH. Astfel, acidul L-lactic poate fi transformat în L-alanină utilizând L-lactat dehidrogenază simultan cu L-alanin dehidrogenază. Dacă se utilizează atât L- cât și D-lactat dehidrogenază, în sistem poate fi utilizat ca substrat acidul lactic racemic (figura 3.7). Acest sistem ilustrează o tendință generală în transformările enzimaticе, și anume utilizarea sistemelor enzimaticе cuplate pentru a evita consumul de cofactor.

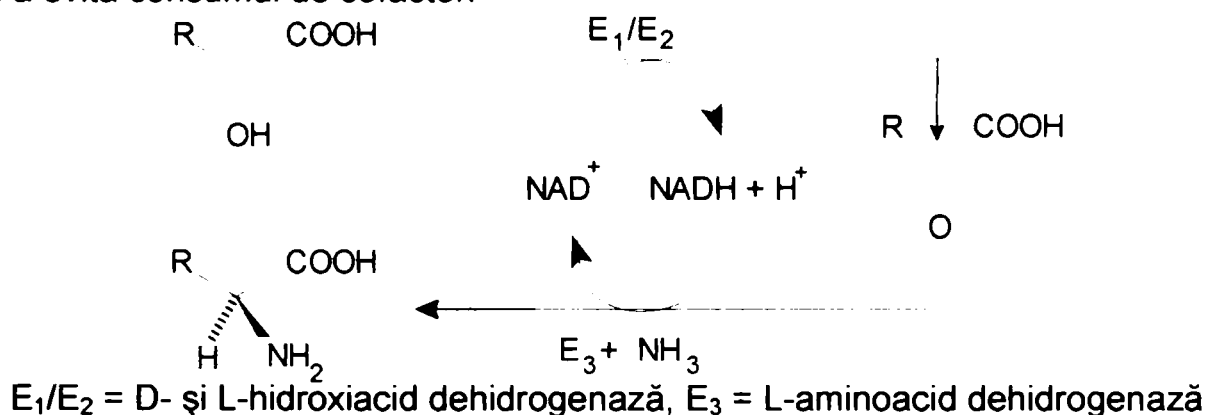


Figura 3.7. L-aminoacizi din  $\alpha$ -hidroxiacizi

Prin transaminarea reductivă a 2-oxo-3-fluoroglutaratului racemic cu glutamat dehidrogenază se obțin ambii diastereomeri ai acidului  $\beta$ -fluoroglutamic. NADH consumat este regenerat *in situ* prin cuplare cu sistemul alcool dehidrogenază/etanol. Cei doi diastereoizomeri, separați prin cromatografie de schimb ionic, se obțin optic puri (figura 3.8) [3.33].

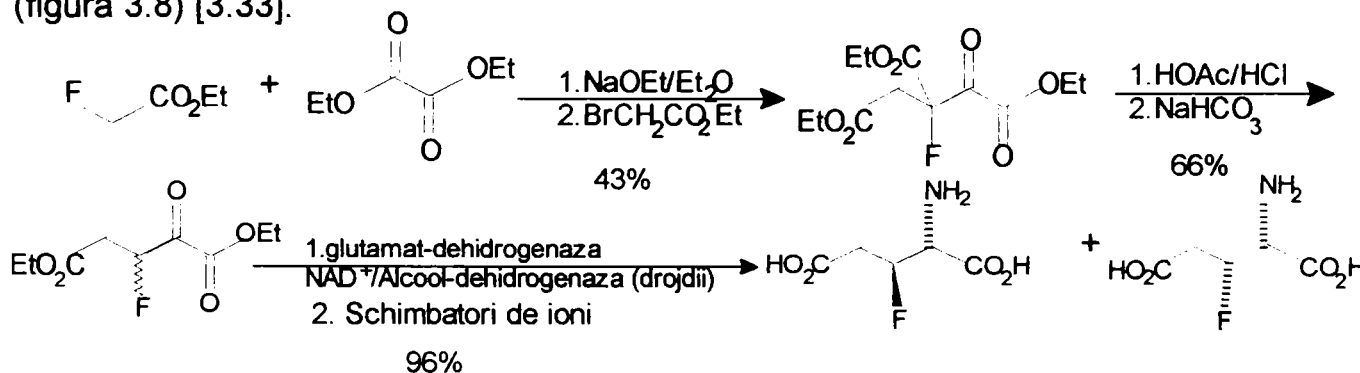


Figura 3.8. Sinteza diastereomerilor acidului  $\beta$ -fluoroglutamic prin transaminarea reductivă a 2-oxo-3-fluoroglutaratului

În figura 3.9 se prezintă schema de obținere a  $\alpha$ -aminoadipatului optic pur (randament 84%) din  $\alpha$ -cetoadipat și amoniac cu glutamat dehidrogenază. NADH

consumat este regenerat prin cuplarea reacției de transaminare reductivă cu ciclizarea oxidativă unui mezo-diol la lactona optic activă corespunzătoare cu alcool dehidrogenaza din ficat de cal (HLADH), care necesită  $\text{NAD}^+$ . Reacția are loc în sistem bifazic, care permite separarea ușoară a produșilor și evită problemele normale generate de inhibiția de produs [3.34].

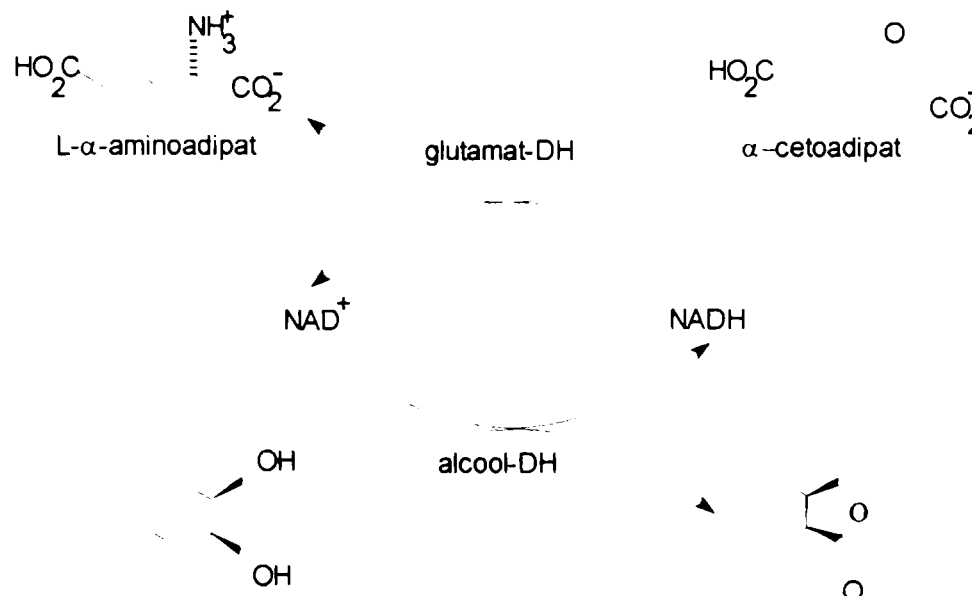


Figura 3.9. Sinteza α-aminoadipatului din α-cetoadipat și amoniac cu glutamat- și alcool-dehidrogenază

Având avantajul transformării cantitative a cetoacidului, metoda reprezintă o cale interesantă către α-aminoacizi, dacă se rezolvă problema regenerării cofactorului.

### 3.2.1.2.2. Aminotransferaze

În principiu toți aminoacizii se pot obține din 2-cetoacizii corespunzători, utilizând ca donor de grupare amino un aminoacid ieftin, aceasta deoarece există numeroase specii de transaminaze, sau, conform numelui sistematic, aminotransferaze [3.29, 3.35, 3.36], specifice pentru reacțiile de transaminare ale aminoacizilor acizi, aromatici, hidrofobi, cu catenă ramificată cum sunt aspartat aminotransferaza, aminoacid aromatic aminotransferaza, alanin-valin aminotransferaza, aspartat aminotransferaza, majoritatea cu o specificitate de substrat relativ largă, produse de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Achromobacter eurydice*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putita*, *Saccharomyces cerevisiae*, sau extrase din organe animale (miocardul porcine) etc.[3.37]. Metoda a fost aplicată la scară de laborator pentru L-Ala, L-Phe, L-Trp, etc.

Transaminazele au ca și cofactor piridoxal-5'-fosfat, legat sub formă de bază Schiff de gruparea ε-amino a unui rest de lizină din situsul activ.

Reacția de transaminare este o reacție de echilibru între L-aminoacid și 2-cetoacid, echilibru care se poate deplasa printr-un exces de donor amino, mai ieftin (se obține însă un amestec în care produsul dorit este în concentrație relativ mică), sau prin separarea continuă a unuia dintre produși prin metode fizice sau transformarea sa prin reacții consecutive. Deși acidul glutamic este donorul amino pentru aminotransferaze, reacția decurge și cu acid L-aspartic, și în acest caz deplasarea totală a echilibrului se

face prin decarboxilarea acidului oxaloacetic format la acid piruvic, fie chimic (cu ioni metalici, baze) fie enzimatic (cu oxalat decarboxilază) [3.36].

Un exemplu de proces la scară industrială (600 t/an) este sinteza L-fenilalaninei cu o transaminază piridoxal-5'-fosfat-dependentă. Benzilidenhidantoina este hidrolizată la acid fenilpiruvic și apoi transaminată cu acid aspartic ca donor de grupare amino. Acidul oxalilacetic este apoi decarboxilat la acid piruvic (figura 3.10) [3.38].

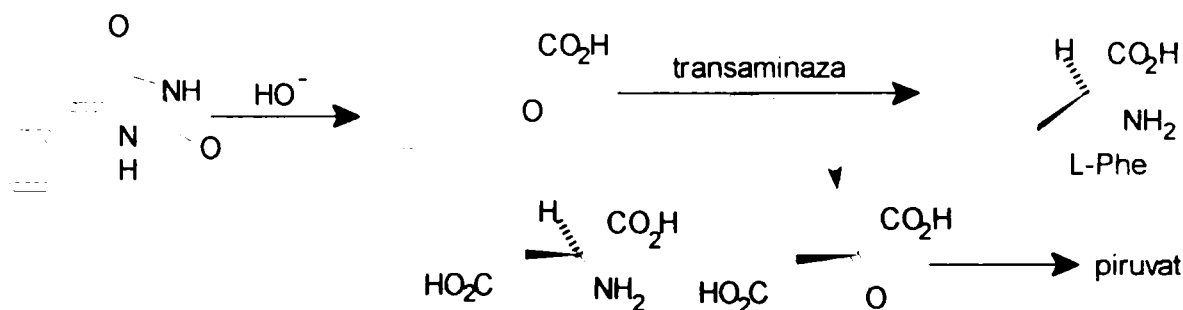


Figura 3.10. Sinteza L-Phe din hidantoina corespunzătoare cu transaminaze

Paserat și Bolte [3.39] au descris o utilizare interesantă a glutamic oxaloacetic aminotransferazei imobilizate la sinteza acizilor  $\gamma$ -hidroxi-L-glutamici (figura 3.11).

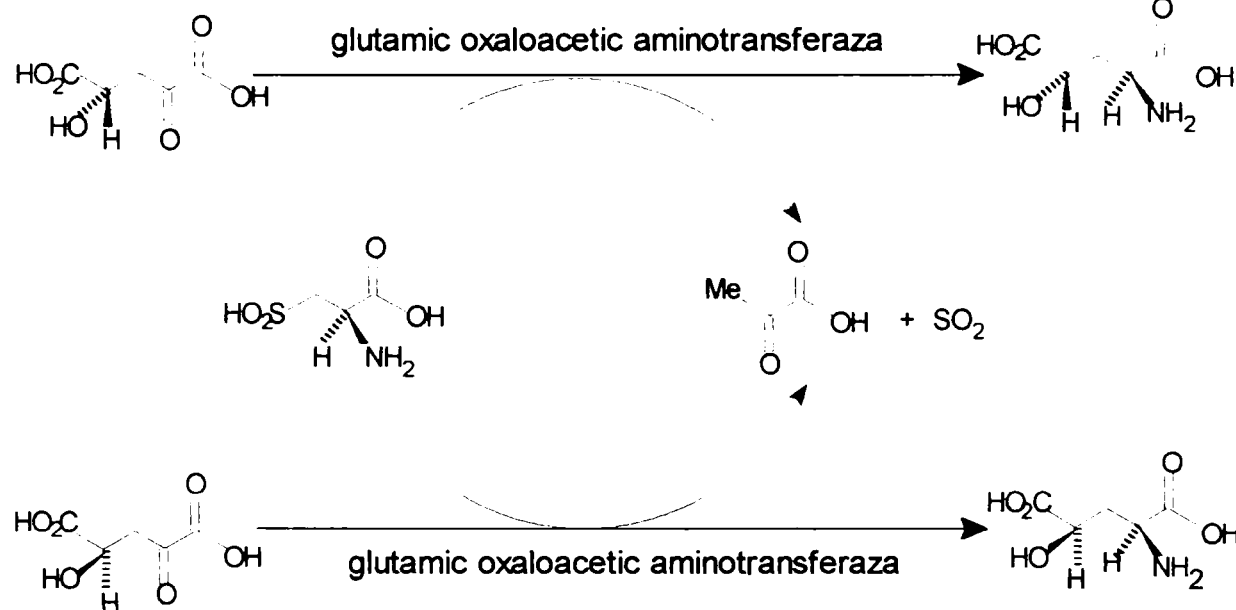


Figura 3.11. Sinteza acizilor  $\gamma$ -hidroxi-L-glutamici cu glutamic oxaloacetic aminotransferază

Acizii  $\gamma$ -hidroxi- $\alpha$ -cetoglutarici sunt transformați în acizii  $\gamma$ -hidroxi-L-glutamici corespunzători cu glutamic oxaloacetic aminotransferaza din ficat de șobolan imobilizată în gel de acrilamidă [3.39, 3.40]. Echilibrul este deplasat prin utilizarea acidului cisteinsulfonic, un analog al Asp, ca donor amino. După transformare în  $\alpha$ -cetoacidul corespunzător, acesta pierde spontan dioxid de sulf, cu formare de acid piruvic. Producții diastereomeri rezultați pot fi separați de exemplu prin cromatografie.

Baldwin și colab. au utilizat o aspartat transaminază clonată din *E. coli* pentru sinteza a mai mulți  $\alpha$ -aminoacizi din  $\alpha$ -cetoacizii corespunzători (figura 3.12) [3.41].

Ca donori amino se utilizează L-Asp sau L-Glu. Enzima a prezentat o largă specificitate de substrat, producând aminoacizi (L-Phe, L-Tyr, L-Trp, L-Ala, L-Leu, L-Val, L-Met, etc.) cu excese enantiomerice mari. Substraturile alifatică, despre care inițial s-a

crezut că nu sunt substraturi potrivite pentru enzimă, au fost transformate prin creșterea concentrației de enzimă de 10-15 ori. Accesibilitatea la scară mare a enzimei clonate face procesul fezabil economic.

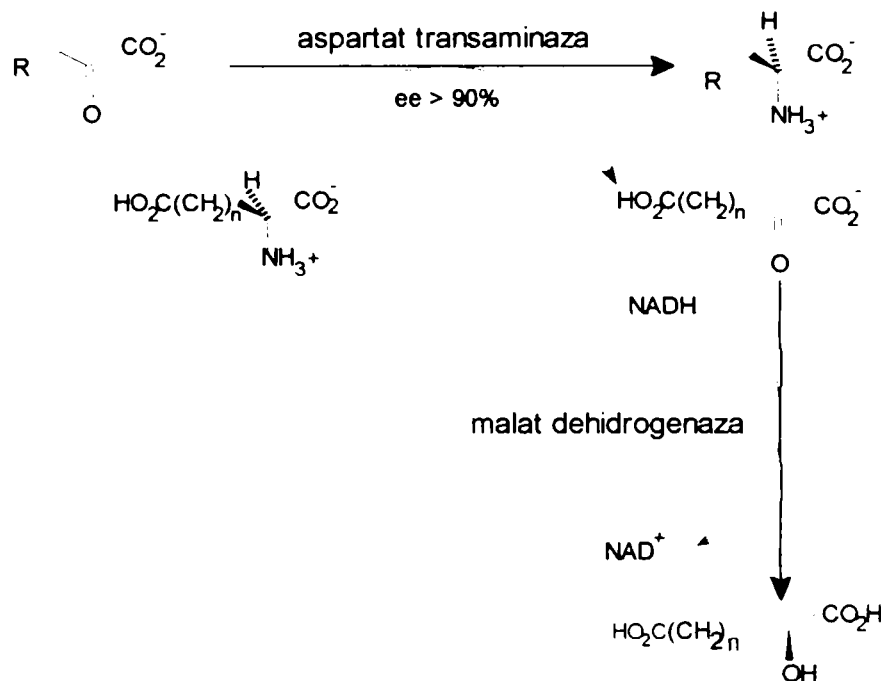


Figura 3.12. Sinteze de  $\alpha$ -aminoacizi din  $\alpha$ -cetoacizi cu aspartat transaminază din *E. coli*

### 3.2.1.2.3. Amoniac-liazele

Amoniac-liazele catalizează adăuga enantioselectivă a amoniacului și aminelor la legături C=C activate, mai ales la acizi carboxilici  $\alpha,\beta$ -nesaturați. Se cunosc L-aspartaza (nume sistematic L-aspartat aminoac-liaza, E.C. 4.3.1.1, din *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas trefolii*, *Escherichia freundii*, *Escherichia coli*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium flavum*, *Bacterium cadaveris*, *Bacillus stearothermophilus*),  $\beta$ -metilaspartaza (E.C. 4.3.1.2, din *Chlostridium tetanomorphum*), L-fenilalanin amoniac-liaza (PAL, E.C. 4.3.1.5, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula graminis*, *Cladosporium cladosporioides*, *Escherichia lindneri*), L-histidin amoniac-liaza (E.C. 4.3.1.3, *Brevibacterium ammoniagenes*), majoritatea având o specificitate de substrat îngustă [3.42].

De exemplu, acidul aspartic, o materie primă cheie în sinteza aspartamului, este produs comercial de Tanabe (din 1973) din acid fumaric și amoniac cu conversii ridicate (99%) (figura 3.13). Procesul utilizează celule întregi de *E. coli* cu activitate aspartazică imobilizate prin entrapare în gel de poliacrilamidă sau  $\kappa$ -carrageenan, într-un proces continuu [3.43, 3.44]. Producția de L-Asp în 1987 a fost de 4000t/an.

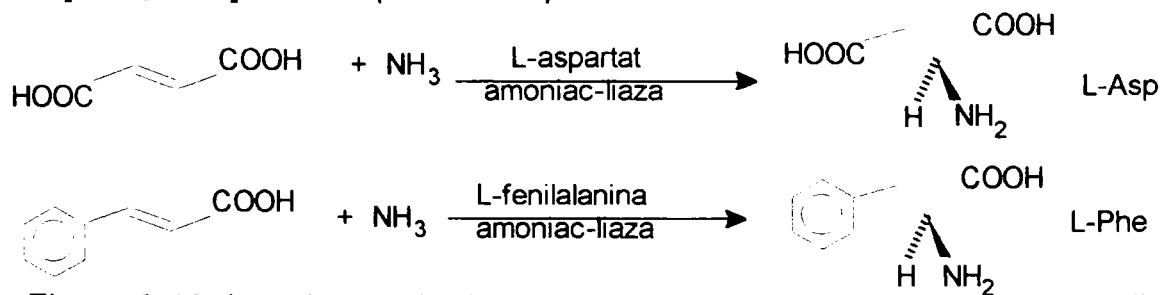


Figura 3.13. L-aminoacizi prin adăuga amoniacului la acizi nesaturați cu liaze



Importanța industrială a L-Asp a stimulat căutarea unor tehnologii cât mai eficiente. Pentru utilizare continuă, s-au studiat procedee de imobilizare a *E. coli* pe poliuretani, polietilenimine, fibre de sticlă, agar sau carageenan. S-a studiat de asemenea sinteza într-o singură etapă a aspartamului cu celule de *Pseudomonas putida* suspendate într-o soluție de fumarat acid de amoniu și L-Phe-OMe [3.42].

Cealaltă materie primă cheie în sinteza aspartamului poate fi obținută printr-o adădire similară principal de amoniac la acid trans-cinamic, catalizată de fenilalanin amoniac-liază [3.45-3.49]. Procesul a fost comercializat de Genex dar abandonat în favoarea obținerii L-fenilalaninei prin fermentație. Comercializarea procesului a fost împiedecată de conversiile reduse (70%), de stabilitatea redusă a enzimei și de inhibiția cauzată de reactant.

$\beta$ -Metilaspataza din *Clostridium tetanomorphus* catalizează conversia acidului mesaconic cu amoniac, cu formarea acidului (2S,3S)-3-metilaspatic. Ea catalizează de asemenea adădirea amoniacului la acid halo- și metiltiofumaric, cu formare de acizi aspartici 3-substituiți cu configurație (2R, 3S) (figura 3.14) [3.50].

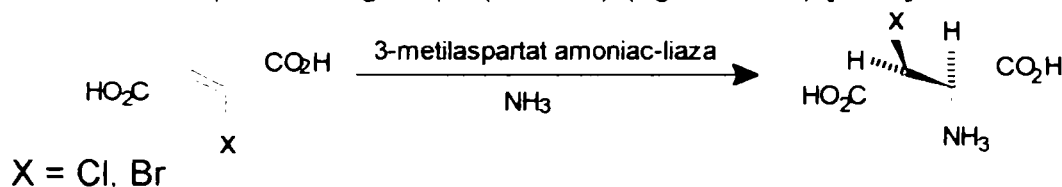


Figura 3.14. Sinteza (2R, 3S)- $\beta$ -haloaspartaților cu  $\beta$ -metilaspatază

#### 3.2.1.2.4. Alte liaze

Sinteza de L-aminoacizi prin formare de legături C-C este catalizată de o serie de liaze și transferaze piridoxal-fosfat dependente. Spre deosebire de cofactorii redox ca NAD(P)H, piridoxal-fosfatul este un cocatalizator adevărat, în sensul că el nu se consumă în proces.

Un exemplu de formare a legăturii C-C este sinteza L-tirozinei catalizată de  $\beta$ -tirozinază (nume sistematic tirozin fenol-liază) (figura 3.15). Similar se obține și 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-dopa) din pirocatechină, piruvat și amoniac. Se utilizează  $\beta$ -tirozinază din *Escherichia intermedia* imobilizată prin legare covalentă de Sheparose activată cu BrCN sau celule întregi de *E. intermedia* imobilizate prin entrapare în gel de poli-acrilamidă sau celule de *Erwinia herbicola* imobilizate prin reticulare cu glutaraldehidă sau legare de  $\kappa$ -carrageenan [3.44].

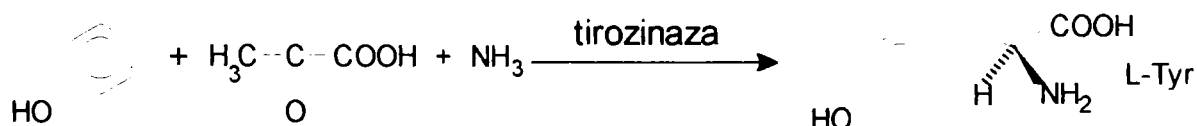


Figura 3.15. Sinteza L-tirozinei din fenol, piruvat și amoniac cu tirozinază

Alte exemple relevante din punct de vedere comercial sunt prezentate în figura 3.16. L-Triptofanul se poate obține din indol, piruvat și amoniac cu triptofanază (L-triptofan indol-liază). Enzima a fost imobilizată prin legare covalentă de Sheparose activată cu BrCN [3.44]. L-Trp se poate obține și din indol și L-serină cu triptofan sintază purificată din *E. coli* imobilizată prin entrapare în triacetat de celuloză într-un proces continu sau celule întregi de *E. coli* imobilizate în gel de acrilamidă. În același fel se

obține 5-hidroxitriptofan din 5-hidroxiindol și L-Ser [3.44]. Se pare totuși că este mai economică producerea L-triptofanului și a L-tirozinei prin fermentație.

Utilizând un extract brut de serină hidroximetil transferază (E.C. 2.1.2.1) din *Klebsiela aerogenes*, reacția glicinei cu formaldehida duce la L-serină (concentrație 450 g/l, productivitate 9 g/l-h). L-Treonin acetaldehid amoniac-liaza (TAL) catalizează sinteza L-treoninei din acetaldehidă și glicină.

Enzime ca O-acetilhomoserin sulfhidraza (O-acetil-homoserin (tiol)-liaza), cistationin  $\gamma$ -liaza și metionin  $\gamma$ -liaza catalizează sinteza și degradarea L-homocisteinei și derivaților ei S-substituiți. Astfel, metionin  $\gamma$ -liaza catalizează reacții de  $\alpha,\gamma$ -eliminare (1) (transformarea L-metioninei în metilmercaptan,  $\alpha$ -cetoglutarat și amoniac),  $\gamma$ -substituție la derivații de homocisteină (2), reacții de  $\alpha,\beta$ -eliminare (3) și  $\beta$ -substituție (4) la derivații de cisteină și reacții de dezaminare (5) și  $\gamma$ -adiție la vinilglicină (2-amino-3-butenolat) (figura 3.17) [3.51].

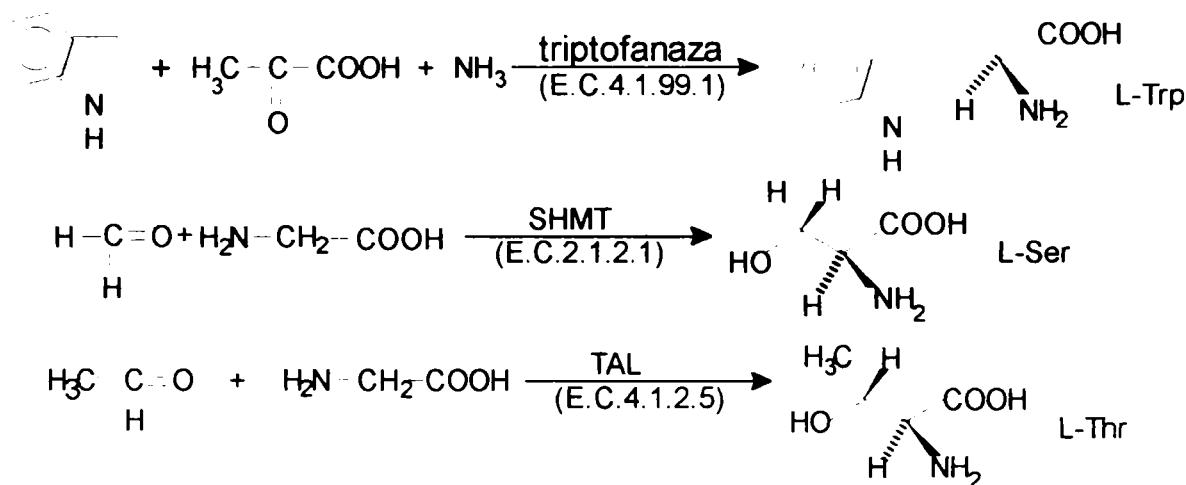


Figura 3.16 Sinteza L-Trp, L-Ser și L-Thr cu triptofanază, serin hidroximetil transferază (SHMT) și respectiv L-treonin acetaldehid amoniac-liază (TAL)

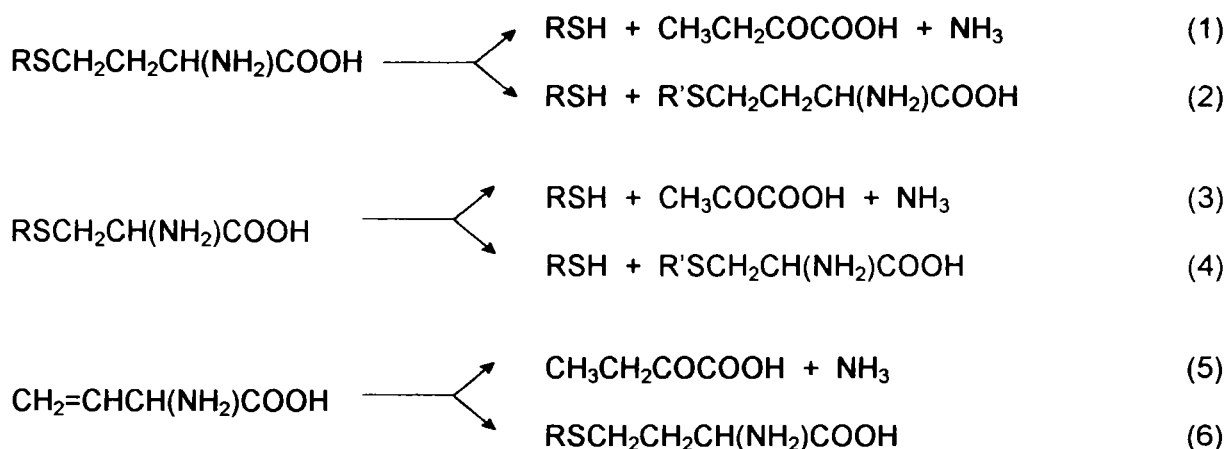


Figura 3.17. Transformări catalizate de L-metionin  $\gamma$ -liază

### 3.2.1.2.5. Aminoacizi optic activi prin biotransformarea unor precursori racemici sau chirali

În figura 3.18 se prezintă un exemplu elegant de deracemizare enzimatică a unui aminoacid racemic utilizând o combinație de patru enzime [3.52]. Deși astfel de sisteme

multienzimatice nu au încă un status comercial, utilizarea lor în combinație cu bioreactoarele membrană pare să aibă un potențial industrial real.

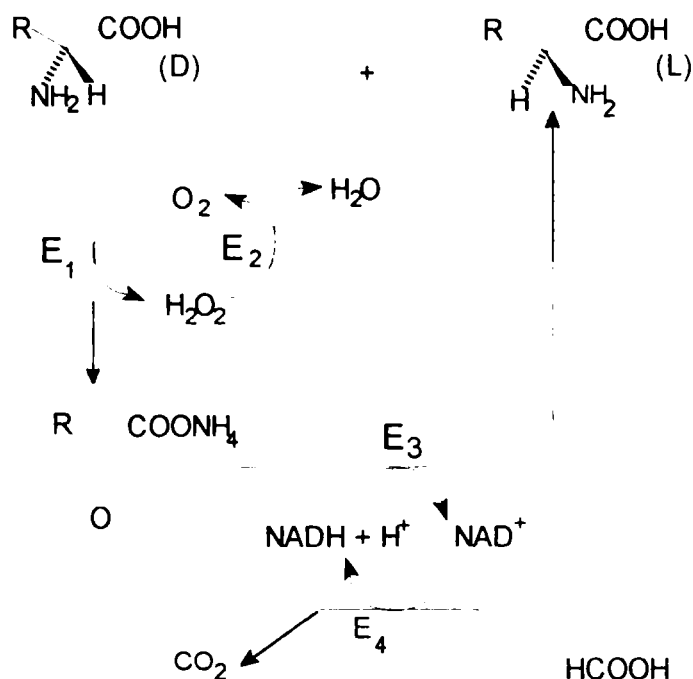


Figura 3.18. Deracemizarea enzimatică a unor aminoacizi (Ala, Leu, Met)

- E<sub>1</sub> = D-aminoacid oxidază (E.C. 1.4.3.3.),
- E<sub>2</sub> = catalază (E.C. 1.11.1.6),
- E<sub>3</sub> = leucin dehidrogenază (E.C. 1.4.1.9),
- E<sub>4</sub> = formiat dehidrogenază (E.C. 1.2.1.2)

Aminoacizi optic activi pot fi obținuți de asemenea prin transformarea enzimatică a altor aminoacizi optic activi. Astfel, L-alanina se poate obține prin decarboxilarea acidului L-aspartic catalizată de aspartat β-decarboxilază (E.C. 4.1.1.12), o enzimă piridoxal-fosfat dependentă. În procesul industrial operat de Tanabe [3.44], celule întregi de *Pseudomonas dacunhae* imobilizate pe κ-carrageenan sunt utilizate pentru producerea de L-alanină (concentrație 4 g/l) într-un reactor coloană operat continuu și sub presiune (10 kg/cm<sup>2</sup>), când CO<sub>2</sub> eliminat în proces este dizolvat (figura 3.19). Acesta este un exemplu de utilizare a unui substrat ieftin și accesibil din bazinul chiral.

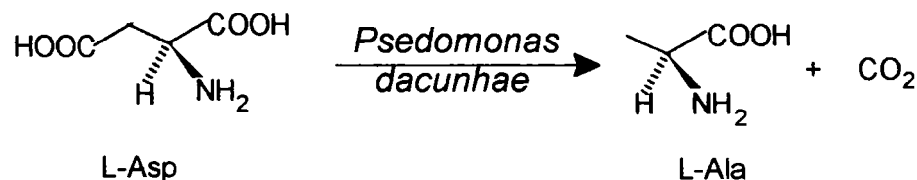


Figura 3.19. Sinteza L-Ala din L-Asp cu o aspartat β-decarboxilază din *Pseudomonas dacunhae*

Firma Tanabe a industrializat în 1982 producția continuă de L-Ala direct din acid fumaric și amoniac cu celule imobilizate de *E. coli* și *Pseudomonas dacunhae*. Se pare că aceasta este prima aplicare industrială a unei secvențe de reacții enzimatică catalizate de celule imobilizate din două microorganisme diferite.

### 3.2.2. Aminoacizi optic activi prin sinteză chimică asimetrică

Conversia materiilor prime prochirale în compuși optic activi se poate face prin transformare cu un reactiv sau mediu (solvent) chiral. Metodele care utilizează reactivi chirali în cantități catalitice (sinteza asimetrică catalitică) sunt atractive din punct de vedere economic deoarece necesită reactivi chirali, relativ scumpi, în cantități mici.

Sinteza asimetrică prezintă importanță mai ales în cazul unor aminoacizi nenaturali care nu se pot obține prin metode biocatalitice. Deci, metoda este importantă numai în cazurile în care aminoacidul este prețios iar reactivul chiral nu este scump sau se poate regenera cu menținerea activității catalitice.

Sinteza chimică enantioselectivă a aminoacizilor se poate face prin mai multe metode [3.5, 3.6, 3.53, 3.54]: hidrogenarea catalitică asimetrică a derivaților de dehidroaminoacizi, aminarea nucleofilă sau electrofilă a derivaților acizilor carboxilici, alchilarea nucleofilă sau electrofilă a derivaților de glicine, etc.

Dezvoltarea catalizatorilor de hidrogenare asimetrică pe bază de complecși de rodium cu fosfine chirale drept liganzi chirali (catalizatori Wilkinson) reprezintă unul dintre momentele de referință în cataliza asimetrică omogenă. La sfârșitul anilor '60 s-au pus la punct atât catalizatorii de hidrogenare (catalizatorii Wilkinson), cât și metodele de sinteză a fosfinelor chirale (Horner și Milsow). Hidrogenarea asimetrică a olefinelor prochirale este cea mai studiată tehnologie de sinteză asimetrică.

Prima tehnologie pusă la punct în acest domeniu este hidrogenarea asimetrică a derivaților de dehidroaminoacizi. Monsanto a elaborat procesul pentru L-dopa, medicament utilizat pe scară largă la tratarea bolii Parkinson, prin hidrogenarea asimetrică a acidului acetamidoacrilic substituit, catalizată de un complex cationic al Rh(I) conținând o fosfină bidentată chirală și 1,5-ciclooctadienă ca liganzi, în condiții de reacție moderate și cu enantioselectivități mari ( $ee > 90\%$ ) [3.8, 3.20, 3.26] (figura 3.20). Similar, fenilalanina se obține prin conversia acidului  $\alpha$ -acetamidocinamic sau alanina din acidul  $\alpha$ -acetamidocrotonic. Activitățile catalitice cele mai mari s-au obținut pentru complecșii cationici ai Rh(I), utilizând anioni ca  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$  sau  $\text{PF}_6^-$ .

Ligandul (modificatorul chiral) atașat de catalizator (metal) are capacitatea de a discrimina între fețele enantiotopice ale substratului prochiral. Catalizatorul chiral reacționează cu viteze diferite cu cele două fețe enantiotopice ale olefinei prochirale, formând două stări de tranziție diastereomere diferite energetic. Enantioselectivitatea este determinată de diferența de energie liberă a acestor două stări de tranziție diastereomere, o diferență de 3 kcal/mol fiind suficient de mare pentru a da un  $ee > 99\%$ . Enantioselectivitatea este determinantă în prima etapă ireversibilă implicând stări de tranziție diastereomere. Identificarea acestei etape reprezintă cheia în proiectarea unor catalizatori (liganzi) eficienți. Ceea ce se întâmplă după etapa enantioselectivă are influență asupra altor caracteristici ale reacției, dar nu asupra enantioselectivității. O condiție necesară pentru un enantiocontrol bun este ca substratul și catalizatorul să fie legate rigid. Acest fapt este facilitat de existența situsului de legare secundar din substrat (conform modelului de legare în trei puncte), care servește la orientarea acestuia într-o dispunere unică vis-à-vis de chiralitatea catalizatorului.

Fosfinele bidentate chirale coordinate de ioni metalici tranziționali (Ru, Rh, Pd) formează inele chelatice variind în mărime de la 5 pentru 1,2-difosfine (ex. DIPAMP, CHIRAPHOS) la 7 pentru 1,4-difosfine (ex. DIOP, DINAP). O caracteristică comună a acestor complecși chelatici este aranjarea celor patru inele benzenice într-o ordine "muchie-față" alternantă, așa cum se vede pentru Rh-CHIRAPHOS (figura 3.21).

$$\begin{array}{ccc}
 \begin{array}{c} \text{R} \\ | \\ \text{COOH} \\ | \\ \text{NHCOR} \end{array} & \xrightarrow[\text{Rh(COD)(P-P)X}]{\text{H}_2} & \begin{array}{c} \text{R} \\ | \\ \text{COOH} \\ | \\ \text{H} \\ | \\ \text{NHCOR} \end{array}
 \end{array}$$

X BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, etc;      P-P = difosfină chirală

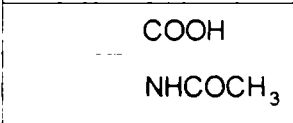
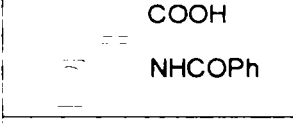
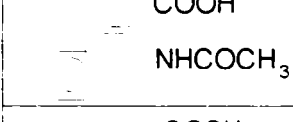
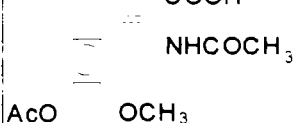
Substrat	Difosfine chirale ee (%)					
	DIPAMP	DIOP	CHIRAPHOS	BPPM	PYRPHOS	Ph-β-Glup
	94	73	91	98	-	98
	96	64	99	-	-	-
	95	81	89	91	99	97
	94	84	83	86	97	94

Figura 3.20. Hidrogenarea asimetrică a derivaților de dehidroaminoacizi

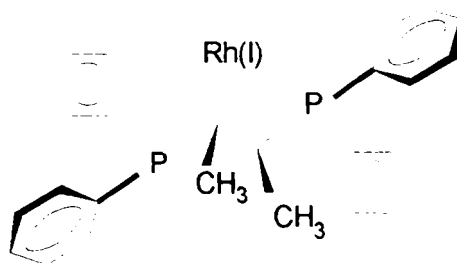


Figura 3.21. Structura Rh(I) CHIRAPHOS

Enantioselectivitatea rezultă prin legarea substratului prochiral (olefinei) de acest edificiu chiral. Enantiomerul obținut preferențial este cel derivat din complexul catalizator-substrat în care substituenții voluminoși ai substratului se află în fața unui inel benzenic din catalizator expus cu fața și nu cu muchia. Foarte multe difosfine chirale au o simetrie C<sub>2</sub>. Deși aceasta nu este o condiție necesară pentru o enantioselectivitate eficientă, o caracteristică a acestor liganzi cu simetrie C<sub>2</sub> este că atunci când se leagă de metal, substratul întâlnește același mediu chiral, oricare ar fi partea din care se apropie.

Otsuka și Tani [3.55] și Noyori [3.56] au studiat caracteristicile structurale deosebite ale BINAP, o difosfină cu asimetrie axială, ceea ce o face un ligand foarte eficient. O caracteristică este aceea că modificările conformaționale în inelul chelatic nu pot determina o așezare achirală a celor patru grupe atașate de atomii de fosfor. Aceasta contrastează cu o altă 1,4-difosfină, DIOP, în care flexibilitatea conformațională în inelul chelatic de șapte atomi poate duce la o pierdere a chiralității (figura 3.22). BINAP poate complexa un mare număr de metale tranziționale, formând inele chelatice de șapte atomi, stabile conformațional. Acest complex metallic conținând un ligand mare, pliabil, poate fi comparat cu o enzimă.



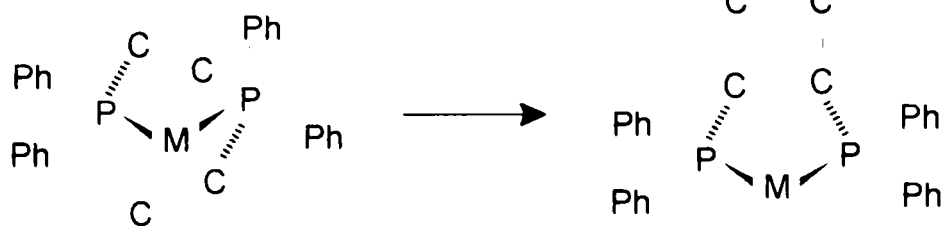


Figura 3.22. Pierderea chiralității prin modificări conformaționale în complexul metal-DIOP

Enantioselectivități mari, în condiții moderate, se obțin numai pentru diastereomerii Z ai acidului acetamidoacrilic substituit, ceea ce se explică prin legarea secundară a atomului de oxigen din gruparea acetamido de atomul de rodium (figura 3.23).

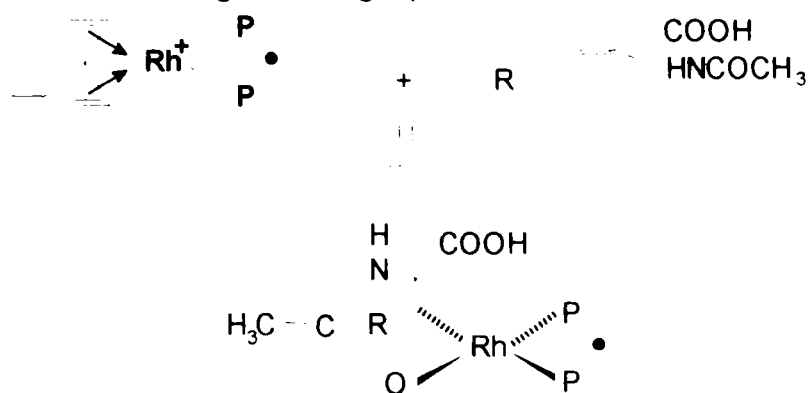


Figura 3.23. Hidrogenarea asimetrică a derivaților de dehidroaminoacizi

Mecanismul de reacție a fost elucidat de Halpern și colab. [3.26]. Este un exemplu interesant de control al produsului asupra enantioselectivității, implicând o intersecție a profilului de reacție al celor doi enantiomeri. Stereochimia produsului este controlată de diastereomerul minoritar al complexului catalizator-substrat. Adiția oxidativă a hidrogenului la acesta este prima etapă ireversibilă și deci etapa de enantiocontrol în proces.

În cazul dehidroaminoacizilor, diastereomerul minor (cel mai puțin stabil) reacționează mult mai repede cu hidrogenul. Vitezele și enantioselectivitățile reacției sunt determinate de viteza de adiție oxidativă a hidrogenului și prezintă o dependență complexă de presiunea și temperatura acestuia.

Un dezavantaj inerent al catalizatorilor omogeni în comparație cu cei eterogeni este problema recuperării și recirculării acestora. Liganzii fosfinici bidentați se obțin din materii prime relativ ieftine, în general accesibile în bazinul chiral. Mulți sunt accesibili comercial, cel puțin în cantități mici. Sunt, totuși, scumpi, și adesea costă per kilogram tot atât ca și metalele nobile pe care le coordonează. De aceea, o condiție pentru viabilitatea lor comercială este numărul de transformare mare (de preferință >10.000).

O metodă prin care se poate rezolva problema recuperării și recirculării este atașarea catalizatorului pe un suport insolubil, similar cu imobilizarea enzimelor. O altă metodă este obținerea de catalizatori solubili în apă, prin introducerea de grupări funcționale polare sau ionizabile (sulfat, carboxilat, tetraalchilamoniu). Complecșii cu rodium ai tri(3-sulfonatoetil)fosfinei sunt solubili în apă și pot cataliza reacții în sisteme apos-organice bifazice. Catalizatorul din faza apoasă poate fi ușor separat de produsul din faza organică și apoi recirculat.

Problema serioasă care rămâne încă de rezolvat este sinteza în condiții avantajoase a dehidroaminoacizilor corespunzători [3.5].

### 3.3. Obținerea aminoacizilor optic activi prin rezoluția racemaților

Rezoluția racemaților constituie principala metodă pentru prepararea compușilor optic activi.

Metodele de rezoluție se împart în două categorii:

- separare directă
- separare prin transformare chimică

La rândul lor acestea pot fi împărțite în mai multe grupe:

- separarea directă poate fi:
  - separare mecanică
  - rezoluție prin antrenare
  - cristalizare din solvenți optic activi
- separarea prin transformare chimică poate fi:
  - rezoluția diastereomerilor
    - covalenți
    - ionici (săruri diastereoizomere)
  - rezoluție cinetică
    - chimică
    - enzimatică

Alegerea metodei este în mare măsură determinată de existența a trei tipuri de racemați solizi:

- *conglomerate* – amestecuri mecanice de cristale ale celor doi enantiomeri puri;
- *compuși racemici* – doi enantiomeri prezenți într-un aranjament bine definit în rețeaua cristalină, adică o fază solidă omogenă a doi enantiomeri care coexistă în aceeași unitate celulară;
- *pseudoracemați* – soluția solidă a doi enantiomeri care coexistă într-o structură dezordonată în cristal.

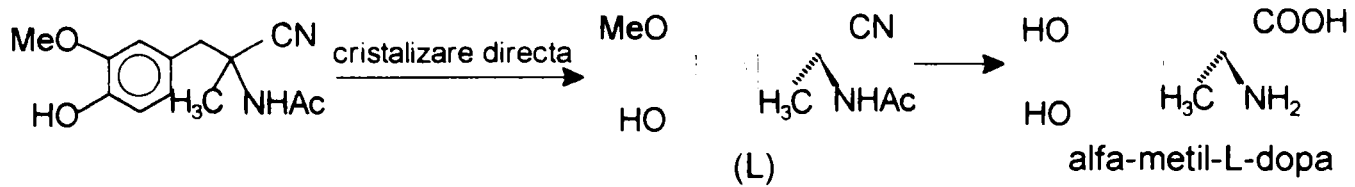
#### 3.3.1. Rezoluția prin cristalizare

##### 3.3.1.1. Rezoluția racemaților prin cristalizare directă

Tehnicile de rezoluție prin cristalizare sunt studiate în cazul aminoacizilor mai mult decât în orice alt domeniu.

Cristalizarea directă este utilizată mult la rezoluții pe scară industrială, de exemplu în fabricarea  $\alpha$ -metil-dopa sau a cloramfenicolului [3.57, 3.58]. Ea este posibilă numai cu conglomerate și depinde de diagrama punctului de topire și diagrama de solubilitate. Adică metoda este utilă numai dacă amestecul racemic are o solubilitate mai mare decât componentele sale.

Una dintre variantele metodei operează astfel: o soluție suprasaturată de racemat se trece simultan prin două camere de cristalizare care conțin cristale de însămânțare pentru enantiomerii respectivi. După separarea precipitatelor, soluțiile se resaturează la cald la nivelul de suprasaturare inițial și se reintroduc în camerele de cristalizare. Prin acest procedeu se obțin ambii enantiomeri. Firma Merck rezolvă prin această metodă unul dintre intermediarii pentru  $\alpha$ -metil-dopa (antihipertensiv) la o scară de sute de tone pe an (figura 3.24) [3.58].


 Figura 3.24. Rezoluția  $\alpha$ -metil-dopa prin cristalizare directă

Rezoluția prin antrenare este posibilă numai la conglomerate și depinde de diferența de viteză de cristalizare a enantiomerilor din soluțiile suprasaturate. Prin însămânțarea cu cristalele unui enantiomer se poate realiza o cristalizare selectivă. Condițiile sunt în general dificil de realizat, randamentele la o singură trecere adesea mici, dar, cu toate acestea, au fost realizate și separări la scară industrială, ca de exemplu  $\alpha$ -metil-L-dopa.

Metoda de cristalizare directă a fost utilizată și la rezoluția acidului glutamic (în anii '60 Ajinomoto opera la o scară de peste 10.000 tone/an), concurând mulți ani metoda fermentativă. Glutamina, asparagina și acidul aspartic se mai separă în acest fel.

### 3.3.1.2. Cristalizarea directă a sărurilor cu acizi sau baze achirale

Șansa ca un racemat să fie conglomerat este de numai 10%. Dacă însă se transformă în sare cu baze sau acizi achirali, șansa ca racematul să fie conglomerat crește. În principiu, toți  $\alpha$ -aminoacizii naturali pot fi rezolvați prin cristalizare preferențială, ca atare sau sub formă de săruri. Astfel, DL-dopa poate fi rezolvată prin cristalizarea preferențială a clorhidratului său. Similar, DL-lizina poate fi separată prin cristalizare ca p-aminobenzensulfonat (figura 3.25) [3.26].

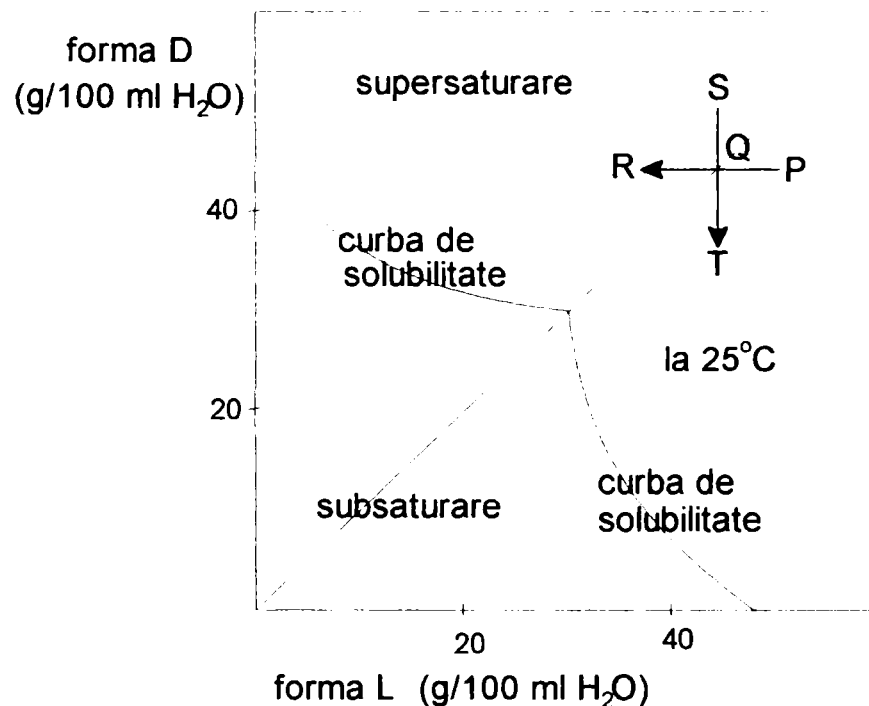


Figura 3.25. Diagrama de fază pentru rezoluția reciprocă a p-aminobenzensulfonatului de D- și L-lizină

O soluție de compoziție P conținând un exces de aminobenzensulfonat de L-Lys aflată la o temperatură ridicată este răcită la 25°C și însămânțată cu L-cristale. Pe măsură ce L-izomerul cristalizează, compoziția soluției se modifică de la Q la R. Se filtrează cristalele izomerului L. Apoi se dizolvă în soluția mămă, prin încălzire, o cantitate de racemat egală cu cea a izomerului L separat. Compoziția soluției se modifică de la R la S. Răcirea soluției la 25°C și însămânțarea cu izomerul D duce la cristalizarea acestuia, compoziția soluției modificându-se la T. Filtrarea cristalelor D urmată de introducerea de racemat proaspăt readuce compoziția în punctul P. Ciclul se reia, cu obținerea ambilor stereoizomeri. Purițea optică se poate mări prin recristalizare din solventul în care s-a făcut rezoluția până la 98-99%.

Lizina mai poate fi separată și prin cristalizarea directă a sării cu acid 3,5-dinitrozobenzoic. Fenilglicina se poate separa prin cristalizarea preferențială a sării de 1,1,3,3-tetrametilbutilamoniu a N-formil-DL-fenilglicinei din soluție alcoolică, cu purități optice de până la 97% [3.59]. Într-o manieră similară se separă și L-tirozina din sarea de diciohexilamoniu a N-formil-DL-tirozinei [3.60]. Prin cristalizare preferențială se mai pot separa m-xilen-4-sulfonatul de DL-serină, p-hidroxibenzensulfonatul de DL-triptofan, metansulfonatul de DL-6-clortriptofan, o-toluen-sulfonatul de DL-p-hidroxi-fenilglicină [3.61, 3.62].

### 3.3.1.3. Transformarea asimetrică a racemaților indusă prin cristalizare

Rezoluția prin antrenare este o metodă eficientă în condițiile racemizării spontane, care permite obținerea unui randament teoretic de 100%. Un astfel de proces de transformare asimetrică indusă prin cristalizare poate avea loc fie cu racemați fie cu amestecuri diastereomere. În primul caz procesul se numește deracemizare. Racemizarea *in situ* poate fi indusă catalitic. În cazul aminoacizilor, racemizarea poate fi indusă cu cantități catalitice de aldehide, prin formarea reversibilă a unei baze Schiff (figura 3.26) [3.63, 3.64].

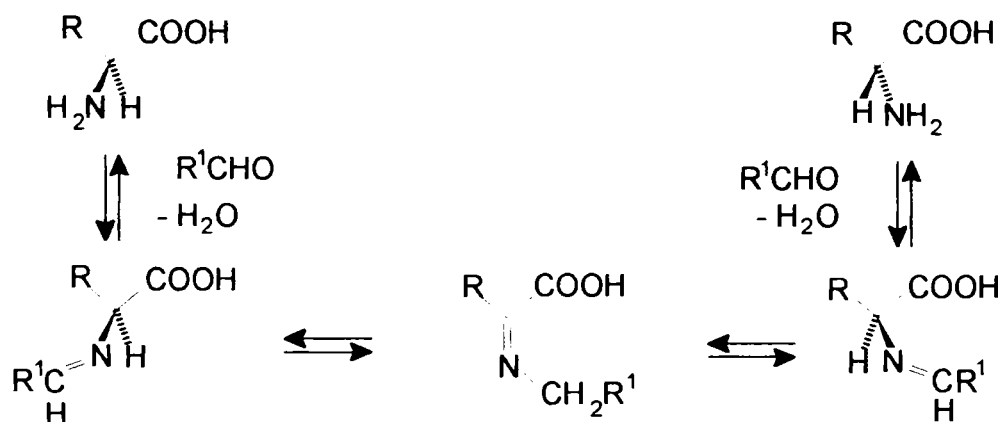
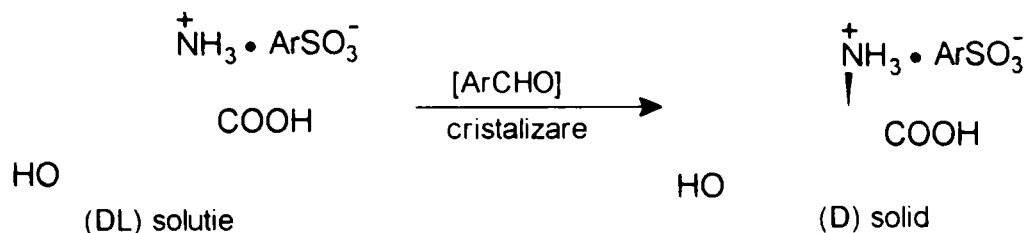


Figura 3.26. Racemizarea aminoacizilor catalizată de aldehide

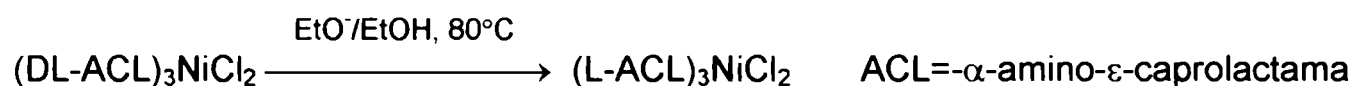
Racemizarea prin formarea de baze Schiff merge ușor în cazul esterilor benzilici ai aminoacizilor. Metoda a fost utilizată la separarea p-hidroxi-fenilglicinei prin cristalizarea preferențială a sării cu acizi sulfonici aromatici [3.8]. Astfel, însămânțarea unei soluții suprasaturate a arensulfonatului de DL-p-hidroxi-fenilglicină conținând cantități catalitice dintr-o aldehydă a dus la cristalizarea preferențială a izomerului D. Soluția mămă a fost inactivă optic, dovadă că a avut loc racemizarea *in situ* (figura 3.27):


 Figura 3.27. Obținerea D-para-hidroxi-fenilglicinei din racemic prin racemizare *in situ*

Se pare însă că această metodă nu a putut concura cu un alte procese comerciale pentru p-hidroxi-fenilglicină (cristalizarea sărurilor diastereomere, rezoluția enzimatică), probabil din cauza productivității scăzute.

În același mod s-a reușit și transformarea p-clorbenzensulfonatului de DL-alanină în L cu randamente acceptabile și puritate optică de 97% [3.61].

Într-o altă variantă, complexul cu nichel al L- $\alpha$ -amino- $\epsilon$ -caprolactamei (intermediar pentru sinteza L-lizinei) cristalizează selectiv din soluție alcoolică suprasaturată, proces însoțit de racemizare spontană în prezență de etoxid [3.65].

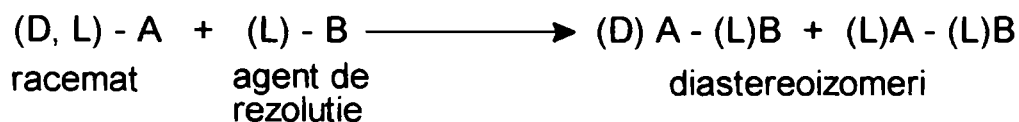


#### 3.3.1.4. Rezoluția prin cristalizarea diastereomerilor

Derivatizarea unui racemat cu un compus optic activ duce la formarea unui amestec de diastereomeri cu proprietăți fizice diferite care pot fi separați prin metode fizice (ex. cristalizare). Dacă se obțin săruri diastereomere, agentul de rezoluție poate fi ușor recuperat și recirculat. Deși metoda este foarte veche (a fost utilizată și de Pasteur) și deși are o imagine de "low-tech", este încă și astăzi cea mai utilizată metodă de rezoluție. Diastereomerii covalenți sunt o variantă alternativă tot mai utilizată pe măsură ce devin accesibili tot mai mulți agenți de rezoluție.

Aminoacizii se separă fie cu acizi fie cu baze chirale, atât naturale cât și sintetice. În general, ei au aciditate sau bazicitate prea mică pentru a se folosi ca atare. De obicei se reface fie bazicitatea (prin esterificarea grupei carboxil) fie aciditatea (prin acilarea grupării amino cu grupări formil, acetil, benzoil, fenoxiacetil, benziloxicarbonil, *tert*-butiloxicarbonil etc.). Eliminarea acestor grupări trebuie să se facă cât mai ușor, pentru a evita racemizarea ulterioară.

Ca agenți de rezoluție, naturali sau sintetici, se pot utiliza acizi optic activi (acid tartric și derivații săi diacilați, acid malic, acizi camfor-sulfonici, acid mandelic, acid fenoxipropionic, dar și N-acetil-L-leucină, N-acetil-L-3,5-dibromtirozină) sau baze optic active (alcaloizii naturali: chinina, chinidina, cinconina, cinconidina, brucina, stricnina, dar și efedrina, deoxiefedrina, amfetamina, metilbenzilamina și alți intermediari de sinteză) [3.26].



Un exemplu reprezentativ de separare la scară industrială prin rezoluție clasică este procesul Océ-Andeno de obținere a D-(-)-fenilglicinei folosind ca agent de rezoluție acidul camfor-sulfonic optic activ [3.26] (figura 3.28).



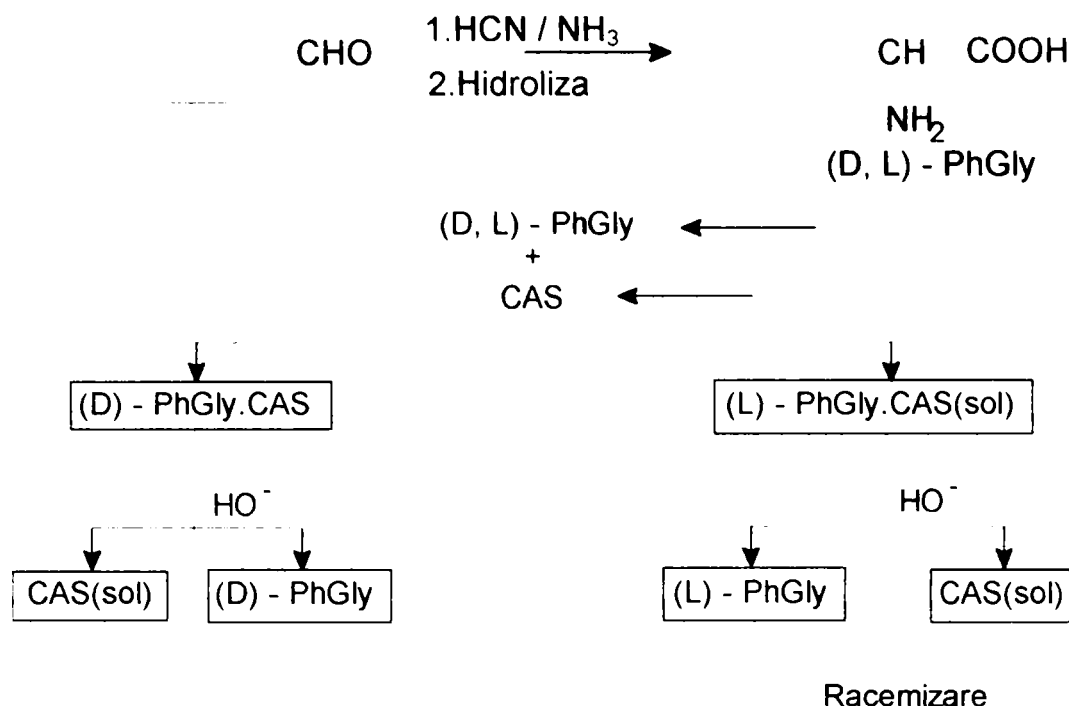


Figura 3.28. Obținerea D-(-)-fenilglicinei (D-PhGly) prin rezoluție clasică cu acid camfor-sulfonic (CAS)

În continuare vor fi prezentate alte câteva exemple. Astfel, histidina a fost separată cu acid tartric [3.66], acidul glutamic cu histidină [3.67], acizii  $\beta$ -hidroxiaspartici diastereomeri cu lizină (pentru *treo*) și cu ornitină (pentru *eritro*) [3.68].

Derivații N-substituiți ai aminoacizilor au fost separați cu baze: de exemplu N-benzoil- $\beta$ -hidroxivalina, O-benzil-N-formilserina și O-benzil-N-carbobenzoxiserina cu  $\alpha$ -metilbenzilamină [3.69], N-acetilriptofanul cu lizină [3.70], iar N-tosilserina cu *treo*-2-amino-1-(p-nitrofenil)-1,3-propandiol [3.71]. N-benziloxycarbonil-derivații de prolină, alanină, izoleucină, S-benzilcisteină au fost separați cu tirozinhidrazidă [3.72, 3.73].

Carboxi-derivații aminoacizilor au fost separați cu acizi chirali, de exemplu esterul terț-butilic al fenilalaninei cu n-benziloxycarbonilfenilalanină [3.74], O-metilserinamida cu acid tartric [3.75], iar metioninamida cu acid piroglutamic [3.76].

### 3.3.1.5. Transformarea asimetrică a sărurilor diastereomere

Randamentul teoretic la o singură trecere al rezoluției via cristalizarea diastereomerilor este de maxim 50% și, în general, enantiomerul nedorit trebuie racemizat și recirculat, pentru ca procesul să fie viabil din punct de vedere economic. Randamente de peste 50% sunt totuși posibile dacă cristalizarea are loc în condițiile în care diastereomerul rămas în soluție suferă o epimerizare spontană. Această transformare asimetrică a unui amestec diastereomer indusă prin cristalizare permite randamente teoretice de 100%, proces analog cu transformarea asimetrică a racemaților indusă prin cristalizare.

Aminoacizii, ca și aminele, sunt susceptibili de racemizare prin formarea unei baze Schiff intermediare în prezența catalitică a unor compuși carbonilici. Practic, procesul implică racemizarea unei mici cantități de aminoacid liber din soluție.

De exemplu, transformarea asimetrică a sării de DL-p-hidroxifenilglicină cu săruri arensulfonice achirale își are echivalentul său în transformarea asimetrică a sărurilor diastereomere ale DL-p-hidroxifenilglicinei cu acid (+)-1-feniletansulfonic (PES) (figura 3.29). Sarea cu (+)-PES a aminoacidului a fost obținută cu un randament de 85% față

de DL-p-hidroxifenilglicină, dacă cristalizarea a avut loc în prezența unor cantități catalitice de salicilaldehidă și acid acetic [3.77].

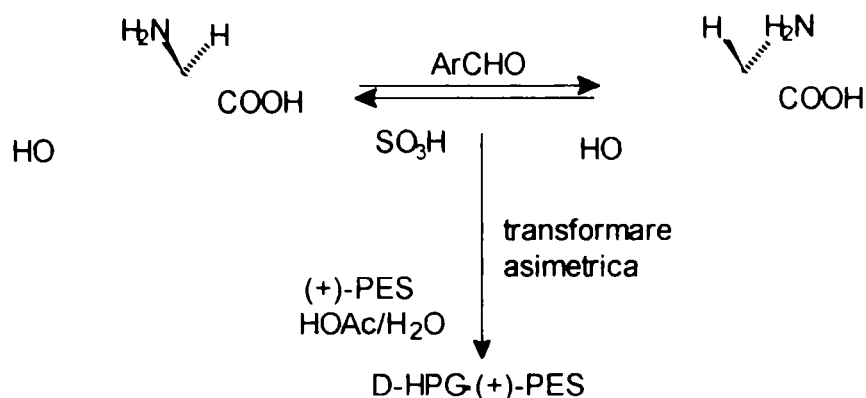
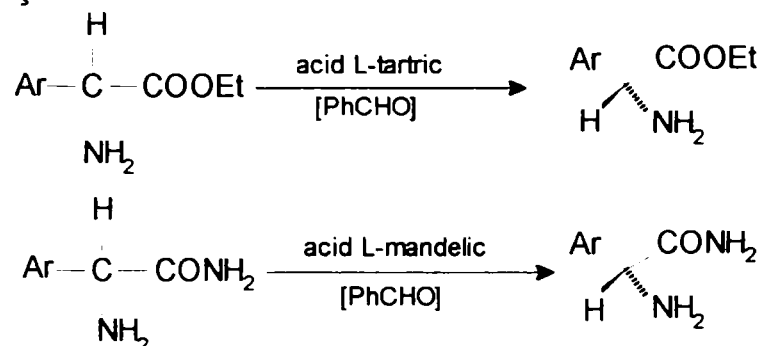


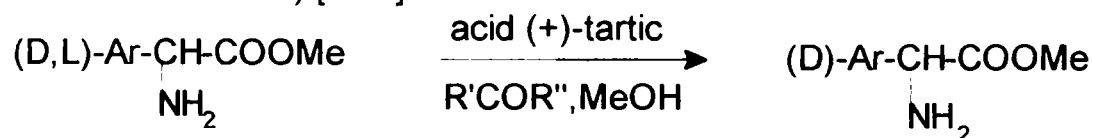
Figura 3.29. Transformarea asimetrică indusă prin cristalizare a sării p-hidroxifenilglicinei (HPG) cu acid (+)-feniletansulfonic (PES)

Literatura menționează transformarea asimetrică și în cazul unor săruri diastereomere de amide sau esteri [3.78] de aminoacizi, în prezența unor cantități catalitice de compuși carbonilici:



Sinteza eficientă a D-fenilglicinei și D-p-hidroxifenilglicinei prin transformarea asimetrică a sărurilor diastereomere ale amidelor corespunzătoare cu, de exemplu, acid L-mandelic, pare să fie atractivă din punct de vedere economic [3.68].

Ca transformare asimetrică indusă prin cristalizare poate fi menționată rezoluția unei serii de esteri de aril-glicine cu acid tartric în prezența unui compus carbonilic (benzaldehida sau acetona) [3.79].



Pentru mulți aminoacizi proteinogeni obținuți pe scară mare prin fermentație, izomerul L este adesea mai ieftin decât racematul. În astfel de cazuri interconversia diastereomerului poate fi utilizată în convertirea enantiomerului L mai ușor accesibil în enantiomerul D. Un astfel de exemplu este sinteza D-prolinei din L-prolină [3.80].

Astfel, încălzind cantități echimoleculare de acid L-tartric și L-prolină la 85°C, în prezența a 10% n-butiraldehidă în acid n-butiric, urmată de răcire în gheață, se depun cristale de L-tartrat de D-prolină cu un randament de 93-95% și puritate optică de 93-95%. Recristalizarea ulterioară din apă-etanol duce la obținerea de D-prolină optic pură cu un randament global de 85%.

### 3.3.2. Aminoacizi optic activi prin rezoluție cinetică enzimatică

Rezoluția cinetică se bazează pe vitezele de reacție diferite ale celor doi enantiomeri ai unui racemat cu un reactant optic activ. Când reacția nu este totală are loc o rezoluție parțială a racematului.



Raportul enantiomeric E este o măsură a eficienței rezoluției, fiind legat de excesul enantiomeric al reactantului recuperat ( $ee_R$ ) și al produsului ( $ee_P$ ), la o conversie dată (c), prin ecuațiile [3.81]:

$$E = \ln[(1-c)(1-ee_R)] / \ln[(1-c)(1+ee_R)]$$

$$E = \ln[1-c(1-ee_P)] / \ln[1-c(1+ee_P)]$$

În practică, se consideră a fi atractive comercial procesele care au valori ale lui E de peste 20, ceea ce corespunde de exemplu la un  $ee$  de cca 98% și la o conversie de 50-60%. Un dezavantaj al rezoluției cinetice este faptul că are loc transformarea doar a unuia dintre enantiomeri, deci randamentul maxim este de 50%. Este necesară racemizarea enantiomerului nedorit și reintroducerea sa în proces.

Pentru a obține o eficiență ridicată, reactantul optic activ se utilizează în cantități catalitice. Acesta poate fi o enzimă (rezoluție cinetică enzimatică) sau un catalizator chimic simplu (rezoluție cinetică chimică). În multe rezoluții enzimatică vitezele de reacție ale celor doi enantiomeri sunt foarte diferite, având loc practic o rezoluție enantiospecifică.

**Rezoluția cinetică chimică**, înalt selectivă, a fost studiată folosind catalizatori chirali simpli. Astfel, s-a încercat hidroliza stereospecifică a esterilor de aminoacizi cu derivați ai dipeptidelor ca nucleofili conținând un rest histidinic [3.82, 3.83], când s-a obținut o îmbogățire în enantiomerul L de 2-8 ori.

Catalizatorii polimerici de tip poli-L-lizină sau complexul de Cu(II) al poli-DL-lizinei au fost folosiți în reacția de oxidare stereospecifică a dopa (3,4-dihidroxifenilalanina) sau hidroliza esterilor fenilalaninei, observându-se viteze de reacție diferite corespunzătoare celor doi enantiomeri [3.84].

**Rezoluția cinetică enzimatică**, cu aplicații mult mai numeroase, va fi descrisă în continuare. Sintezele enzimatică de aminoacizi pot fi efectuate fie cu enzime pure, fie cu preparate celulare microbiene, animale sau vegetale.

Reacțiile chimice de obținere a aminoacizilor optic activi care utilizează biocatalizatori pot fi clasificate în două mari tipuri de biotransformări:

- rezoluția enzimatică a derivaților aminoacizilor racemici;
- reacțiile de formare a legăturilor asimetrice din substraturi prochirale, utilizând sisteme enzimatică (capitol 3.2.1.2).

Enzimele hidrolitice sunt foarte potrivite pentru rezoluția cinetică a derivaților de aminoacizi racemici, metodă care are numeroase aplicații industriale [3.4, 3.5, 3.6, 3.9, 3.13, 3.26, 3.51].

Cea mai bună clasificare este în funcție de legătura scindată prin cataliză enzimatică. Astfel, hidroliza enzimatică a derivaților aminoacizilor racemici se poate realiza cu esteraze, amidaze, acilaze, hidantoinaze, nitrilaze.

Sinteza enzimatică a aminoacizilor cu enzime proteolitice utilizează enzime capabile să hidrolizeze atât legăturile amidice cât și pe cele esterice, având deci rolul de amidaze și esteraze. În acest scop se folosesc atât amino- și carboxipeptidaze cât și proteinaze de natură microbiană (subtilizinele, termolizina), vegetală (papaina, bromelaina) sau animală ( $\alpha$ -chimotripsina, tripsina, etc).

Un dezavantaj al metodei este specificitatea de substrat adesea limitată a enzimei. Deoarece majoritatea enzimelor sunt selective față de enantiomerul L, s-au căutat enzime D-selective. Astăzi enzima nu mai este o problemă deoarece, pe lângă sursele naturale, vegetale, animale și microbiene, sunt accesibile și enzime obținute în mod curent prin secvențiere, clonare și expresie. Prin mutații direcționate au devenit accesibile enzime cu proprietăți îmbunătățite, de exemplu cu termostabilitate ridicată.

### 3.3.2.1. Esteraze

Enzimele proteolitice hidrolizează enantioselectiv esterii de N-acil aminoacizi.

În afara enzimelor proteolitice, la separarea racemaților pentru obținerea aminoacizilor optic puri au fost folosite și lipaze și esteraza din ficat de porc, fără a se ajunge încă la aplicații industriale ale acestor procese.

#### 3.3.2.1.1. Subtilizine

Subtilizinele, proteinaze alcaline obținute din diferite tulpini de *Bacillus subtilis* (Carlsberg, NOVO, BPN'), au fost utilizate în hidroliza enantiospecifică a esterilor de aminoacizi acilați în soluții apoase, dar cu performanțe slabe.

Firma Bayer a pus la punct o metodă de obținere a D-aril-glicinelor (catene laterale ale penicinelor și cefalosporinelor de semisinteză) prin hidroliză stereospecifică cu subtilizină immobilizată în sistemul bifazic apă-solvent organic (figura 3.30) [3.85].

Procedeul utilizează un sistem bifazic. Esterul metilic al N-acetil-DL-fenilglicinei, puțin solubil în apă, este dizolvat în faza organică (ex. metilizobutilcetonă). Forma L este hidrolizată în faza apoasă de către enzima immobilizată. Forma D a substratului rămâne nehidrolizată în faza organică.

Dacă se urmărește obținerea D-aminoacidului, atunci derivatul L-aminoacidului trebuie să fie complet hidrolizat. Dacă produsul util este L-aminoacidul, hidroliza enzimatică va fi oprită mai repede pentru a reduce reacțiile secundare.

Pentru a se atinge o puritate optică înaltă, procesul nu este condus la pH-ul optim de acțiune a enzimei, ci la pH 7, pentru a micșora cât mai mult hidroliza neenzimatică a esterilor. Aminoacizii liberi se obțin din derivații lor acilați prin hidroliză acidă (60-100°C, HCl 2N). Pentru a facilita îndepărtarea restului acil, se pot utiliza resturi formil, benziloxycarbonil (Z), etc.

Prin immobilizarea enzimei pe un suport polimeric, structura ei poate fi stabilizată și se poate preveni agregarea moleculelor de enzimă. Subtilizina poate fi immobilizată pe celuloză (activitate remanentă 27,2%), pe DEAE-celuloză (16,5% din activitatea inițială) sau pe poliacrilonitril (3,1% din activitatea inițială). Subtilizina immobilizată se poate utiliza în 75 de cicluri hidrolitice fără pierderea semnificativă a activității.

Se pot folosi și alți solvenți organici nemiscibili cu apa, cum sunt: clorură de metilen, cloroform, toluen, izobutanol, benzen sau acetat de etil. Subtilizina prezintă o stereospecificitate înaltă, dar o regioselectivitate relativ scăzută (tabelul 3.2).

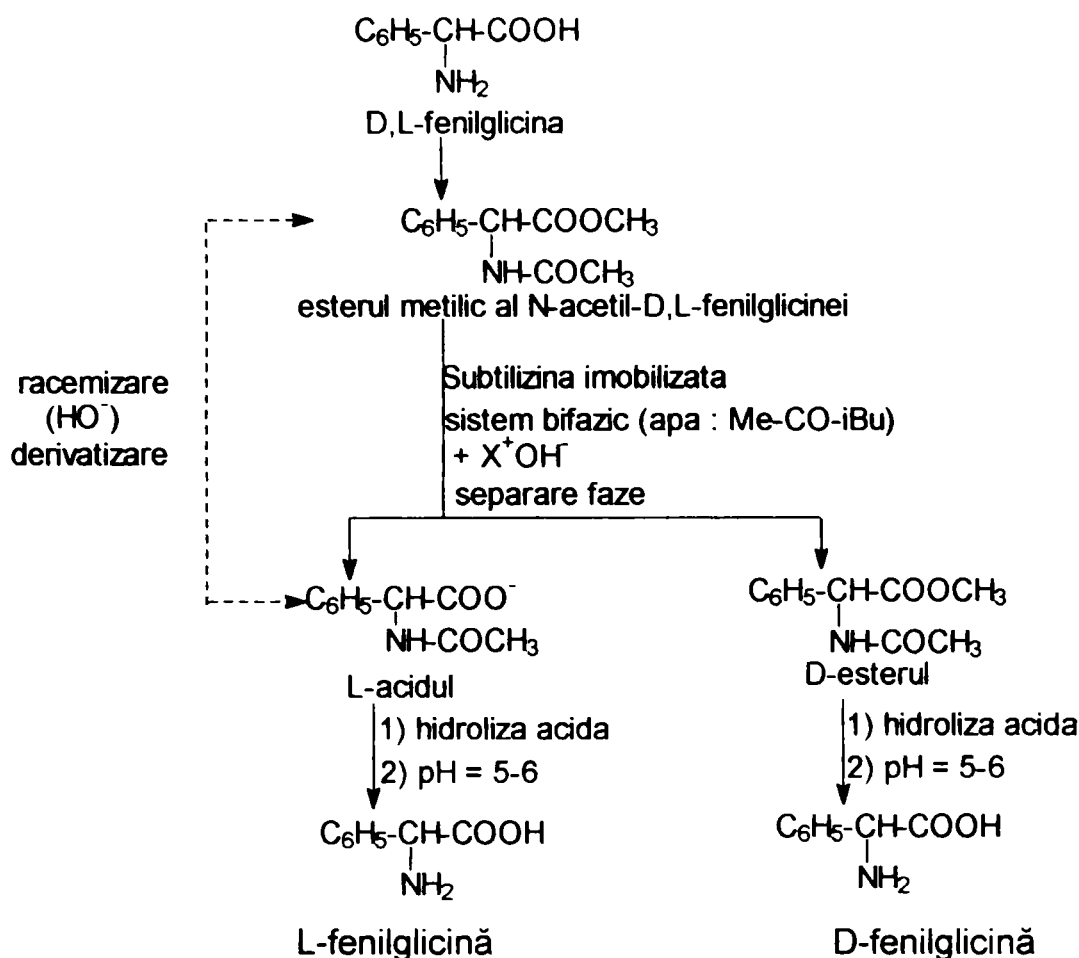


Figura 3.30. Obținerea D-fenilglicinei prin procedeul de hidroliză enzimatică cu subtilizina

Tabelul 3.2. Rezoluția derivaților de glicine  $\alpha$ -substituite racemice cu subtilizina imobilizată în sistem bifazic

DL- $\text{R}_1\text{-CH(NHR}_3\text{)-COOR}_2$			N-acil-L-acid		N-acil-D-ester		N-acil-D-acid	
$\text{R}_1$	$\text{R}_3$	$\text{R}_2$	$[\alpha]_{578}^{25}$		$[\alpha]_{578}^{25}$		$[\alpha]_{578}^{25}$	
			( $^\circ$ )	(%)	( $^\circ$ )	(%)	( $^\circ$ )	(%)
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-}$	$\text{-COCH}_3$	$\text{-CH}_3$	+219,3	97	-182,4	99	-165,9	91
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-}$	$\text{-CHO}$	$\text{-CH}_3$		97	-200,0	55	-165,9	91
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-}$	$\text{-COCH}_3$	$\text{-nC}_4\text{H}_9$		97	-129,0	100	-165,9	91
$\text{oCl-C}_6\text{H}_4\text{-}$	$\text{-CHO}$	$\text{-CH}_3$	+115,0	104	-130,0	95	-89,1	82
$\text{mCl-C}_6\text{H}_4\text{-}$	$\text{-COCH}_3$	$\text{-CH}_3$	+133,5	104	-131,0	98	-112,0	73
$\text{pCl-C}_6\text{H}_4\text{-}$	$\text{-COCH}_3$	$\text{-CH}_3$	+155,3	103	-155,8	75	-146,0	55
$\text{CH}_3\text{S-C}_6\text{H}_4\text{-}$	$\text{-COCH}_3$	$\text{-CH}_3$	+158,1	81	-163,4	87	-97,9	98
$\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-}$	$\text{-COCH}_3$	$\text{-CH}_3$			-198,4	85	-160,1	92
2-furil	$\text{-CHO}$	$\text{-CH}_3$	+207,0	79	-182,2	74	-102,7	61
2-furil	$\text{-BOC}$	$\text{-CH}_3$	+104,7	93	-81,4	102	-102,7	61
2-tienil	$\text{-CHO}$	$\text{-CH}_3$	+123,5	85	-114,6	102	-81,6	58
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-C}_2\text{H}_4\text{-}$	$\text{-CHO}$	$\text{-CH}_3$	+137,7	88	-22,8	106	-48,8	82
$\text{C}_6\text{H}_5\text{-C}_2\text{H}_4\text{-}$	$\text{-COCH}_3$	$\text{-CH}_3$	+95,7	108	-33,3	46	-56,7	51
2-furil	$\text{-CbZ}$	$\text{-CH}_3$	+65,3	75	-24,8	76	-102,7	61



Viteza hidrolizei enzimaticе a numeroși esterі ai arilglicinelor cu subtilizină depinde de poziția și natura substituenților în nucleul aromatic. Substituenții voluminoși cum este clorul, reduc viteza de reacție. Compușii orto-substituiți sunt hidrolizați mai lent decât cei meta- sau para-substituiți. Creșterea lungimii catenei dintre nucleul aromatic și carbonul chiral determină creșterea vitezei de reacție. În schimb, înlocuirea restului fenil cu restul piridil nu modifică viteza hidrolizei. În același timp, dacă hidrogenul din NH-acil este înlocuit cu radicalul metil, reacția practic nu are loc. În gruparea esterică, o creștere a lungimii catenei de la radicalul metil la radicalul n-butil duce la o reducere a vitezei de hidroliză. Enzima hidrolizează stereospecific și L-enantiomerul esterilor acil-glicinelor  $\alpha$ -substituite. Deși în unele reacții este similară cu  $\alpha$ -chimotripsina, subtilizina prezintă totuși o mai largă specificitate de substrat în hidroliza esterilor de aminoacizi. Astfel, ea hidrolizează regioselectiv esterii de acid L-aspartic și L-glutamic în poziția  $\alpha$ .

Subtilizina catalizează și reacții de sinteză de esterі, amide și peptide în procese de esterificare, transesterificare și peptizare în solvenți organici cu cantități reduse de apă (2-7%) (etanol, acetonă, acetonitril, nitrometan, carbonat de propilenă, THF, 1,4-dioxan, metanol, DMF) [3.86-3.89]. Subtilizina prezintă o solubilitate ridicată în unii solvenți (etanol) și își păstrează conformația activă în medii neapoase [3.90].

Deși s-au obținut randamente și purități optice mari, durata mare a proceselor nu le face încă eficiente la nivel industrial. Problema a fost rezolvată prin folosirea ca mediu de reacție a dioxidului de carbon supercritic, care este netoxic și ușor de îndepărtat, fiind un bun solvent pentru compușii hidrofobi și gaze, permițând un bun transfer de masă și viteze de difuzie mari [3.91].

Subtilizina catalizează în  $\text{CO}_2$  supercritic (45°C, 150 bari) transesterificarea esterului cloretilic al N-acetil-L-fenilalaninei cu etanol (0,5-5% v/v):

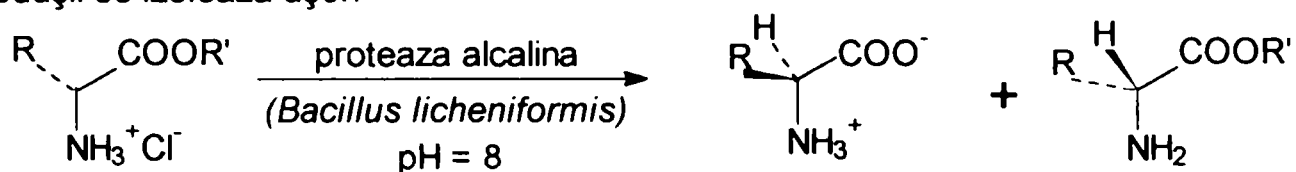


La concentrații de 2,5% etanol, timp de 30 minute, transformarea este completă iar recuperarea produsului și a substratului netransformat de peste 90%. Enzima prezintă o bună stabilitate termică în  $\text{CO}_2$  supercritic (viteza de reacție a crescut până la 80°C). Dezavantajul metodei constă în costul foarte ridicat al instalației care lucrează la presiune înaltă.

O variantă de rezoluție preparativă a esterilor aminoacizilor racemici utilizează proteaze alcaline industriale brute, așa cum este de exemplu Alcalase (conținând în principal subtilizină Carlsberg) [3.92-3.94]. După cum se prezintă în reacția următoare și tabelul 3.3, L-esterii metilici și benzilici sunt hidrolizați enantioselectiv. D-esterii nereacționați se separă cu purități mari.

Esterii benzilici sunt hidrolizați de trei ori mai repede decât esterii metilici corespunzători. Esterii Ala, Phe, Tyr prezentați în tabelul 3.3, precum și esterii Trp sunt hidrolizați mai rapid decât esterii Asp, Leu, Glu și Pro. Esterii Thr, Met și Ser sunt hidrolizați mult mai lent, iar cei ai Val, Arg, Ile, Lys, Cys și Hys nu sunt hidrolizați. Producătorii subliniază costul scăzut al enzimei (proteazele alcaline producându-se curent ca aditiv pentru detergenți, de exemplu de Novo Nordisk), stabilitatea lor la temperatură (temperatura optimă este 60°C) și la solvenți organici, ceea ce permite folosirea unor concentrații mai mari de substrat (0,5 M la 45°C). Substraturile se prepară ușor (nu necesită protecția grupării  $\text{NH}_2$  și nu se menționează peptizarea aminoacizilor),

reacția este înalt enantiospecifică în cazul unora dintre aminoacizi (Ala, Phe, Tyr, Trp), iar produșii se izolează ușor.



Tabelul 3.3. Hidroliza esterilor aminoacizilor cu proteză alcalină din *Bacillus licheniformis*

		Forma L		Forma D	
R	R'	$\eta$ (%)	ee (%)	$\eta$ (%)	ee (%)
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	Me	96	90	85	100
HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CH <sub>2</sub>	Me	95	91	86	100
Me	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	98	86	75	93

### 3.3.2.1.2. $\alpha$ -Chimotripsina

$\alpha$ -Chimotripsina este o serin-proteinază care catalizează hidroliza proteinelor alimentare în intestinul subțire. Este de asemenea un catalizator pentru hidroliza esterilor L-aminoacizilor sau a altor derivați ai acizilor carboxilici.

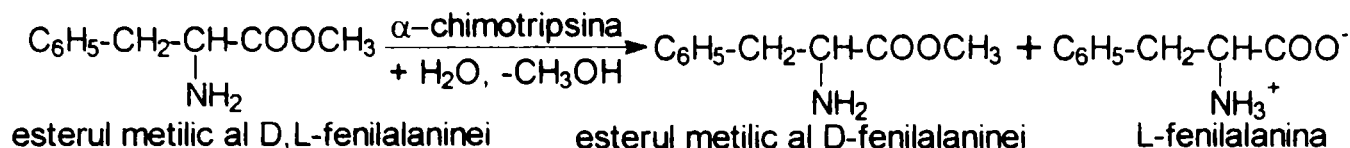
Este una dintre cele mai studiate enzime hidrolitice și multe aspecte ale mecanismului său de acțiune sunt cunoscute. Din experimentele lui M. L. Bender [3.95] se știe că  $\alpha$ -chimotripsina formează un intermediar acil-enzimă în timpul hidrolizei. Nucleofili, cum sunt grupările amino și hidroxil, pot intra în competiție cu apa pentru acceptarea radicalului acil. Ruta aminolitică este utilizată în sinteza de peptide [3.96-3.98]. Alcooliza și transesterificarea au fost studiate în vederea unor aplicații practice.

Rezoluția esterilor aminoacizilor cu  $\alpha$ -chimotripsină, ca și cu alte enzime, prezintă o serie de dezavantaje:

- Procesele chimice de sinteză a DL-aminoacizilor sunt relativ costisitoare.
- Esterii sunt instabili în soluții apoase, pierderea în puritate prin hidroliză necesitând precauții, relativ greu de evitat.
- În soluții apoase concentrate de esteri,  $\alpha$ -chimotripsina, ca și celelalte proteaze, catalizează formarea legăturilor peptidice între moleculele de aminoacizi, rezultând un polimer insolubil. Pentru a evita aceste reacții se blochează de obicei gruparea NH<sub>2</sub> prin acilare.
- Esterul D-aminoacidului nereacționat inhibă activitatea  $\alpha$ -chimotripsinei. Prin urmare, activitatea enzimei în soluții concentrate de DL-ester este scăzută.
- Practic, un proces de rezoluție cere recircularea D-esterului nereacționat după racemizare.

În ultimele două decenii s-au pus la punct procedee de obținere a  $\alpha$ -aminoacizilor care depășesc aceste dificultăți inerente ale rezoluției esterilor.

Un procedeu utilizează esterul metilic al DL-fenilalaninei care este supus hidrolizei cu  $\alpha$ -chimotripsină [3.99]:



Fixarea enzimei are loc printr-o încapsulare sub formă de emulsie a soluției sale apoase într-o membrană lichidă corespunzătoare. Practic, soluția apoasă enzimatică se emulsionează în membrană și se dispersează în soluția hidrofilă substrat/produs.

Pentru a evita scăderea activității enzimatice datorită denaturării enzimei și a inhibiției de substrat și produs prin acumularea acestora în faza interioară, se utilizează un „carrier”. Acesta transportă substratul și produsul prin membrană, deoarece solubilitatea substratului și a produsului, ca și selectivitatea acestora în membrană sunt scăzute. Membrane stabile se obțin folosind ciclohexan sau kerosen cu 5% SPAN 80, iar ca și carrier un schimbător de ioni, Adogen 464.

Varianta tehnologică a firmei Stauffer pentru obținerea L-fenilalaninei folosește un sistem bifazic apă-solvent organic (apă-toluen), faza organică fiind folosită ca rezervor pentru esterul aminoacidului și ca protecție pentru hidroliza nespecifică, dat fiind faptul că esterii aminoacizilor sunt mai puțin solubili în apă și solubili în solvenți organici (figura 3.31) [3.100].

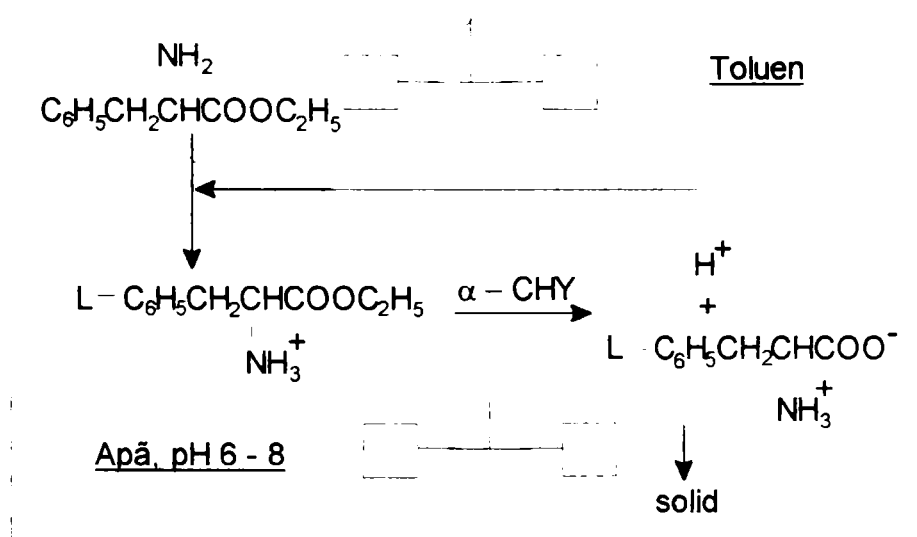


Figura 3.31. Sistem de reacții în două faze pentru rezoluția esterului etilic al fenilalaninei catalizată de  $\alpha$ -chimotoripsină

Solventul organic cel mai potrivit este toluenul, deoarece esterul DL-Phe-OEt are un coeficient de repartiție apă-toluen scăzut, iar  $\alpha$ -chimotoripsina prezintă o bună stabilitate în prezența acestuia.

Pe măsură ce L-esterul se consumă, alte cantități de ester trec din toluen în faza apoasă, datorită deplasării echilibrului de repartiție al esterului între toluen și apă. Deoarece solubilitatea L-fenilalaninei în apă la 25°C este numai de 0,2 M (soluția toluenică are conținutul în ester de 1 M), aceasta precipită în faza apoasă în timpul desfășurării reacției. Se obține L-fenilalanină cu 90% ee.

$\alpha$ -Chimotoripsina nu prezintă o specificitate de substrat înaltă – se pot hidroliza proteine, peptide, amide și esteri de aminoacizi. Enzima hidrolizează un mare număr de esteri de aminoacizi acilați, naturali și nenaturali. Substraturi bune sunt derivații de aminoacizi aromatici, inclusiv cei substituiți pe nucleu cu halogeni și hidroxil, dar și cei

avînd o catenă alifatică, funcționalizată sau nu. Sunt tolerate în  $\alpha$  grupările metil, alchenil și chiar nitro. Dacă în  $\alpha$  este o grupare nitro sau dacă între gruparea esterică și centrul stereogenic este interpusă o grupare metilenică, diferențierea enantimerică se inversează, fiind hidrolizat esterul D [3.101].

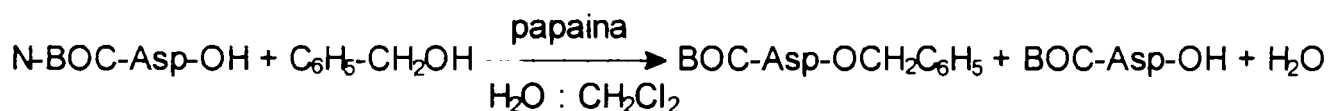
În afara reacțiilor de hidroliză a esterilor aminoacizilor, în ultimii ani s-au efectuat numeroase studii privind reacțiile de esterificare, transesterificare și sinteze de peptide cu chimotripsină în medii de solvenți organici [3.102-3.111].

### 3.3.2.1.3. Papaina

Papaina, o tiol-proteinază din *Carica papaya*, este o enzimă accesibilă comercial, ieftină și cu specificitate largă de substrat. Aceasta catalizează reacțiile de hidroliză a esterilor, amidelor, peptidelor, dar și reacțiile sintetice de esterificare, transesterificare, amidare, peptizare.

Papaina catalizează esterificarea stereospecifică a unui număr mare de N-terț-butiloxycarbonil-DL-aminoacizi în sistem bifazic [3.112-3.116].

Echilibrul este deplasat prin trecerea esterului format în faza organică ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):



În cazul acidului glutamic și acidului aspartic, este esterificată numai gruparea carboxilică din poziția  $\alpha$  [3.112]. Aminoacizii încărcăți steric ca valina, izoleucina și treonina se esterifică cu randamente scăzute, iar pentru lizină, arginină și histidină nu au fost găsite condițiile optime de esterificare.

Randamentul reacției de esterificare stereospecifică depinde de raportul  $d = V_{\text{org}} / V_{\text{ap}}$  al volumului fazei organice și fazei apoase. Acest raport variază între 17 pentru aminoacizii hidrofilii: acidul glutamic și aspartic, și 0,3 pentru cei hidrofobi: fenilalanină, leucină, triptofan, metionină.

Papaina catalizează esterificări cu alcooli monohidroxicili primari  $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{OH}$  ( $n = 2-10$ ), dioli, alcool alilic, etanolamină, etc. [3.113].

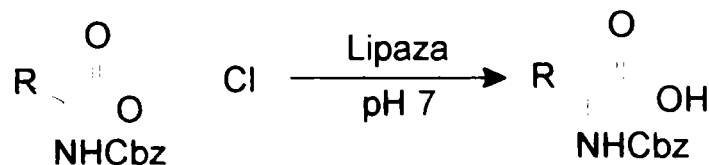
Rezultate bune s-au obținut folosind papaina imobilizată pe polimetacrilat de metil reticulat sau Sepharose [3.114, 3.115]. Suportul relativ hidrofob de polimetacrilat de metil (XAD-7) este potrivit pentru substraturi hidrofobe (alanina), în timp ce suportul hidrofil de Sepharose este adecvat substraturilor mai hidrofile (acidul aspartic).

Papaina este una din cele mai eficiente proteinaze pentru reacțiile stereospecifice de obținere a aminoacizilor optic activi și a derivaților lor.

### 3.3.2.1.4. Lipaze

Lipazele (triacilglicerol acil-hidrolazele, E.C. 3.1.1.3) constituie un grup de enzime mult utilizate drept catalizatori în sinteza organică, deoarece sunt ușor accesibile, ieftine și stabile și, ca toate enzimele hidrolitice, nu necesită cofactor.

2-Cloretil esterii N-benziloxycarbonilaminoacizilor sunt hidrolizați enantiospecific de diferite lipaze din *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Candida cylindracea*, cu ee de 85-96% (tabel 3.4) [3.117]. Dintre cele trei enzime studiate, cea mai mare specificitate de substrat și enantioselectivitate o prezintă lipaza din *Aspergillus niger*.



Tabel 3.4. Hidroliza cloretilesterilor aminoacizilor N-substituiți cu lipază

R	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Candida cylindracea</i>	
	% conv	% ee	% conv	% ee	% conv	% ee
Me	36	89	48	16	38	7
Et	40	96	49	52	36	7
n-Pr	27	86	43	58		
n-Bu	32	85	52	60	42	30
n-Pent	44	95	25	80	27	66
n-Hex	31	94	47	87		
i-Pr	14	92	8	53		
CH <sub>2</sub> =CH-CH <sub>2</sub> -	34	86	40	52	31	27
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -CH <sub>2</sub> -	32	94	12	57	35	63

De asemenea, lipaza din pancreas de porc (PPL) hidrolizează regio- și enantioselectiv esterii aspartici și glutamici N-protejați [3.118].

Sunt hidrolizați doar esterii de L-aminoacizi și doar la gruparea esterică din  $\alpha$  față de gruparea amino. Grupările protectoare voluminoase reduc viteza de hidroliză. Aminoacizii neprotejați hidrolizează neselectiv. Metoda prezintă interes pentru că se aplică la aminoacizii dicarboxilici (hidrolizați de un număr relativ mic de enzime) cât și pentru că lipaza pancreatică este foarte ieftină (de  $10^6$  ori mai ieftină ca esteraza din ficat de porc și de  $10^4$  ori mai ieftină ca  $\alpha$ -chimotripsina, la aceeași activitate standard).

### 3.3.2.1.5. Esteraza din ficat de porc

Esteraza din ficat de porc (PLE) hidrolizează stereospecific diesterii. Astfel, diesterul N-benziloxycarbonil-prolinei este hidrolizat cu ee de 100% la monoesterul optic pur care este transformat apoi în esterul corespunzător al R-Pro [3.119]. Compusul este util ca sinton chiral pentru alcaloizii pirolidinici sau pentru unele antibiotice.

Similar a fost obținut acidul  $\alpha$ -aminoglutaric optic activ, un precursor pentru antibioticele  $\beta$ -lactamice, din esterul dialchilic corespunzător, cu esterază imobilizată [3.38].

Principalele dezavantaje ale metodelor bazate pe L-esteraze sunt necesitatea protejării grupării amino pentru evitarea ciclizării (la dicetopiperazine) și hidroliza chimică slabă a substratului în condițiile reacției enzimaticе.

### 3.3.2.2. Amidaze

Randamentul ridicat al preparării  $\alpha$ -aminonitrililor prin metoda Strecker și apoi a amidelor racemice ale  $\alpha$ -aminoacizilor a făcut ca varianta de sinteză a L- $\alpha$ -aminoacizilor prin hidroliza enantiospecifică cu amidaze și aminopeptidaze să fie deosebit de



eficientă. La DSM, metoda a fost aplicată sinteza a numeroși L- și D-aminoacizi (figura 3.32) [3.38, 3.120, 3.121].

Hidroliza fenilglicinei a fost realizată cu o aminopeptidază L-specifică din *Pseudomonas putida*, obținându-se L-fenilglicină și D-fenilglicinamidă cu randamente cantitative. Preparatul enzimatic brut prezintă o stereoselectivitate de practic 100% la hidroliza L-amidei la L-aminoacid, la concentrații de substrat de până la 20% (procente masă). Peste această concentrație apare inhibiția de produs. D-amida nehidrolizată se separă prin formarea unei baze Schiff cu benzaldehidă, complet insolubilă în apă. După hidroliza acidă la 100°C se obține D-aminoacidul, fără racemizare. Baza Schiff poate racemiza în condiții blânde, ceea ce permite recircularea amidei și obținerea unui randament de 100%. Procesul poate fi condus către obținerea ambilor enantiomeri.

D-fenilglicina este componentul util folosit în producerea ampicilinei cu o mare cerere pe piața mondială. Izomerul L, nedorit, este racemizat, esterificat la ester metilic, supus aminolizei cu formare de DL-fenilglicină și apoi este reintrodus în proces.

Amida aminoacidului trebuie să conțină un atom de hidrogen în poziția  $\alpha$ , iar gruparea amino trebuie să fie liberă pentru a putea fi substrat pentru aminopeptidaza din *Pseudomonas putida*. Pe această cale s-au obținut și Ala, Val, Leu, aminoacizi aromatici, Pro, Met. Nu se pot obține însă nici aminoacizi N-alchilați și nici aminoacizi  $\alpha$ -substituiți. Prin urmare  $\alpha$ -aminoacizii  $\alpha$ -substituiți cu aplicații largi (analogi de peptide bioactive: neuropeptide, encefaline) nu se pot separa prin această metodă. Din datele de literatură rezultă că rezoluția lor este dificilă din cauza încărcării sterice.

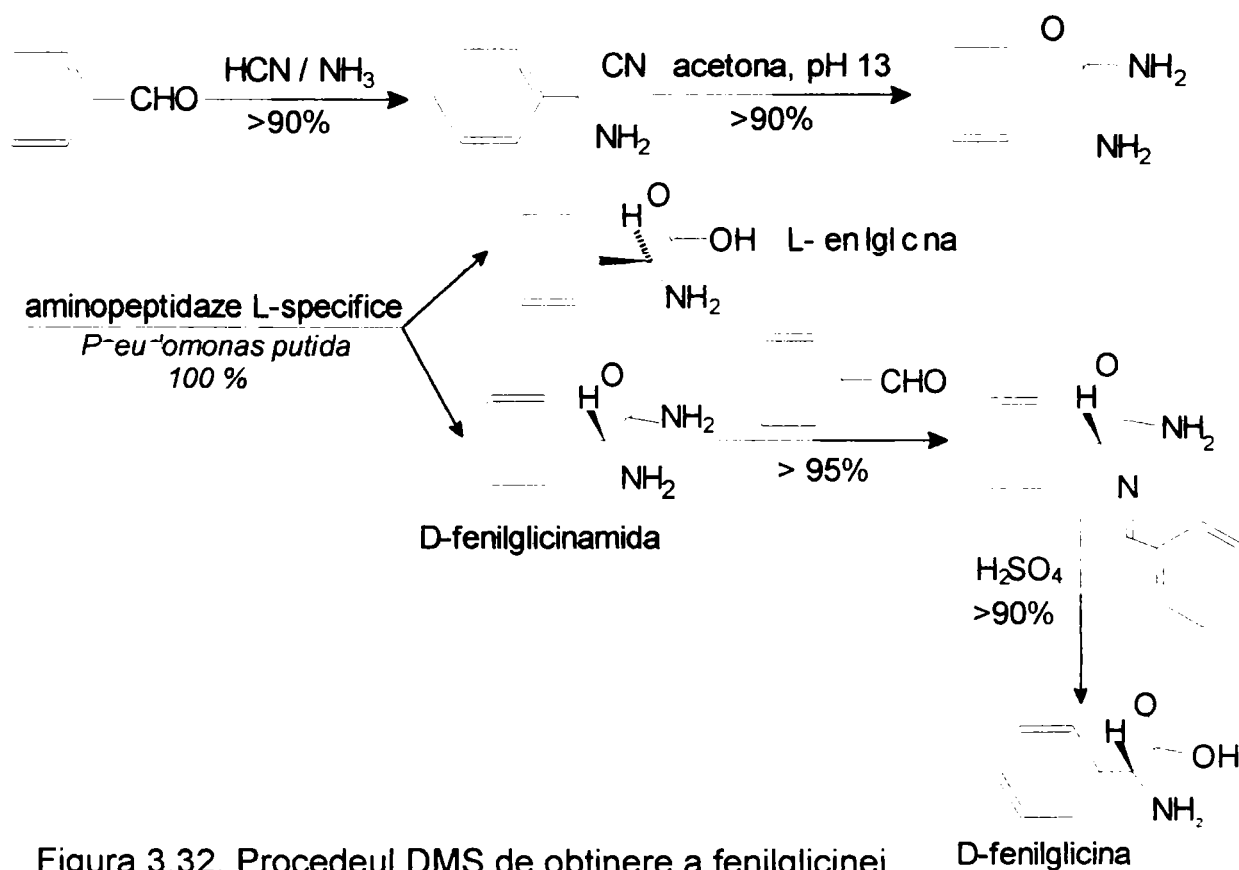


Figura 3.32. Procedul DMS de obținere a fenilglicinei

În schimb, celule întregi de *Micobacterium neoaurum* cu activitate aminopeptidazică hidrolizează de asemenea o serie de amide de aminoacizi  $\alpha$ -substituiți în apă la 37°C. Acidul și amida se separă pe baza diferenței de solubilitate în

apă sau solvenți organici (cloroform) (tabel 3.5)[3.122]. Se pot obține ambii enantiomeri. Selectivitatea enzimei este foarte mare (>98% ee), specificitatea de substrat largă.

O amidază D-specifică din *Ochrobacterium anthropi* catalizează aminoliza unor esteri de aminoacizi racemici (ex. DL-Ala-OMe), în solvenți aprotici, la R-amida corespunzătoare (de exemplu alanin-3-pentilamida, randament 45%, ee 99%) [3.123].

Pot fi hidrolizate enzimatic și amide ciclice. Exemplul cel mai cunoscut este producția biocatalitică de L-lizină din DL- $\alpha$ -amino- $\epsilon$ -caprolactamă [3.124]. Procesul se bazează pe o combinație de două reacții enzimatiche: hidroliza enantiospecifică a L- $\alpha$ -amino- $\epsilon$ -caprolactamei la L-lizină și racemizarea simultană a a D în enantiomerul L- $\alpha$ -amino- $\epsilon$ -caprolactamei. L-lizina se obține cu randamente practic cantitative incubând racematul cu celule microbiene de *Cryptococcus laurentii* cu activitate a L- $\alpha$ -amino- $\epsilon$ -caprolactamază și celule de *Achromobacter obae* cu activitate - $\alpha$ -amino- $\epsilon$ -caprolactamracemază.

Tabel 3.5. Hidroliza unor amide cu *Micobacterium neoaurum*

$\begin{array}{c} R_1R_2C-CONH_2 \\   \\ NH_2 \end{array}$	
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-	CH <sub>3</sub> -
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -	CH <sub>3</sub> -
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -
pMeO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -CH <sub>2</sub> -	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -

### 3.3.2.3. Acilaze

Dintre numeroasele metode de rezoluție optică, metoda enzimatică cu ajutorul acilazelor este una dintre cele mai eficiente procedee de obținere a aminoacizilor optic puri.

Acilaza I (aminoacilaza, N-acilaminoacid amidohidrolaza) izolată din rinichi de porc sau fungi de tip *Aspergillus* catalizează hidroliza enantioselectivă a N-acil-L-aminoacizilor (figura 3.33):

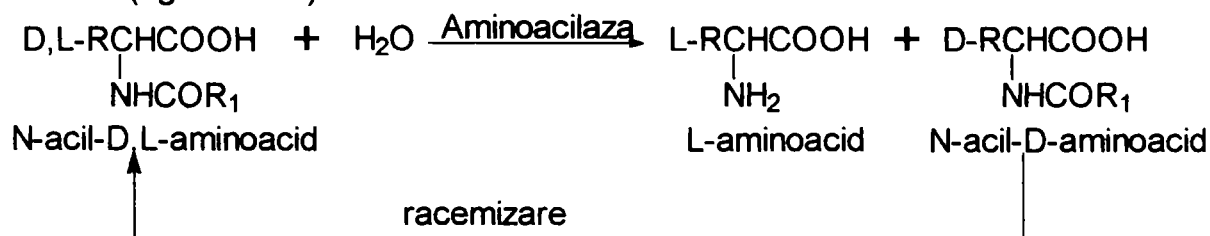


Figura 3.33. Hidroliza enantiospecifică a aminoacizilor acilați cu aminoacilază

Ambii produși sunt ușor separabili datorită diferenței lor de solubilitate. Acil-D-aminoacidul nehidrolizat este racemizat și reintrodus în proces.

Greenstein și colab. au studiat acilaza I din rinichi de porc [3.125-3.127] iar Chibata și colab. aminoacilaza din *Aspergillus oryzae* [3.3, 3.44]. Aceștia din urmă au realizat prima instalație industrială din lume pentru un proces biocatalitic, în 1969 în Japonia, și anume de obținere de L-aminoacizi cu aminoacilază imobilizată pe DEAE-Sephadex într-un reactor tip coloană cu funcționare continuă. L-aminoacidul se separă prin concentrare. Acil-D-aminoacidul este racemizat și reintrodus în coloană. Costurile acestui proces sunt cu 40% mai scăzute decât cele ale unui proces similar discontinuu, cu enzimă solubilă.

Pentru a crește eficiența metodei de rezoluție optică a DL-aminoacizilor s-a utilizat aminoacilază imobilizată. Aminoacilaze imobilizate, relativ active și stabile, au fost obținute prin legare ionică pe DEAE-Sephadex, legare covalentă pe iodacetil-celuloză, înglobare în gel de poli(acrilamidă).

O variantă a acestui proces este aplicată în Germania de firma Degussa [3.29] și utilizează un reactor membrană cu enzimă solubilă, separată cu o membrană de ultrafiltrare de substrat și produs. Varianta permite timpi spațiali mari (neexistând limitări difuzionale), concentrații mari de enzimă, deși are unele dezavantaje față de reactoarele tip coloană: cost mai mare al reactorului, necesitatea filtrării prealabile a substratului, stabilitatea mai scăzută a enzimei în soluție, etc.

Whitesides și colab. [3.128] au utilizat o metodă practică de cataliză enzimatică. Ei fixează enzima în membrane de dializă comerciale (membrane-enclosed enzymatic catalysis, MEEC). Metoda combină avantajele enzimelor solubile cu cele ale enzimelor imobilizate. Ei au efectuat rezoluția DL-N-cloroacetil- $\alpha$ -metil-metioninei cu acilaza I prin această metodă (figura 3.34):

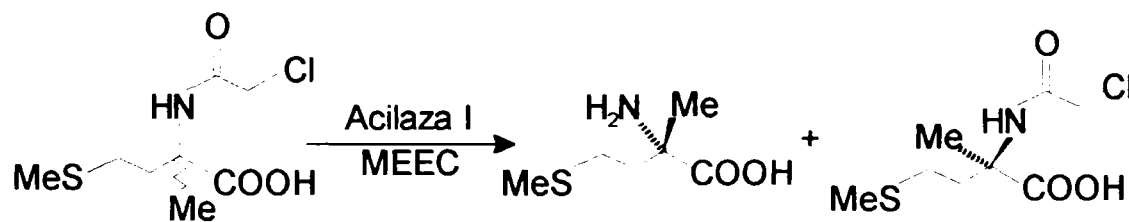


Figura 3.34. Rezoluția DL-N-cloroacetil- $\alpha$ -metil-metioninei cu acilaza I prin metoda MEEC

Acilaza I este specifică pentru N-acil- $\alpha$ -aminoacizi. Ea acționează asupra unor aminoacizi foarte diferiți structural, atât în ceea ce privește catena hidrocarbonată cât și gruparea acil atașată de gruparea amino.

Cele două acilaze sunt complementare în ceea ce privește specificitatea de substrat. Ele prezintă afinitate pentru n-alchil, n-alchenil sau n-alchinil-aminoacizi cu lungime moderată a catenei ( $C_3$ - $C_9$ ). Aminoacilaza fungică prezintă activități relativ mai mari la hidroliza aminoacizilor aromatici și  $\beta$ -ramificați, în timp ce acilaza din rinichi de porc prezintă o afinitate mărită față de aminoacizii  $\omega$ -carboxilați și acceptă ca substraturi  $\alpha$ -metilaminoacizii. Atât aminoacilaza fungică cât și cea renală hidrolizează grupări acetil și propionil nesubstituie sau substituie, grupări formil, benzoil, glicil, viteza de hidroliză cu aminoacilaza fungică fiind mai mare decât cu cea renală [3.129]. Aceasta din urmă hidrolizează și  $\alpha$ -aminoacizi cu grupări acil ramificate în  $\alpha$ , dipeptide, N-cloracil sau N-metilacilaminoacizi, pe când aminoacilaza fungică nu [3.129, 3.130].

În tabelul 3.6 sunt prezentați o serie de aminoacizi naturali și nenaturali, importanți ca sintoni chirali în sinteza chimică organică, care au fost separați cu acilază.

Tabel 3.6.  $\alpha$ -aminoacizi și  $\alpha$ -metil- $\alpha$ -aminoacizi testați sub formă de acil-derivați ca substraturi pentru acilaza I

$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\   \\ \text{R}-\text{C}-\text{NH}_3^+ \end{array}$			$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{COO}^- \\   \quad / \\ \text{R}-\text{C}-\text{NH}_3^+ \end{array}$
R	R	R	R
CH <sub>3</sub>		NC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> CH
CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>		HOOC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	HOCH <sub>2</sub>
		HOOC-CH=CH-CH <sub>2</sub>	HOOC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH			
	ClCH <sub>2</sub>		
	HOCH <sub>2</sub>		
	HO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>		
	HO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>		
	HO-CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub>		
	HO-CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>		
	NC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>		

Hidroliza stereospecifică cu aminoacilază este una dintre metodele cele mai importante și mai studiate de rezoluție cinetică enzimatică a aminoacizilor, cu multe variante, atât ca tehnică de imobilizare a enzimei, cât și ca proces [3.131-3.134].

S-au identificat și D-acilaze. Astfel, enzima izolată din *Alcaligenes fecalis* DA1 catalizează hidroliza unor N-acil-aminoacizi (N-acetil, N-benzoil, N-benziloxicarbonil) la D-aminoacizi. Aminoacizii neutri ca Met și Phe sunt substraturi bune, pe când aminoacizii mici și polari, ca Gly, Ala, Ser, Thr, Asp, Lys, și Arg nu. Gruparea BOC nu este acceptată în substrat [3.135].

### 3.3.2.4. Hidantoinaze

Hidantoinazele sunt o categorie deosebită de enzime, care acționează asupra izomerului D al substratului (respectiv hidantoinii) conducând la obținerea directă a D-aminoacidului. Prin aceasta se reduce numărul etapelor tehnologice de separare a produsului, în cazul în care produsul util este tocmai izomerul D.

Amoxicilina, un antibiotic de tip  $\beta$ -lactonic, conține D-para-hidroxi-fenilglicină în catena laterală. În figura 3.35 este prezentată o sinteză enzimatică specială a acestui aminoacid [3.136].

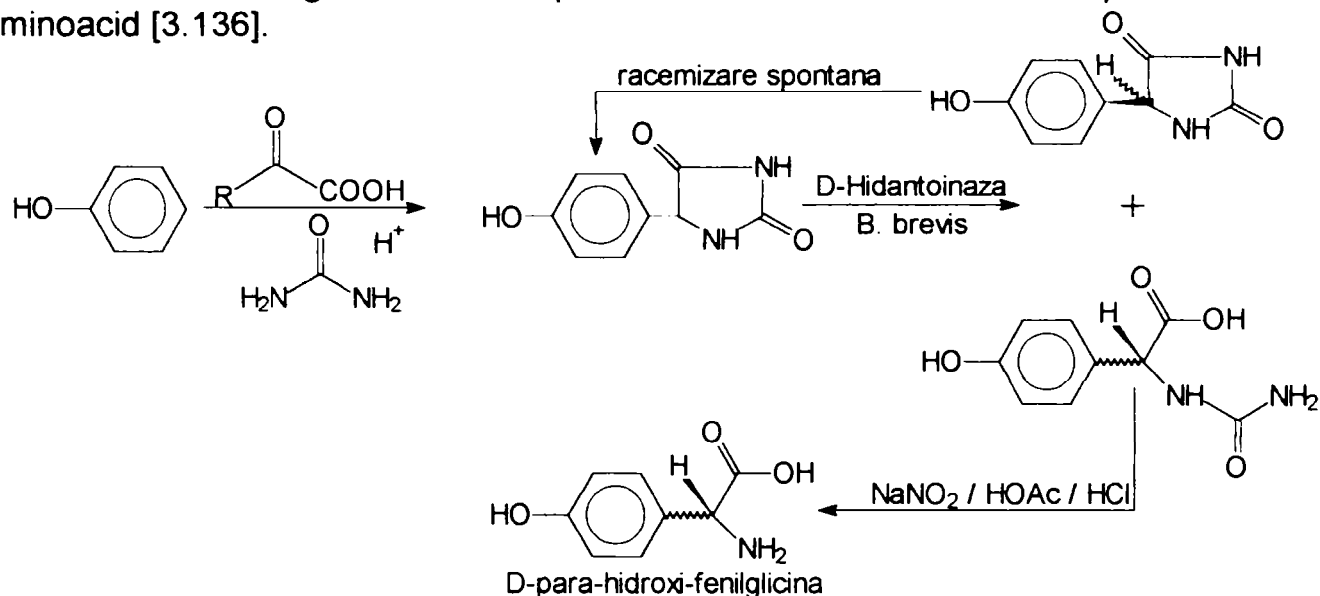


Figura 3.35. Sinteza D-para-hidroxi-fenilglicinei cu D-hidantoinază

Para-hidroxi-fenilhidantoina racemică se prepară din fenol, acid glioilic și uree în mediu acid. Acest substrat este hidrolizat selectiv la D-N-carbamoil-para-hidroxi-fenilglicină de către o hidantoinază D-specifică din *Bacillus brevis*. Izomerul L nereacționat racemizează spontan în condițiile reacției enzimaticе, astfel încât produsul util poate fi obținut cu un randament teoretic de 100%. Produsul N-carbamoilat poate fi transformat chimic în D-para-hidroxi-fenilglicină cu azotit de sodiu într-un mediu de acid clorhidric și acid acetic.

Hidantoinaza sau dihidropirimidinaza este produsă de multe bacterii, cum ar fi *Acetobacter*, *Corynebacterium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* sau *Streptomyces* [3.137]. Deși are activitate și selectivitate maximă pentru dihidouracil, enzima atacă un mare număr de hidantoini 5-substituiți, alifatici și aromatici [3.58].

Pe lângă D-para-hidroxi-fenilglicină, metoda se aplică comercial și pentru D-fenilglicină și D-valină.

Scindarea legăturii carbamoilice se poate face și enzimatic. Celule de *Agrobacterium radiobacter* convertesc direct DL-5-(para-hidroxi-fenil)-hidantoina în D-para-hidroxi-fenilglicină. Acest microb produce două enzime, atât o D-hidantoinază cât și o N-carbamoil-D-aminoacid-hidrolază.



În speciile de *Pseudomonas* s-au găsit pe lângă hidantoinaze și racemaze care determină o transformare completă a substratului.

### 3.3.2.5. Nitrilaze și nitril-hidrataze

Nitrilazele și nitril-hidratazele catalizează conversia nitrililor la acizi carboxilici și amide [3.4, 3.138, 3.139].

În cazul nitrilazei din *Pseudomonas putida* și *Brevibacterium species* se presupune că are loc hidroliza nespecifică a nitrilului la DL-amidă de către o hidratază, urmată de hidroliza enantioselectivă a L-amidei la L-acid de către o amidază specifică.

L-alanina a fost obținută din  $\alpha$ -aminopropionitril folosind o tulpină de *Acinetobacter species* cu activitate nitrilazică, cu conversie de 94% și ee 75% (figura 3.36) [3.4].

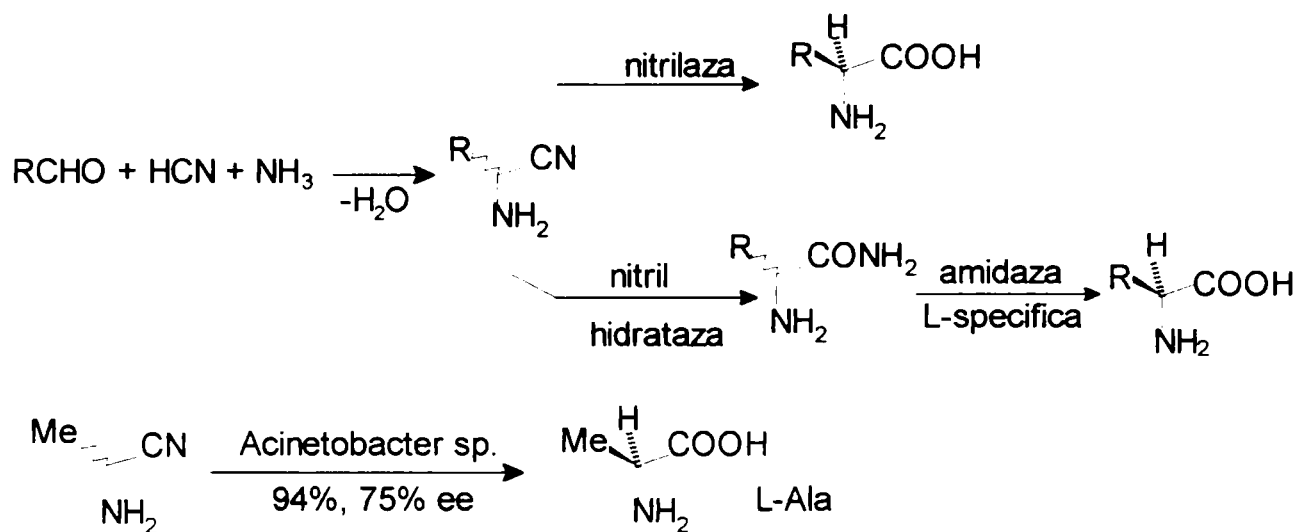


Figura 3.36. Aminoacizi optic activi cu nitrilaze și nitril-hidrataze

Conversia mare și lipsa D-amidei din sistem dovedesc existența unei nitrilaze cu activitate enantiospecifică și nu o combinație de nitril-hidratază/L-amidază. Există și posibilitatea existenței unei racemaze care, cuplată cu sistemul nitril-hidratază/L-amidază duce la același rezultat.

Aceste enzime mai pot fi folosite la obținerea aminoacizilor și hidroxiacizilor din aminonitrilii și cianhidrinele corespunzătoare. Metoda este valoroasă pentru că decurge în condiții blânde și fără produse secundare, în timp ce metodele convenționale de hidroliză a nitrililor sunt însoțite de generarea de săruri, care ridică probleme de izolare și purificare, respectiv de epurare.

Potențialul nitrilazelor este foarte mare, deși până în prezent cea mai importantă aplicație a lor rămâne sinteza caprolactamei din adiponitril.

### 3.4. Bibliografie

- 3.1. I. Wagner, H. Musso, *Angew. Chem.* **95**, 827(1983).
- 3.2. Y. Izumi, I. Chibata, T. Itoh, *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **17**, 176 (1978).
- 3.3. I. Chibata, I. Tosa, T. Sato, T. Mori in *Methods in Enzymology vol. XLIV*, Ed. K. Mosbach, Academic Press, New York, 1976, p. 746-759.
- 3.4. R.M.Williams, *Synthesis of Optically Active  $\alpha$ -Amino Acids*, Organic Chemistry Series, vol. 7, Ed. J.E. Baldwin și P.D. Magnus, Pergamon Press, Oxford, 1989.
- 3.5. R.O.Duthaler, *Tetrahedron Rep.* 349, *Tetrahedron* **50** (6), 1539 (1994).
- 3.6. J. Crosby, *Tetrahedron Rep.* 293, *Tetrahedron* **47** (27), 4789 (1991).
- 3.7. J. Jones, *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford Science Publications, Oxford, 1992.
- 3.8. H.-D. Jakubke, *Aminosäuren, peptide, Proteine*, Akademie Verlag Berlin, 1982, p. 3-95.
- 3.9. E. R. Kirk, D. F. Othmer, *Encyclopedia of Chemical Technology*, vol. 1, The Interscience Encyclopedia Inc., New York, 1947, p. 717-727.
- 3.10. F. C. Church, H. E. Srowsgood, G. L. Catigliani, *J. Appl. Biochem.*, **6**, 205 (1984).
- 3.11. C. Zarnea, G. Mencinicopski, Șt. Brăgărea, *Bioingineria preparatelor enzimatic microbiene*, Ed. Tehnică, București, 1980, p. 562-563.
- 3.12. W. Ferdinand, *The Enzyme Molecule*, John Wiley&Sons, New York, 1980, p. 41-46.
- 3.13. B. Hoppe, J. Martens, *Chemie in Unserer Zeit*, **3**, 73 (1984).
- 3.14. P. Dalev, *Biotechnol. Lett.*, **12** (1), 71 (1990).
- 3.15. G. Gubitz, *Chromatogr.* **30** (9/10), 555 (1990).
- 3.16. J. Yamashita, H. Satoh, *J. Chromatogr.*, **464**, 411 (1989).
- 3.17. J. Yamashita, H. Satoh, H. Kita, T. Suyuki, *J. Chromatogr.*, **403**, 275 (1987).
- 3.18. S. Oi, M. Shijo, J. Zamashita, S. Miyamo, *Chem. Lett.*, 1545 (1988).
- 3.19. H. Frank in *Chirality and Biological Activity*, Alan R. Liss Inc., New York, 1990, p. 33-54.
- 3.20. J. Martens, *Chemie in Unserer Zeit*, **18** (3), 86 (1983).
- 3.21. J. Jeanneret-Gris, C. Soerensen, H. Su, J. Porret, *Chromatogr.*, **28** (7/8), 337 (1989).
- 3.22. G. Gubitz, W. Jellenz, *J. Liquid Chromatogr.*, **4** (4), 701 (1981).
- 3.23. G. Gubitz, W. Jellenz, *J. Chromatogr.*, **203**, 377 (1981).
- 3.24. G. Gubitz, F. Hoffmann, W. Jellenz, *Chromatogr.*, **16**, 103 (1982).
- 3.25. G. Gubitz, *J. Chromatogr.*, **9** (283), 519 (1986).
- 3.26. R. A. Sheldon, *Chirotechnology*, Marcel Decker, New York, 1993, p.120-122.
- 3.27. S. Kinoshita, S. Udaka, M. Shimono, *J. Chem. Appl. Microbiol.*, **3**, 193 (1957).
- 3.28. Y. Hirose, H. Okada în *Microbial Technology, Microbial Processes*, vol. I, Ed. H. J. Peppler, D. Perlman, Ed. 2-a, Academic Press, New York, 1979, p. 211-239.
- 3.29. C. Wandrey în *Enzymes as Catalysts in Organic Synthesis*, Ed. M. P. Schneider, D. Reidel, Dordecht, 1986, p. 263-284.
- 3.30. A.S. Bommarius în *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Ed. K. Drautz, H. Waldmann, VCH, Weinheim, 1995, p. 633-641.

- 3.31. A. F. Buckmann, M. R. Kula, R. Winchmann, C. Wandrey, *J. Appl. Biochem.* **3**, 301 (1981).
- 3.32. R. Winchmann, C. Wandrey, A. F. Buckmann, M. R. Kula, *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2789 (1981).
- 3.33. A. Vidal-Cros, M. Gaudry, A. Marquet, *J. Org. Chem.*, **54**, 498 (1989).
- 3.34. J.R. Matos, C.-H Wong, *J. Org. Chem.*, **51**, 2388 (1986).
- 3.35. S. E. Godtfredson, K. Ingvorsen, B. Yale, O. Andreson in *Biocatalysis in Organic Synthesis*, Ed. J. Tramper, H. C. van der Plaas, P. Linko, Elsevier, Amsterdam, 1985, p. 3-18.
- 3.36. J. D. Rozzell in *Methods in Enzimology*, vol. 136 (*Immobilized Enzymes and Cells*, Part C), Academic Press, New York, 1987, p. 479-497.
- 3.37. W. Leuchtenberger, în *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Ed. K. Drautz, H. Waldmann, VCH, Weinheim, 1995, p.470-480.
- 3.38. E. M. Mejer, W. H. J. Boesten, H. E. Schoenemaker, J. A. M. van Balken în *Biocatalysis in Organic Synthesis*, Ed. J. Tramper. H. C. van der Plaas, P. Linko, Elsevier, Amsterdam, 1985, p. 135-158.
- 3.39. N. Passerat, J. Bolte, *Tetrahedron Lett.* **28**, 1277 (1987).
- 3.40. A. Pollak, H. Blumenfeld, M. Wax, R. L. Baghn, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 6324 (1980).
- 3.41. J. E. Baldwin, R. L. Dyer, S. C. Ng, A. J. Pratt, M. A. Russell, *Tetrahedron Lett.* **28**, 3745 (1987).
- 3.42. C. Unverzagt în *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Ed. K. Drautz, H. Waldmann, VCH, Weinheim, 1995, p. 480-487.
- 3.43. J. Umemura, S. Takamatsu, S. Sato, T. Tosa, I. Chibata, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 291 (1984).
- 3.44. I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, în *Biotechnology*, vol. 7a, Ed. H.J. Rehm, G. Reed, VCH, Weinheim, 1987, p. 653-684.
- 3.45. S. Yamada, K. Nabe, N. Izuo, K. Nakamishi, I. Chibata, *J. Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 773 (1981).
- 3.46. B. K. Hamilton, H. Hsiao, W. E. Swann, D. M. Anderson, J. J. Delente, *Trends in Biotechnol.* **3**, 64 (1985).
- 3.47. J. C. McGiure, brevet SUA 4598047 (1986) (Genex Corporation).
- 3.48. M. A. J. Finkelman, H. H. Yang, brevet SUA 4584273 (1986) (Genex Corporation).
- 3.49. P. J. Vollmer, brevet SUA4584269 (1986) ) (Genex Corporation).
- 3.50. M. Akhtar, M.A. Cohen, D. Gani, *Tetrahedron Lett.* **28**, 2413 (1987).
- 3.51. K. Soda, K. Yonaha în *Biotechnology*, vol. 7a, Ed. H.J. Rehm, G. Reed, VCH, Weinheim, 1987, p. 605-651
- 3.52. N. Nakajima, N. Esaki, K. Soda, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 947-948 (1990).
- 3.53. R. M. Williams, J. A. Hendrix, *Chem. Rev.* **92**, 889 (1992).
- 3.54. R. M. Williams, *Aldrichimica Acta*, **25** (1), 11 (1992).
- 3.55. S. Otsuka, K. Tani, *Synthesis*, 665 (1991).
- 3.56. R. Noyori, *Science*, **248**, 1194 (1990).
- 3.57. D.F. Reinhold, R.A. Firestone, W.A. Gaines, J.M. Chemerda, M. Schletzinger, *J. Org. Chem.*, **33**, 1209 (1968).

- 3.58. R.A. Sheldon, P.A. Porskamp, W. van Hoeve în *Biocatalysis in Organic Synthesis*, Ed. J. Tramper, H.C. van der Plaas, P. Linko, Elsevier, Amsterdam, 1985, p. 59-96.
- 3.59. T. Shiraiwa, H. Miyazaki, T. Imai, M. Sunami, H. Kurokawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60** (2), 661 (1987).
- 3.60. T. Shiraiwa, H. Miyazaki, A. Uramoto, M. Sunami, H. Kurokawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60** (4), 1465 (1987).
- 3.61. C. Hongo, I. Chibata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **56** (12), 3744 (1983).
- 3.62. S. Yamada, M. Yamamoto, I. Chibata, *J. Org. Chem.*, **38**, 4408 (1973).
- 3.63. M. Pugniere, C. San Juan, A. Previero, *Biotechnol. Lett.*, **7**, 31 (1985).
- 3.64. S. Yamada, C. Hongo, R. Oshioka, I. Chibata, *J. Org. Chem.* **48**, 843 (1983).
- 3.65. S. Sifniades, W. J. Broyle, J. P. van Pappen, *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 3728 (1976).
- 3.66. A. J. Bosch, *J. Chem. Educ.*, **46**, 691 (1969).
- 3.67. H. Kageyama, I. Mesazaki, O. Akira, K. Jiro, M. Shinichi (Ajinomoto), brevet japonez nr. 671.532; *Chem. Abstr.* **67**, 440.825 (1967).
- 3.68. H. Okai, N. Imamura, I. Izumija, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **40**, 2154 (1967).
- 3.69. J. Oh-Hashi, K. Harada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **39**, 2287 (1966).
- 3.70. J. N. Coker, W. L. Kohlase, M. Fields, A. O. Rogers, M. A. Stevens, *J. Org. Chem.*, **27**, 850 (1962).
- 3.71. T. Perlotto, M. Vignolo, *Ed. Sci.*, **21**, 30 (1966); *Chem. Abstr.* **64**, 19756f (1966).
- 3.72. K. Vogler, P. Lenz, *Helv. Chim. Acta*, **49**, 1348 (1966).
- 3.73. B. Liberek, S. Dziala, *Zesz. Nauk. Wyzsz. Szk. Pedag. Gdansk* 165 (1969); *Chem. Abstr.* **73**, 321845 (1970).
- 3.74. T. Sokolonska, *Rocz. Chem.*, **40**, 1895 (1966); *Chem. Abstr.* **67**, 64667p (1967).
- 3.75. P. Toshiyuki, F. Tadashi, *Yakugaku Zanshi*, **87**, 95 (1967); *Chem. Abstr.* **67**, 64675q (1967).
- 3.76. B. Halpern, J. W. Westley, *Chem. Commun.* **421** (1965).
- 3.77. R. Yoshioka, M. Tohiyama, O. Ohtsuki, S. Yamada, I. Chibata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 649 (1987).
- 3.78. J. C. Clark, G. H. Phillipps, M. R. Steer, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 475 (1976).
- 3.79. H. Nohira, K. Watanabe, M. Kurokawa, *Chem. Lett.*, 299 (1976).
- 3.80. T. Shiraiwa, K. Shinjo, H. Kurokawa, *Chem. Lett.*, 1413 (1989).
- 3.81. C.S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem. Int. Edn Eng.* **28**, 695 (1989).
- 3.82. Y. Ihara, N. Kunikigo, T. Kunimasa, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **11**, 1741 (1983).
- 3.83. K. Ohkeibo, N. Matsumoto, H. Ohto, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **13**, 738 (1982).
- 3.84. P. L. Luisi în *Optically Active Polymers*, Ed. E. Selegny, D. Reydel, 1979, p. 357-401.
- 3.85. H. Schult, G. Schmidt-Kastner, A. Arens, M. Preiss, *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 420 (1985).
- 3.86. H. Kise, K. Fijimoto, *Biotechnol. Lett.* **10** (12), 883 (1988).
- 3.87. H. Kise, *Bioorg. Chem.* **18**, 107 (1990).
- 3.88. H. Kise, A. Hayakawa, H. Noritomi, *J. Biotechnol.* **14**, 239 (1990).
- 3.89. C.-H. Wong, S.-T. Chen, W. J. Hennen, J. A. Bibbs, Y.-F. Wang, J. L.-C. Liu, M. W. Pantoliano, M. Whiflow, P. N. Bryan, *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 945 (1990).

- 3.90. A. Zaks, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2767 (1986).
- 3.91. P. Pasta, G. Mazzola, G. Carrea, S. Riva, *Biotechnol. Lett.* **2** (9), 643 (1989).
- 3.92. S.-T. Chen, K.-T. Wang, C.-H. Wang, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1514 (1986).
- 3.93. Y. Tomiuchi, K. Oushima, H. Kise, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **65** (10), 2599, (1992).
- 3.94. T. Kijima, K. Oushima, H. Kise, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **59**, 61 (1994).
- 3.95. M. L. Bender, L. J. Brubacher, *Catalysis and Enzyme Action*, Mc Grow Hill, 1973, p. 71.
- 3.96. H. Noritomi, H. Kise, *Biotechnol. Lett.* **9** (6), 383 (1987).
- 3.97. H. Kise, A. Hayakawa, H. Noritomi, *Biotechnol. Lett.* **9** (8), 543 (1987).
- 3.98. H. Kise, K. Fujimoto, H. Noritomi, *J. Biotechnol.* **8**, 279 (1988).
- 3.99. T. Scheper, W. Halwachs, K. Schugerl, *Chem. Ing. Tech.* **54** (7), 696 (1982).
- 3.100. E. Flaschel, A. Renken in *Biocatalysis in Organic Media*, Ed. J. Tramper, H. C. van der Plas, P. Linko, Elsevier, Amsterdam, 1987, p. 375-380.
- 3.101. H. J. Gais, in *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Ed. K. Drautz, H. Waldmann, VCH, Weinheim, 1995, p.196-200.
- 3.102. S. K. Dahod, M. V. Empil in *Biocatalysis in Organic Media*, Ed. J. Tramper, H. C. van der Plas, P. Linko, Elsevier, Amsterdam, 1987, p. 419-424.
- 3.103. H. Kise, H. Shirato, H. Noritomi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **60**, 3613 (1987).
- 3.104. H. Kise, H. Shirato, *Enzyme Microb. Technol.* **10**, 582 (1988).
- 3.105. H. Noritomi, A. Watanabe, H. Kise, *Polym. J.* **21** (2), 147 (1989).
- 3.106. S. Makimoto, A. Watanabe, H. Kise, *Chem. Express* **2** (10), 599 (1987).
- 3.107. V. V. Mozhaev, Y. L. Khmelnitsky, M. V. Sergheeva, A. B. Belova, N. L. Klyachko, A. V. Levashov, K. Martinek, *Eur. J. Biochem.* **184**, 597 (1989).
- 3.108. E. Testet, N. Rachdi, M. Baboulene, V. Speziale, A. Lattes, *C. R. Acad. Sci, Paris, ser. II*, **306**, 347 (1988).
- 3.109. E. Testet, M. Baboulene, V. Speziale, A. Lattes, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **41**, 69 (1988).
- 3.110. M. Reslow, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 1 (1987).
- 3.111. M. Reslow, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *Eur. J. Biochem.* **172**, 573 (1988).
- 3.112. D. Cantacuzene, F. Pascal, C. Guerreiro, *Tetrahedron*, **43** (8), 1823 (1987).
- 3.113. D. Cantacuzene, C. Guerreiro, *Tetrahedron Lett.*, **28** (8), 5153 (1987).
- 3.114. D. Cantacuzene, C. Guerreiro, *Tetrahedron*, **45** (3), 741 (1989).
- 3.115. D. Cantacuzene, C. Guerreiro, S. Attal, *Biotechnol. Lett.*, **11** (7), 493 (1989).
- 3.116. D. G. Druckhammer, C. I. Barbas, K. Nazaki, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **53**, 1607 (1988).
- 3.117. T. Miyazava, T. Takitani, S. Ueji, T. Yamada, S. Kuwata, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1214 (1988).
- 3.118. N. Guibe-Jampel, G. Rousseau, J. Salaun, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1080 (1987).
- 3.119. F. Bjorkling, J. Boutelje, M. Hjalnoarson, K. Hult, T. Norin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1041 (1987).
- 3.120. B. Shadid, H. C. van der Plaas, W. H. J. Boesten, J. Kamphuis, E. M. Meijer, H. E. Schoemaker, *Tetrahedron*, **46**, 913 (1990).
- 3.121. E. C. Roos, H. H. Mooiweer, H. Hiemstra, W. N. Speckamp, W. N. Kaptein, W. H. J. Boesten, J. Kamphuis, *J. Org. Chem.* **57**, 6769 (1992).



- 3.122. W. H. Kruizinga, J. Bolster, R. M. Kellog, J. Kamphius, W. H. J. Boesten, E. M. Meijer, H. E. Schoemaker, *J. Org. Chem.*, **53**, 1826, (1988).
- 3.123. Y. Katto, Y. Asano, A. Nakazawa, K. Kondo, *Tetrahedron* **45**, 5743 (1989).
- 3.124. W. H. J. Boesten, în *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Ed. K. Drautz, H. Waldmann, VCH, Weinheim, 1995, p.376-392.
- 3.125. S. M. Birnbaum, L. Levington, R. B. Kingsley, J. P. Greenstein, *J. Biol. Chem.* **194**, 455 (1952).
- 3.126. R. Marshall, S. M. Birnbaum, J. P. Greenstein, *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4635 (1956).
- 3.127. J. P. Greenstein, W. Milton, *Chemistry of Amino Acids*, John Wiley & Sons, New York, 1961, vol I, p. 729-743, vol II, p. 1769-1778.
- 3.128. M. D. Bodnarski, H. K. Chenault, E. S. Simon, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 1283 (1987).
- 3.129. S. Kang, Y. Ninematsu, Y. S. Shimohigashi, M. Waki, N. Izumiya, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **61**, 575 (1988).
- 3.130. H. K. Chenault, J. dehmmer, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 6354 (1987).
- 3.131. T. Barth, H. Maskova, *Bull. Czech. Chem. Commun.* **36**, 2398 (1971).
- 3.132. B. Szajani, K. Ivani, L. Boross, *Magy. Kem. Foly.* **8**, 350 (1980).
- 3.133. D. Dinelli, W. Marconi, F. Mosisi în *Methods in Enzymology* vol XLIV, Ed. K. Mosbach, Academic Press, new York, 1976, p. 227-242.
- 3.134. R. Bacaloglu, G. Muscă, G. Pop, A. Blasko, C. Boeriu, A. Stoi, S. Eisler, *Rev. Roum. Biochimie* **22** (2), 91 (1985).
- 3.135. C. H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Tetrahedron Organic Chemistry Series vol. 12, Pergamon, 1995, p.42-43.
- 3.136. E. M. Meijer, J. Kamphius, J. A. M. van Balken, H. F. M. Hermes, W. J. van der Tweel, M. Kloosterman, W. H. J. Boesten, H. E. Schoemaker în *Trends in Drug Research*, Ed. V. Claassen, Elsevier, Amsterdam, 1990, p. 363-382.
- 3.137. H. Yamada, S. Shimizu, *Angew. Chem.* **100**, 640 (1988).
- 3.138. S. E. Godtfredsen, K. Ingvorsen, B. Yale, O. Andersen în *Biocatalysis in Organic Synthesis*, 22, Ed. J. Tramper, H. C. van der Plas, P. Linko, Elsevier, Amsterdam, 1985, p.3-18.
- 3.139. Y. Asano, *J. Synth. Org. Chem.* **47** (8), 750 (1989).

*Partea a II-a. Contribuții originale*

*Motto:*

*If we wish to catch up the Nature, we shall need to use the same methods as she does, and I can foresee a time in which physiological chemistry will not only make greater use of natural enzymes but will actually resort to creating synthetic ones.*

Emil Fischer, 1902

## 4. Obținerea, caracterizarea și utilizarea enzimelor amilolitice produse de *Aspergillus oryzae* și *Aspergillus niger*

În general, hidroliza enzimatică a amidonului are loc în două etape:

- lichefierea amidonului prin transformare în dextrine cu  $\alpha$ -amilază, de exemplu din *Bacillus subtilis*, din preparate comerciale gen Termamyl (Novo);
- zaharificarea propriu-zisă, adică transformarea dextrinelor în zaharuri reducătoare fermentescibile (glucoză, maltoză) cu amiloglucozidază (AMG), de exemplu din *Aspergillus*, din preparate comerciale gen Amyloglucozidase (Novo).

Cercetările efectuate s-au axat pe obținerea unui complex enzimatic ( $\alpha$ -amilază și amiloglucozidază) care să fie utilizat în hidroliza amidonului, pentru obținerea ulterioară a etanolului.

În alegerea microorganismului producător de amilaze s-au avut în vedere pe de o parte caracteristicile de biosinteză ale diverselor microorganisme iar pe de altă parte faptul că producerea de enzime de tipuri diferite (fungice și bacteriene) poate ridica probleme de incompatibilitate la cultivarea în aceeași incintă (contaminare). Acest inconvenient se poate rezolva prin cultivarea unui singur microorganism sau a unor microorganisme din aceeași familie.

Microorganismele din genul *Aspergillus* produc complexe enzimatice amilolitice care conțin atât  $\alpha$ -amilază cât și amiloglucozidază [4.19]. Complexul amilolitic biosintetizat de *Aspergillus oryzae* conține cantități mari  $\alpha$ -amilază și moderate de amiloglucozidază, ceea ce permite un atac rapid asupra amidonului, favorizând în continuare procesul de zaharificare, în timp ce complexul sintetizat de *Aspergillus niger*, conținând cantități mari de amiloglucozidază și cantități mici de  $\alpha$ -amilază, degradează lent amidonul și deci procesul de zaharificare, care depinde de dextrinificare, se va desfășura lent.

S-a urmărit obținerea de preparate enzimatice cu activitate  $\alpha$ -amilazică și amiloglucozidazică prin următoarele etape:

- selecționarea unor tulpini de *Aspergillus oryzae* și *Aspergillus niger* înalt producătoare de enzime amilolitice;
- determinarea condițiilor optime de biosinteză prin culturi pe mediu solid sau submers, în flacoane sau bioreactor și separarea unor preparate parțial purificate cu activitate  $\alpha$ -amilazică și amiloglucozidazică;
- caracterizarea preparatelor enzimatice obținute: influența pH-ului, temperaturii, anionilor și cationilor asupra activității și stabilității activității enzimatice;
- determinarea parametrilor cinetici de acțiune ai enzimelor la hidroliza substanțelor amidonoase.

### 4.1. Obținerea și purificarea $\alpha$ -amilazei din culturi de *Aspergillus oryzae*

#### 4.1.1. Selectarea de tulpini microbiene cu randament ridicat și standardizarea mediului optim de cultură

Atât caracteristicile de biosinteză cât și problemele de compatibilitate a diferitelor tulpini microbiene au dus la alegerea de *Aspergillus oryzae* ca microorganism producător

de enzime amilolitice, testându-se mai multe tulpini în vederea selectării uneia cu productivitate maximă.

Metoda folosită în selecționarea unei tulpini înalt producătoare de enzime amilolitice a constat în testarea unor tulpini adaptate pentru producerea de amilaze din colecții de microorganisme, dezvoltarea și întreținerea lor pe medii sintetice precum și cultivarea pe medii naturale în scopul biosintezei enzimelor.

Criteriile care au stat la baza selecționării tulpinilor, a standardizării mediului de cultură și a biosintezei au fost:

- randament maxim în inducerea biosintezei de amilaze,
- inducerea producției de amilaze în timp cât mai scurt,
- inhibarea producerii altor enzime (proteazele și transglucozidazele),
- componente naturale accesibile, la preț de cost scăzut.

Prezența proteazelor este nedorită deoarece, prin acțiunea lor proteolitică, determină distrugerea amilazelor, iar separarea lor de amilaze în cursul procesului de purificare mărește prețul de cost. Transglucozidazele (glucozil-transferazele) catalizează sinteza zaharurilor nefermentescibile, în particular a izomaltozei, din glucoză. De aceea, obținerea de randamente mari de glucoză din amidon implică absența glicosil-transferazelor.

#### 4.1.1.1. Cultivarea tulpinilor pe medii sintetice de creștere și întreținere

Tulpinile testate s-au găsit sub formă liofilizată, în tuburi închise steril sau în eprubete pe mediu solid cu agar (Sabouraud sau Czapek-Dox). Ele s-au menținut pe tuburi înclinate timp de trei-patru luni după care s-au trecut pe mediu proaspăt (cap. 6.2.1.1.1). După trei-patru treceri pe mediu Sabouraud sau Czapek, pentru a evita degenerarea tulpinii, s-a făcut trecerea pe un mediu de cultură diferit, de obicei mediu de morcov, care este și cel mai simplu de preparat.

Pentru tulpinile testate timpul de sporulare pe mediu Sabouraud a fost de 6-8 zile, iar pe mediu Czapek de 8-9 zile, la 30°C, după care sporii obținuți au putut fi folosiți ca inocul pentru mediile de cultură naturale.

#### 4.1.1.2. Selectarea de tulpini microbiene [4.1]

S-au testat 4 tulpini microbiene de colecție de *Aspergillus oryzae*, adaptate pentru producerea de amilaze. La cultivare pe mediu Sabouraud solid înclinat, timpul de sporulare a fost de 6-8 zile la 30°C.

Testarea potențialului de biosinteză amilolitică s-a efectuat prin cultivare pe mai multe medii naturale sterilizate, în flacoane conice de 1 l, pH<sub>mediu</sub> 4,6-4,8, la 30°C, 48 h, sub agitare, microorganismul fiind puternic aerob (masă vibratoare cu sistem du-te-vino, 100 curse/minut) (cap. 6.2.1.1.2). S-a urmărit dezvoltarea miceliului și s-a determinat conținutul în amilaze, proteaze și proteine în filtrate. Pentru activitatea amilazică s-a utilizat metoda determinării zaharurilor reducătoare, produse prin hidroliza amidonului, evaluându-se astfel activitatea amilazică globală. Rezultatele obținute pentru tulpinile de *Aspergillus* testate sunt prezentate în tabelul 4.1.

Tulpina cu rezultatele cele mai bune a fost *Aspergillus oryzae* 242 care a prezentat activitatea amilazică cea mai ridicată (10,49 U/ml) și cantitatea cea mai mică de proteaze în mediu (0,16 U/ml). Tulpina se caracterizează și printr-o creștere rapidă, care o protejează împotriva unor infecții timpurii. În experimentele următoare de standardizare a mediului de cultură și a condițiilor optime s-a lucrat numai cu această tulpină.

Tabel 4.1. Selectarea tulpinii de *Aspergillus oryzae* producătoare de amilaze

Nr. crt.	Tulpina	Compoziția mediului		Amilaze (DNS) U/ml	Proteaze U/ml	Proteine U/ml
		Component	g			
1	A.o. 242	Pudră orez	3	10,49	0,16	4,36
	A.o. 144	Pudră fasole	1,25	3,17	0,84	4,87
	A.o. 142	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	9,21	0,37	4,86
	A.o. 159	MgSO <sub>4</sub>	0,08	1,20	0,38	4,14
		CaCl <sub>2</sub>	0,08			
		H <sub>2</sub> O distilată	150			
2	A.o. 242	Tărâțe grâu	0,50	9,37	0,20	1,37
	A.o. 144	Amidon	0,75	2,43	0,73	1,06
	A.o. 142	Extract drojdie	0,75	8,40	0,22	1,40
	A.o. 159	CaCl <sub>2</sub>	0,30	1,25	0,29	1,21
		H <sub>2</sub> O distilată	150			
3	A.o. 242	Mălai	4,50	4,16	0	0,53
	A.o. 144	Extract drojdie	0,08	1,40	0	0,74
	A.o. 142	CaCl <sub>2</sub>	0,75	3,48	0	0,74
	A.o. 159	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,08	1,10	0	0,46
		KCl	0,08			
		MgSO <sub>4</sub>	0,08			
		H <sub>2</sub> O distilată	150			

#### 4.1.1.3. Standardizarea mediului optim de cultură

Optimizarea mediilor de cultură s-a făcut în aceleași condiții ca și testarea tulpinilor (cap. 4.2.1.2). În alegerea componentelor mediului de cultură s-a ținut cont de diversele rețete întâlnite în literatură cât și de regulile generale de inducție a biosintezei enzimelor, de utilizarea de produse naturale, ușor accesibile.

Pentru inducerea producerii de enzime s-au utilizat:

- surse de carbon (tărâțe de grâu, amidon, mălai, făină de orez);
- surse de azot atât organic (fasole), cât și anorganic ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>);
- săruri anorganice de Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>;
- surse de fosfor (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>);
- surse de vitamine (extract de drojdie).

Componența mediilor de cultură și rezultatele obținute pentru tulpina de *Aspergillus oryzae* 242 sunt prezentate în tabelele 4.2, 4.3 și 4.4 [4.14].

Mediile de cultură 1, 2 și 3 (tabelul 4.2) au dat rezultatele cele mai bune, dar tulpina a sintetizat și o cantitate însemnată de proteaze. Mediile 4 și 5 au rezultate mai slabe, dar nu produc de loc proteaze. Mediul 2 format numai din tărâțe și fasole are activitate amilazică destul de bună dar are activitate proteazică, ceea ce arată rolul mălaiului ca inductor în biosinteza amilazelor și mai ales de represor al biosintezei proteazelor. S-a experimentat o combinație de componente din aceste medii în scopul măririi cantității de amilaze și a eliminării producerii de proteaze (tabelul 4.3). În cazul mediilor 6, 7, 9 și 10 s-a obținut creșterea randamentului de biosinteză a amilazelor, iar în cazul mediului 9 s-a obținut o activitate amilazică bună (12 U/ml) și s-a eliminat complet producerea de proteaze.



S-a încercat în continuare reducerea numărului de componente ale mediului de cultură prin cultivarea microorganismului pe mediul 9 din care să lipsească una dintre componentele de bază (tabelul 4.4). Se observă că eliminarea făinei de fasole duce la o scădere la jumătate a activității amilazice, iar eliminarea și a tărâțelor și a fasolei duce la o scădere aproape completă a acestei activități.

Deci, mediul optim de biosinteză pentru microorganismul *Aspergillus oryzae* 242 este:

- făină de mălai, g 20,0
- tărâțe de grâu, g 7,0
- făină fasole, g 3,2
- CaCl<sub>2</sub>, g 0,5
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, g 0,5
- apă de izvor, g 1000,0

Tabel 4.2. Optimizarea I a mediului de cultură

Nr. crt.	Compoziția mediului		Amilaze (DNS) U/ml	Proteaze U/ml
	Component	g		
1	Făină orez	3,00	10,49	0,16
	Făină fasole	1,25		
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,30		
	MgSO <sub>4</sub>	0,08		
	CaCl <sub>2</sub>	0,08		
	H <sub>2</sub> O	150		
	H <sub>2</sub> O	150		
2	Tărâțe grâu	3,00	10,59	0,21
	Făină fasole	1,15		
	H <sub>2</sub> O	150		
3	Tărâțe grâu	0,50	9,37	0,20
	Făină fasole	0,75		
	Amidon	2,25		
	Extract drojdie	0,75		
	CaCO <sub>3</sub>	0,30		
	H <sub>2</sub> O	150		
4	Mălai	4,50	4,16	0
	Extract drojdie	0,08		
	CaCl <sub>2</sub>	0,75		
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,08		
	KCl	0,08		
	MgSO <sub>4</sub>	0,08		
	H <sub>2</sub> O	150		
5	Amidon	4,50	0,4	0
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,50		
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,15		
	CaCl <sub>2</sub>	0,05		
	MgCl <sub>2</sub>	0,05		
	H <sub>2</sub> O	150		

Tabel 4.3. Optimizarea II a mediului de cultură

Nr. crt.	Compoziția mediului		Amilaze (DNS)	Proteaze
	Component	g	U/ml	U/ml
6	Tărâțe	3,00	13,64	0,172
	Făină fasole	1,50		
	Amidon	0,50		
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,30		
	MgSO <sub>4</sub>	0,08		
	KCl	0,08		
	H <sub>2</sub> O	150		
7	Făină orez	3,00	12,23	0,240
	Făină fasole	1,50		
	CaCO <sub>3</sub>	0,30		
	H <sub>2</sub> O	150		
8	Făină orez	3,00	7,56	0,137
	NaNO <sub>3</sub>	0,30		
	MgSO <sub>4</sub>	0,08		
	CaCl <sub>2</sub>	0,08		
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,10		
	H <sub>2</sub> O	150		
	9	Făină mălai		
Tărâțe		1,00		
Făină fasole		0,50		
MgSO <sub>4</sub>		0,08		
CaCl <sub>2</sub>		0,08		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0,10		
H <sub>2</sub> O		150		
10	Tărâțe	3,00	12,51	0,218
	Făină soia	1,50		
	H <sub>2</sub> O	150		

Tabel 4.4. Optimizarea III a mediului de cultură

Nr crt	Compoziția mediului		Amilaze (DNS)	Amilaze (I <sub>2</sub> )	Proteaze
	Component	g	U/ml	U/ml	U/ml
9a	Făină mălai	3,00	16,17	17,66	0
	Tărâțe	1,00			
	Făină fasole	0,50			
	CaCl <sub>2</sub>	0,08			
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,10			
	H <sub>2</sub> O	150			
9b	Făină mălai	3,00	8,68	11,09	0
	Tărâțe	1,00			
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,10			
	H <sub>2</sub> O	150			
9c	Făină mălai	3,00	0,8	0,5	0
	CaCl <sub>2</sub>	0,08			
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,10			
	H <sub>2</sub> O	150			

### 4.1.2. Cinetica biosintezei amidazelor, transglucozidazelor și proteazelor pe mediu de cultură submers

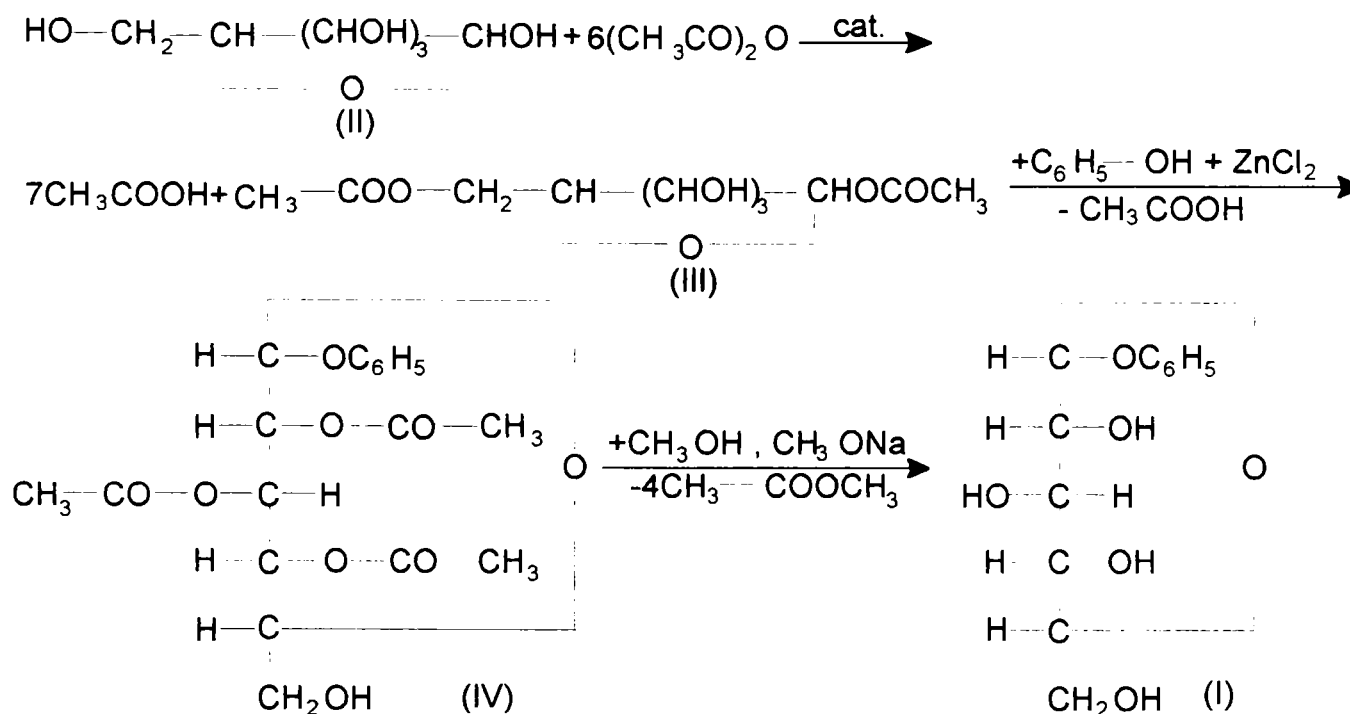
În experimentele anterioare, criteriul de alegere al tulpinii și al mediului optim de cultură a fost randamentul de biosinteză al amidazelor și absența producției de proteaze. Însă, pe lângă proteaze, de obicei se produce și o altă enzimă impurificatoare, și anume transglucozidaza sau oligozaharidaza.

Această enzimă este o transferază care catalizează formarea din zaharide mici ca glucoza sau maltoza de di- tri- sau polizaharide nefermentescibile care apoi nu pot fi transformate de drojdii în alcool etilic. Un conținut mare în această enzimă este dăunător prin scăderea randamentului. De aceea în urmărirea cineticii de biosinteză s-a inclus și procesul de biosinteză al transglucozidazei.

S-a studiat formarea în timp a enzimelor amilolitice în culturi de *Aspergillus oryzae*, în mediu submers, atât în flacoane cât și în bioreactor [4.2], folosind ca mediu de cultură submers mediul optimizat anterior (cap. 4.1.1.3).

#### 4.1.2.1. Sinteza substratului pentru transglucozidaze

Prezența transglucozidazelor în filtratele de cultură precum și verificarea eficacității metodelor de eliminare a enzimei contaminante necesită un substrat foarte specific pentru glucoziltransferaze. Un astfel de compus este fenil- $\alpha$ -D-glucopiranoza (I). Obținerea ei [4.3] (cap. 6.2.1.1.3) s-a realizat conform următoarei scheme de reacție:



Sinteza penta-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranozei (III) prin acetilarea glucozei cu anhidridă acetică a fost realizată pe două căi: metoda A, în care s-a utilizat drept catalizator acidul sulfuric [4.4] și metoda B, cu clorură de zinc [4.5], în ambele metode obținându-se randamente de 80-90%. În prezență de acid sulfuric reacția poate deveni

foarte energică și greu de controlat, de aceea fiind necesară o dozare foarte atentă a acestuia. Puritatea și concentrația anomerului  $\alpha$  în produsul metodei B sunt mai bune decât pentru metoda A (tabelul 4.5). Atât intermediarii cât și produsul de reacție au fost caracterizați prin punct de topire (aparatură Boetius), rotație optică (polarimetru tip Polamat, Carl Zeiss Jena) și spectru IR (pastilă de KBr, spectrofotometru Specord IR 75).

 Tabel 4.5. Sinteza penta-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranozei

Metoda	Randament (%)	Punct de topire (°C)		Rotație optică (°)	
		Exp.	Lit. [4.6]	Exp.	Lit. [4.6]
A	82,0	97-99	111-112	+86,7	+101,75
B	88,5	109-110	111-112	+98,4	+101,75

Spectrele IR ale produșilor au fost identice cu cele de literatură pentru penta-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranoză [4.6].

Tetra-O-acetil-fenil- $\alpha$ -D-glucopiranoza (IV) s-a obținut prin topirea penta-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranozei (III) cu fenol, utilizând  $ZnCl_2$  drept catalizator. Produsul de reacție s-a extras cu benzen și s-a recristalizat din etanol. Randamentul obținut a fost destul de mic, 15-20%, dar apropiat celui indicat de literatură (28%) [4.7].

Caracteristicile produsului de reacție sunt prezentate în tabelul 4.6. Prezența benzilor IR specifice pentru inelul aromatic, gruparea carbonil în esteri și banda C-O-C în eterii ciclici, precum și similaritatea datelor experimentale și de literatură [4.7] pentru punctul de topire și rotația optică confirmă structura (IV) pentru compusul izolat.

 Tabel 4.6. Proprietățile fizico-chimice ale tetra-O-acetil-fenil- $\alpha$ -D-glucopiranozei

Punct de topire (°C)		$\alpha_D^{20}$ (°)		Spectru IR (cm <sup>-1</sup> )						
Exp.	Lit.	Exp.	Lit.	$\nu_{CH_3}$	$\delta_{CH_3}$	$\nu_{CH_{ar}}$	$\nu_{C=O}$	$\nu_{COC}$	$\delta_{CH_{ar}}$	$\gamma_{CH}$
107-110	111-112	+165,7	+168	2920	1430	3020	1720	1200	1180	980
				2840	1360	1600			1120	960
						1490			1100	920
									1080	840
									1040	

Transesterificarea produsului (IV) cu metanol, în prezența metoxidului de sodiu, duce la obținerea fenil- $\alpha$ -D-glucopiranozei de puritate avansată cu randament de 85-90%. Proprietățile spectrale și fizice ale produsului de reacție sunt prezentate în tabelul 4.7.

 Tabel 4.7. Proprietățile fenil- $\alpha$ -D-glucopiranozei

Punct de topire (°)		$\alpha_D^{20}$ (°)		Spectru IR (cm <sup>-1</sup> )					
Exp.	Lit.	Exp.	Lit.	$\nu_{OH}$	$\nu_{CH_2^{as}}$	$\nu_{CH_{ar}} + \delta_{OH}$	$\nu_{COC}$	$\delta_{CH_{ar}}$	$\gamma_{CH_{ar}}$
168-175	170	+174,6	+175	3500	2920	1640	1200	1160, 1110	920
				3200		1600		1080, 1060	860
						1490		1040	750

În spectrul IR se observă apariția benzii OH asociat (3200-3500 cm<sup>-1</sup>, intens, larg) precum și dispariția benzii CO esterice (1720 cm<sup>-1</sup>, intens). Datele experimentale pentru punctul de topire și rotația optică specifică pentru compusul I sunt similare cu cele prezentate în literatură [4.8].

### 4.1.2.2. Biosinteza în flacoane

S-au realizat două culturi în flacoane, cu mediul de cultură submers optim. În cultura A s-a lucrat cu un volum de mediu mai mic decât în cultura B, în ideea că folosind un volum mai mic de mediu aerarea crește (cap. 6.2.1.1.4). Activitatea amilazică, transglucozidazică, proteazică și conținutul în proteine sunt prezentate în tabelul 4.8 și figura 4.1, iar randamentul per gram substanță uscată în tabelul 4.9.

Tabel 4.8. Formarea enzimelor amilolitice prin biosinteză în flacoane, în culturi submerse de *A. oryzae*

Nr. crt.	Timp ore	Proteine mg/ml	Amilaze			AMG ·10 <sup>3</sup> U/ml	TG U/ml	Proteaze U/ml
			DNS		I <sub>2</sub> U/ml			
			U <sub>glu</sub> /ml	U <sub>mat.</sub> /ml				
A	44	0,596	11,02	7,89	10,82	0	0	0
	93	0,514	21,85	15,60	16,34	4,5	0	0
	118	0,486	20,56	14,73	22,64	4,3	0,005	0
	142	0,525	20,38	14,50	20,56	1,9	0,106	0,005
B	44	0,580	13,13	9,40	11,61	0	0	0
	93	0,514	22,58	16,17	17,66	5,1	0	0
	118	0,478	21,85	16,65	24,87	6,2	0,020	0,031
	142	0,507	20,75	14,86	20,03	5,1	0,100	0,125

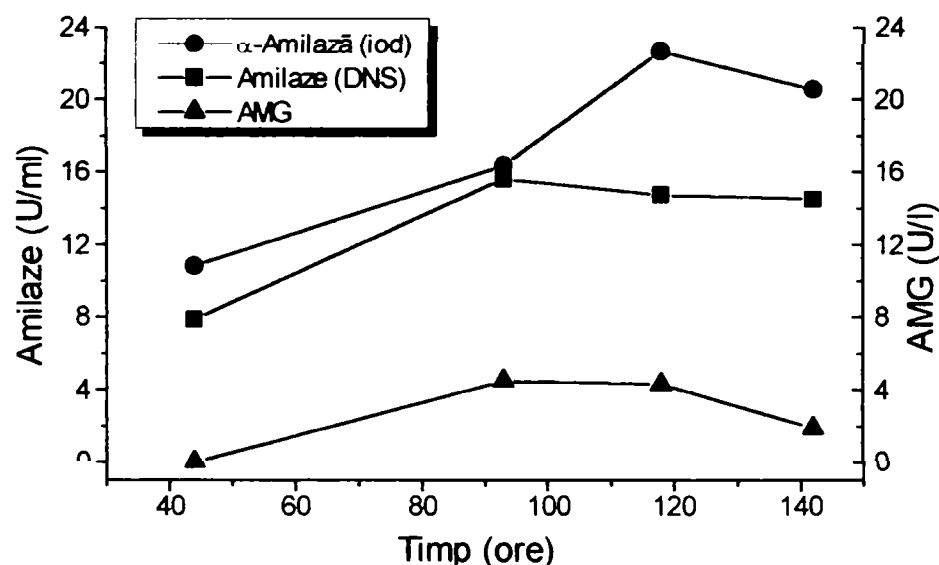


Figura 4.1. Cinetica biosintezei enzimelor amilolitice în flacoane (cultura A)

Tabel 4.9. Randamentul per gram substanță uscată

Mediu uscat g	Volum filtrat ml	α-Amilază			Amiloglucozidază		
		U/ml	U <sub>totale</sub>	U/g mediu uscat	U/ml	U <sub>totale</sub>	U/g mediu uscat
7,5	200	24	4800	640	0,005	1,02	0,136



În condițiile culturii submerse în flacoane are loc o acumulare de amilaze (DNS) până la un timp 93 de ore de dezvoltare a microorganismului, după care cantitatea rămâne constantă, scăzând ușor la perioade mai mari de 120 ore. Creșterea cea mai pronunțată a conținutului de  $\alpha$ -amilază are loc între 44-93 ore, apoi o creștere mai lentă între 93 și 118 ore, în timp ce amiloglucozidaza apare în mediu în cantități mici după 90 ore și se menține în continuare aproximativ constantă. Transglucozidaza apare în mediu la sfârșitul perioadei de biosinteză, după 118 ore, ajungând după 142 ore la o valoare de 0,1 U/ml. Biosinteza proteazelor are loc după 142 ore de aerare, în cantități neglijabile. O bună aerare întârzie producerea de proteaze și transglucozidaze, de aceea se indică biosinteza amilazelor în sisteme bine aerate.

În concluzie, în primele 93 ore de incubare are loc o creștere constantă a activității amilazice, după care aceasta se stabilizează și începe biosinteza de transglucozidaze și proteaze. Este indicată deci oprirea biosintezei după atingerea maximumului de amilaze, după 93 de ore în cazul cultivării în flacoane cu mediu submers, evitându-se contaminarea cu enzime nedorite (protează, transglucozidază) și pierderea de activitate amilazică.

#### 4.1.2.3. Biosinteza în bioreactor

Pe baza rezultatelor obținute prin cultivarea tulpinii de *Aspergillus oryzae* în flacoane, s-a realizat experimentarea la scară de micropilot, în bioreactor, când se asigură o aerare și o agitare mult superioare celor din flacoanele agitate pe masa vibratoare.

Instalația utilizată pentru biosinteza enzimelor amilolitice este prezentată în figura 4.2.

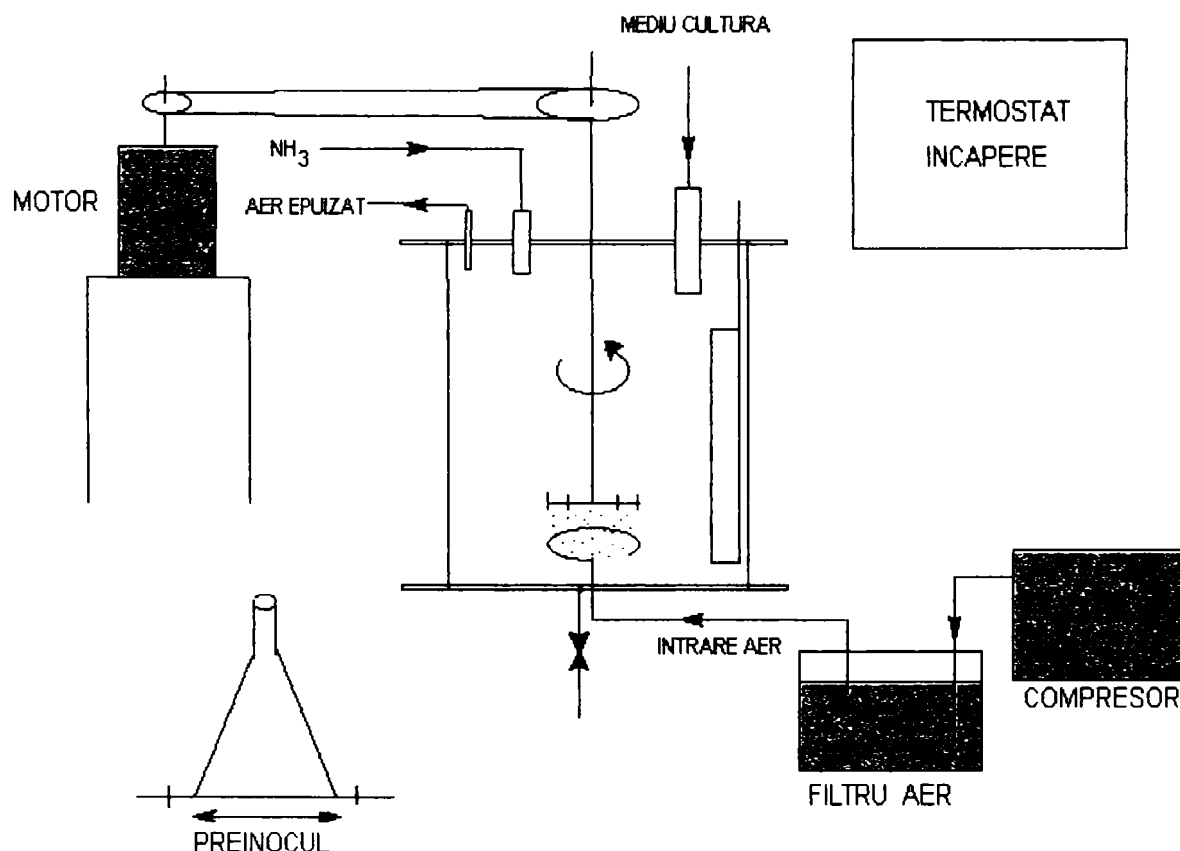


Figura 4.2. Instalația de biosinteză a enzimelor amilolitice

S-a utilizat un reactor de sticlă de capacitate de 10 l, prevăzut cu un agitator cu palete drepte, turație variabilă (motor de 0,37 kW), aerare reglabilă la partea inferioară cu aer sterilizat (filme sterile de cărbune și vată de sticlă) furnizat de un compresor și termostatare (prin plasare într-o cameră termostată la 30°C). Capacul inferior este prevăzut cu un dispozitiv de golire și luat probe, iar cel superior cu dispozitiv de introducere a amoniacului pentru corectarea pH-ului, dispozitiv de evacuare a aerului rezidual și orificiu pentru introducerea mediului de cultură. Bioreactorul a fost sterilizat chimic (apă oxigenată 30%, 2 h) și termic (abur, 1 h la 2 atm., de două ori în interval de 24 h).

S-a utilizat mediul de cultură standardizat anterior (capitol 4.1.1.2). Inocularea s-a efectuat folosind un preinocul. Metoda este avantajoasă deoarece microorganismul fiind în fază vegetativă, se elimină faza de log în dezvoltarea în preinocul, astfel că în bioreactor evoluția are loc rapid, preîntâmpinând eventuala dezvoltare a altor microorganisme. De asemenea, creșterea microorganismului pe un mediu identic cu cel din fermentator are și un efect inductor asupra biosintezei enzimaticе. În tabelul 4.10 se prezintă schema procesului de dezvoltare a microorganismului de la tulpina liofilizată în tub la nivel de reactor. Pentru pornirea culturii, se corelează ultima sterilizare termică a bioreactorului cu ultima sterilizare a mediului de cultură și cu împlinirea celor 24 ore de dezvoltare a preinoculului.

Tabel 4.10. Schema procesului de dezvoltare a microorganismului<sup>a</sup>

Faza	Ziua								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cultura pe tuburi Sabouraud	D	D	D	D	D	D	D↓I		
Preinocul						S	S	D↓I	
Mediu de cultură pt. reactor							S	S↓I	
Reactor						S	S	S	D

<sup>a</sup>D-dezvoltare, S-sterilizare, I-inoculare

S-a urmărit dezvoltarea miceliului la microscop și cinetica producerii de enzime prin prelevare de probe și analiza lor: pH, conținut în proteine, activitate amilazică, proteazică și transglucozidazică. Observațiile microscopice au arătat o dezvoltare intensă a ciupercii după 8 ore de la pornirea experimentului, când s-au format flocoane de micelii care s-au mărit continuu, astfel că după 16 ore miceliul a devenit continuu, împânzind toată masa de cultură. Dezvoltarea culturii a determinat o scădere a pH-ului, în intervalul de ore de cultură 12-24. Cultura a fost lăsată să se dezvolte până nu a mai avut loc creșterea activității enzimaticе.

În tabelul 4.11 sunt prezentate valorile zahărului reducător din mediul de cultură în timpul biosintezei. Se observă apariția unui maxim la 16 ore, valoare ce este în concordanță și cu dezvoltarea maximă a microorganismului, observată la microscop.

Tabel 4.11. Variația zahărului reducător în timp

Timp (ore)	12	16	20	24	28	32	36	40	44
Zahăr reducător (μmol glucoză)	25,9	35,0	22,9	8,7	6,2	2,5	1,2	0	0

Cinetica dezvoltării microorganismului și a biosintezei enzimatică este prezentată în tabelul 4.12 și figura 4.3.

Tabel 4.12. Cinetica dezvoltării microorganismului și a biosintezei enzimatică în culturi submerse în reactor

Timp ore	pH	Amilaze DNS U/ml	Amilaze I <sub>2</sub> U/ml	Amiloglucozidază U/l	Proteine U/ml
12	4,3*	8,01	6,72	3,2	0,867
16	4,2*	8,42	6,88	14,7	0,803
20	4,2*	8,34	5,64	26,0	0,735
24	4,6	10,27	9,10	29,0	0,843
28	4,8	13,73	12,27	34,0	0,764
32	4,9	19,38	12,20	35,2	0,832
36	4,9	24,75	19,79	53,1	0,971
40	4,9	29,37	21,09	48,6	0,775
44	4,9	25,14	27,12	57,0	0,714
48	4,9	36,04	28,27	53,1	0,732
52	4,9	36,04	28,05	58,0	0,846
53,5	4,9	33,07	28,88	55,0	0,803

\*corecție la pH 4,6-4,9 cu soluție NH<sub>4</sub>OH 25 %.

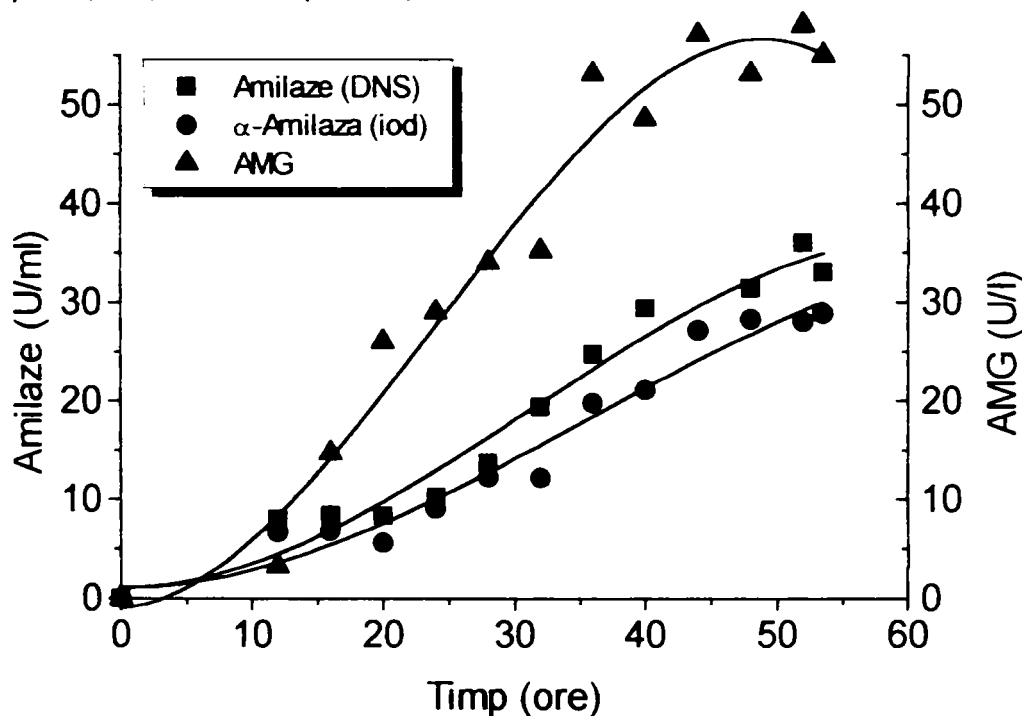


Figura 4.3. Cinetica biosintezei enzimelor amilolitice în bioreactor

După cum se observă în tabelul 4.12, prin cultivarea submersă în bioreactor a microorganismului *Aspergillus oryzae* se obțin enzime amilolitice în cantități mai mari decât în cazul cultivării în flacoane. O creștere spectaculoasă se observă în cazul amiloglucozidazei, a cărei concentrație în mediul de cultură crește de aproape 10 ori.

Acest lucru demonstrează puternica dependență a biosintezei amiloglucozidazei de aerarea mediului de biosinteză.  $\alpha$ -Amilaza se obține de asemenea într-o concentrație de 1,5 ori mai mare decât în flacoane, fapt ce arată, și în acest caz, efectul pozitiv al aerării. În schimb, enzimele impurificatoare (transglucozidaza și proteaza) nu sunt produse de microorganism în aceste condiții. În cursul biosintezei se constată și o scădere a pH-ului mediului de cultură, acidifiere ce a înregistrat un maxim la 16 ore, observație ce coincide cu dezvoltarea microorganismului. În ceea ce privește conținutul în proteine, acesta a rămas în principiu constant în cursul biosintezei.

Din figura 4.3 se observă că biosinteza enzimelor prezintă un profil logaritmic. Astfel, după o dezvoltare lentă de 8-12 ore, are loc o creștere rapidă a concentrației  $\alpha$ -amilazei între 12-44 ore și respectiv a amiloglucozidazei între 12-36 ore, urmată de o perioadă de aplatizare a creșterii activității enzimaticice, pentru ca după 52 ore, activitatea ambelor enzime să scadă lent. Rezultă deci că biosinteza maximă se atinge după 52 ore în cazul cultivării submerse în bioreactor, față de 118 ore în cazul flacoanelor agitate, fapt ce se poate explica prin influența majoră a aerării mediului.

În concluzie, aerarea mai bună rezultată din insuflarea de aer și agitarea mecanică puternică produce atât o creștere puternică a randamentului în enzyme cât și o reducere de 2 ori a timpului de biosinteză. Spre deosebire de cultura în flacoane agitate, unde mediul de cultură își păstrează pH-ul până la sfârșitul perioadei de biosinteză, în cazul cultivării în bioreactor are loc o acidifiere a mediului cu un maxim de 16 ore de biosinteză. Pentru buna desfășurare a procesului de biosinteză, această scădere a pH-ului mediului trebuie să fie corectată, cel mai bun agent de neutralizare fiind o soluție de amoniac 25%.

În tabelul 4.13 sunt prezentate randamentele pe mediu uscat în  $\alpha$ -amilază și amiloglucozidază. Prin filtrarea mediului de cultură prin hârtie de filtru industrială la trompă de apă, la sfârșitul perioadei de biosinteză, s-au obținut 3.000 ml filtrat limpede, de culoare galbenă. Volumul mic de filtrat comparativ cu cel obținut la filtrarea mediilor din flacoane se datorează pierderii de lichid prin antrenare cu aer în timpul biosintezei, ceea ce concordă cu datele de literatură care menționează pierderi de 15-20% din volumul total în 24 ore în cazul procedurii de insuflare cu aer.

Tabel 4.13. Comparatie între randamentul per gram mediu uscat la cultura în flacoane și în bioreactor

Cultura	Mediu uscat, g	Volum filtrat, ml	$\alpha$ -Amilază			Amiloglucozidază		
			U/ml	U <sub>tot</sub>	U/g <sub>mediu uscat</sub>	U/ml	U <sub>tot</sub>	U/g <sub>mediu uscat</sub>
Flacoane	7,5	200	24	4800	640	0,005	1,02	0,136
Bioreactor	150,0	3000	36	108000	720	0,058	174,0	1,160

Se constată că deși au existat pierderi substanțiale de lichid prin antrenare, randamentele în mediu uscat, în cazul culturii în bioreactor, sunt mult mai bune decât în cazul culturii în flacoane.

#### 4.1.2.4. Separarea enzimelor amilolitice din mediul de cultură brut de *Aspergillus oryzae*

Metodele de purificare ale enzimelor din extractul brut sunt extrem de variate:

- precipitare cu săruri anorganice
- precipitare cu solvenți organici
- precipitare cu polimeri organici
- precipitare prin denaturare selectivă
- separare prin cromatografie de schimb ionic
- separare prin cromatografie de afinitate
- gel filtrare
- partiție în fază lichidă
- ultrafiltrare
- metode electroforetice, etc.

În general, dacă nu este necesară o purificare avansată a enzimei, se folosește doar o treaptă de purificare, mai ales precipitarea. În scopuri medicale sau de cercetare fundamentală, etc., sunt folosite enzime de puritate înaltă, ajungând până la o singură bandă electroforetică. Acest lucru se poate realiza numai prin combinarea mai multor tehnici de purificare, ceea ce duce implicit la creșterea prețului de cost. În industrie în general nu este necesară o puritate mare a enzimelor.

S-a testat extragerea și purificarea enzimelor amilolitice prin precipitare cu acetonă și respectiv sulfat de amoniu. Deși metoda nu duce la obținerea unor precipitate cu puritate avansată, ea este accesibilă și permite, pe cât este posibil, înlăturarea unor componente nedorite, în speță transglucozidaza și proteaza.

##### a) Precipitarea cu acetonă

Moleculele proteice sunt polielectroliți care în apă se găsesc în soluție. Constanta dielectrică mare a apei (aproximativ 80) micșorează forțele de atracție dintre sarcinile de semn contrar de la suprafața proteinelor. Prin adăugarea unui solvent organic, constanta dielectrică a mediului scade, crescând forțele de atracție dintre moleculele proteice, până când acestea se agregă și precipită din soluție. Pe lângă acest efect, solventul organic contribuie la precipitarea proteinelor și prin efectul lui deshidratant, interacționând cu moleculele apei care hidratează moleculele proteice prin interacții ion-dipol. Această interacție fiind un proces exoterm, operația de precipitare se efectuează la temperaturi sub 0°C. Datorită faptului că diferitele molecule proteice au sarcini electrice diferite, ele vor precipita la constante dielectrice diferite ale mediului, astfel că prin adăugarea treptată a unui solvent cu constantă dielectrică mică, proteinele vor fi precipitate pe rând, la diferite concentrații de solvent. Cei mai utilizați solvenți sunt etanolul ( $D=25,0$ ) și, mai ales, acetona ( $D=20,7$ ), care realizează un interval mare între constanta lor dielectrică și cea a apei, ceea ce permite fracționarea a cât mai multe specii proteice.

##### b) Precipitarea cu sulfat de amoniu

Cea de-a doua metodă utilizată a fost precipitarea cu ajutorul concentrațiilor mari de săruri. Ionii sării îndepărtează o mare parte din moleculele de apă care în mod obișnuit hidratează suprafața proteinelor, fenomen care duce în final la precipitarea acestora din soluție. Fenomenul de precipitare este reversibil. Condițiile ca o sare neutră să fie un agent eficace de precipitare sunt:

- să nu interacționeze chimic cu proteina,



- să nu producă la dizolvare dereglări de temperatură sau de pH,
- să prezinte o solubilitate mare în apă, pentru a permite obținerea unei game largi de concentrații la care să precipite diferențiat proteinele din amestec.

Sulfatul de amoniu este cel mai des utilizat în acest scop, având o solubilitate foarte mare (70,6 g/100 ml, la 0°C) și având un efect protector asupra multor proteine cu funcții biologice.

După precipitarea cu acetonă sau sulfat de amoniu, precipitatul a fost separat prin centrifugare (precipitare 1, 2, 3) sau filtrare (precipitare 4). Activitatea enzimatică și conținutul în proteine din extractul brut și din diversele fracțiuni sunt prezentate în tabelele 4.14, 4.15 și 4.16.

**La precipitarea cu acetonă** (precipitare 1, tabel 4.14), randamentul de regăsire al proteinelor în fracțiunile până la 75% a fost sub 25%. Restul proteinelor au fost denaturate sau au rămas în supernatantul de la ultima precipitare (75% acetonă).  $\alpha$ -Amilaza s-a regăsit în procent de 45% în fracția 30-60% acetonă, în schimb amiloglucozidaza a apărut în toate fracțiunile de precipitare în acetonă. Factorul de purificare (F.P.) a fost în jur de 5 pentru ambele enzime.

Transglucozidaza este în mare parte denaturată. Cantități mici (sub 12% în total) se regăsesc în fracțiunile 30-60% și 60-75% acetonă, fapt îmbucurător, dat fiind efectul ei catalitic, opus amilazelor.

În schimb, proteazele nu au fost denaturate prin precipitare cu acetonă și ele se regăsesc în toate fracțiile de precipitare, în speță în fracția 0-30% acetonă (52%). Faptul este nedorit, deoarece prezența proteazelor duce la denaturarea amilazelor.

**La precipitarea fracționată cu sulfat de amoniu** (precipitare 2, tabel 4.15), 85% din activitatea amilazică se regăsește în fracția 60-90% saturație sulfat de amoniu, randament de recuperare aproape dublu față de cel obținut la precipitarea cu acetonă (45%). Factorul de purificare 5 este de asemenea foarte bun.

Amiloglucozidaza însă este în cea mai mare parte denaturată în acest proces. Porțiunea nendenaturată se regăsește în fracțiile 30-90%.

Transglucozidaza, mai puțin denaturată ca în cazul precipitării cu acetonă, s-a regăsit (36%) în fracțiile 30-90% saturație sulfat de amoniu.

Rezultatul cel mai bun s-a obținut în cazul proteazelor, care au fost înlăturate complet.

Dintre cele două variante de precipitare testate, precipitarea cu sulfat de amoniu s-a dovedit a fi cea mai bună, deoarece randamentul de recuperare al amilazelor este foarte mare iar proteazele sunt complet înlăturate. La aceasta se adaugă faptul că manipularea sulfatului de amoniu este mult mai ușoară decât cea a acetonei. Manipularea solvenților implică vase mai mari, instalație antiex, precum și necesitatea recuperării prin distilare fracționată.

Deoarece amilazele s-au regăsit în fracția 60-90% saturație sulfat de amoniu iar amiloglucozidaza a apărut în toate fracțiile de precipitare, în continuare extractul brut obținut în urma fermentației în flacoane (precipitare 3), respectiv în fermentator (precipitare 4) s-a precipitat direct la 90% saturație (tabel 4.16).

După cum se observă în tabelul 4.16, apar diferențe datorate atât modului de cultură (în flacoane sau fermentator) cât și modalității de separare a precipitatului (centrifugare sau filtrare).

Cultura în fermentator duce la activități amilazice și conținut în proteine aproape dublu față de cultura în flacoane, ceea ce era și de așteptat, datorită agitării și aerării mai eficiente.

La separarea precipitatului prin centrifugare (precipitare 3) are loc antrenarea unei cantități mari de sulfat de amoniu, ceea ce duce la obținerea unui preparat enzimatic solid în cantitate mare, dar cu o activitate specifică mică.

Prin filtrare (precipitare 4), s-a obținut o cantitate mică de produs (de 27 ori mai mică decât la centrifugare), dar cu activitate amilazică specifică foarte mare (de 80 ori mai mare decât în cazul centrifugării). Randamentele de recuperare a activității amilazice au fost apropiate ca valoare, ușor mai ridicate pentru cultura în fermentator și filtrare.

Se pare că prin filtrare se pierde cea mai mare parte din amiloglucozidază (aprox. 78%). În schimb, transglucozidaza este complet înlăturată, spre deosebire de procedeul cu centrifugare, la care transglucozidaza se regăsește în întregime, fapt total nedorit. Proteazele nu apar în nici unul dintre cazuri, ceea ce s-a și urmărit.

Tabel 4.14. Precipitarea fracționată cu acetonă (precipitare 1)

Enzima	Unitate	Extract brut (100 ml)	Fracția 0-30% (10 ml)	Fracția 30-60% (10 ml)	Fracția 60-75% (10 ml)
Proteine	mg/ml	0,47	0,09	0,46	0,59
	mg <sub>tot</sub>	46,80	0,93	4,61	5,89
	η	100,00	1,98	9,85	12,58
α-Amilază (I <sub>2</sub> )	U/ml	11,93	2,42	53,91	1,50
	U/mg	25,49	26,02	116,94	2,54
	F.P.	1,00	1,02	4,57	0,10
	U <sub>tot</sub>	1193,00	24,20	539,10	15,00
	η	100,00	2,03	45,70	1,26
Amilaze (DNS)	U/ml	11,75	2,01	33,93	0,65
	U/mg	25,11	21,61	73,60	1,10
	F.P.	1,00	0,86	2,93	0,04
	U <sub>tot</sub>	175,00	201,00	339,30	6,50
	η	100,00	17,10	27,10	0,55
Amiloglucozidază	U/ml. 10 <sup>-3</sup>	6,4	7,00	23,00	16,00
	U/mg. 10 <sup>-3</sup>	13,7	75,00	49,80	27,00
	F.P.	1,0	5,44	3,60	1,97
	U <sub>tot</sub>	0,9	0,07	0,23	0,16
	η	100,0	7,80	25,66	17,85
Transglucozidază	U/ml	0,31	0	0,41	0,10
	U/mg	0,67	-	0,89	0,17
	F.P.	1,00	-	1,34	0,25
	U <sub>tot</sub>	43,68	-	4,12	0,10
	η	100,00	-	9,40	2,28
Proteaze	U/ml	0,01	0,08	0,04	0,01
	U/mg	0,03	0,84	0,09	0,02
	F.P.	1,00	26,20	2,78	0,79
	U <sub>tot</sub>	1,50	0,78	0,41	0,15
	η	100,00	52,00	27,30	10,00

Tabel 4.15. Precipitarea fracționată cu sulfat de amoniu (precipitare 2)

Enzima	Unitate	Extract brut (100 ml)	Fracția 0-30% (10 ml)	Fracția 30-60% (10 ml)	Fracția 60-90% (10 ml)
Proteine	mg/ml	0,47	0,20	0,27	1,11
	mg <sub>tot</sub>	65,52	2,03	2,68	11,14
	η	100,00	3,10	4,10	17,00
α-Amilază (I <sub>2</sub> )	U/ml	11,93	2,62	2,27	143,40
	U/mg	25,49	26,02	8,47	128,70
	F.P.	1,00	1,02	0,33	5,04
	U <sub>tot</sub>	1193,00	24,20	22,70	1434,00
	η	100,00	2,03	1,36	85,50
Amilaze (DNS)	U/ml	11,75	3,49	2,52	142,5
	U/mg	25,11	17,61	9,40	127,8
	F.P.	1,00	0,68	0,37	5,1
	U <sub>tot</sub>	1764,00	34,90	25,20	1425,0
	η	100,00	2,12	1,53	86,6
Amiloglucozidază	U/ml. 10 <sup>-3</sup>	6,40	0,30	6,40	4,50
	U/mg. 10 <sup>-3</sup>	13,70	1,50	23,80	4,00
	F.P.	1,00	0,11	1,74	0,29
	U <sub>tot</sub>	0,90	0,003	0,06	0,04
	η	100,00	0,33	7,10	5,02
Transglucozidază	U/ml	0,31	-	0,69	0,90
	U/mg	0,67	-	2,58	0,81
	F.P.	1,00	-	3,87	1,21
	U <sub>tot</sub>	43,68	-	6,92	9,04
	η	100,00	-	15,80	20,60
Proteaze	U/ml	-	-	-	-
	U/mg	-	-	-	-
	F.P.	-	-	-	-
	U <sub>tot</sub>	-	-	-	-
	η	-	-	-	-

Tabel 4.16. Precipitarea cu 90% saturație sulfat de amoniu (precipitare 3 și 4)

Enzima	Unitate	Cultură 1 (precipitare 3)		Cultură 2 (precipitare 4)	
		Extract brut (1000 ml)	0-90% (13,5 g)	Extract brut (1000 ml)	0-90% (1,4 g)
Proteine	mg/ml mg/mg	0,5	0,01	0,8	0,5
	mg <sub>tot</sub>	468,0	162,0	2336,7	667,9
	η	100,0	34,6	100,0	28,6
α-Amilază (I <sub>2</sub> )	U/ml U/mg	11,9	0,7	28,9	52,7
	U/mg	25,5	54,9	35,9	112,2
	F.P.	1,0	2,1	1,0	3,1
	U <sub>tot</sub>	11930,0	8896,5	84040,8	74915,1
	η	100,0	75,0	100,0	89,1
Amilaze (DNS)	U/ml U/mg	11,7	0,6	33,1	51,4
	U/mg	25,1	50,3	41,2	109,4
	F.P.	1,0	2,0	1,0	2,6
	U <sub>tot</sub>	1750,0	8154,0	96233,7	73039,4
	η	100,0	69,4	100,0	75,9
AMG	U/ml U/mg	0,006	0,5	0,055	0,02
	U/mg	0,013	0,4	0,068	0,14
	F.P.	1,0	3,1	1,0	2,1
	U <sub>tot</sub>	6,4	6,6	160,1	34,5
	η	100,0	103,0	100,0	21,6
TG	U/ml U/mg	0,31	78,4	0,06	-
	U/mg	312,0	9,8	174,6	-
	F.P.	1,0	1058,4	1,0	-
	U <sub>tot</sub>	0,66	6,5	0,07	-
	η	100,0	339,0	100,0	-
Proteaze	U/ml U/mg	-			

### 4.1.3. Obținerea de amilaze din culturi de suprafață de *A. oryzae* 242

S-au realizat trei culturi identice de *A. oryzae*, a câte două tăvi fiecare. Conținutul în proteine, activitatea amilazică, amiloglucozidazică și proteazică pentru extractul brut și produsul enzimatic solid obținut prin precipitare cu sulfat de amoniu fracția 30-90% saturație sunt prezentate în tabelele 4.17 și 4.18, iar randamentele de recuperare și factorii de purificare față de extractul brut în tabelul 4.19.

Tabel 4.17. Analiza extractului brut obținut din culturi de suprafață de *A. oryzae* 242

Nr. cultură	Volum ml	Proteine mg/ml	Amilaze (I <sub>2</sub> )		AMG		Proteaze	
			U/ml	U/mg	U/ml	U/mg	U/ml	U/mg
1	10500	2,99	14,41	4,82	0,52	0,17	0,09	0,03
2	11400	3,12	15,89	5,09	0,49	0,16	0,11	0,03
3	10780	3,05	15,38	5,04	0,48	0,16	0,08	0,02

Tabel 4.18. Analiza produsului enzimatic solid obținut din culturi de suprafață de *A. oryzae* 242

Nr. cultură	Masa g	Proteine mg/mg	Amilaze (I <sub>2</sub> )		AMG		Proteaze
			U/mg <sub>p</sub> *	U/g**	U/mg <sub>p</sub> *	U/g**	U/g**
1	45,0	0,24	12,63	3031	0,017	4,00	50,61
2	63,3	0,16	10,95	1752	0,039	4,09	-
3	58,4	0,21	10,76	2259	0,025	5,25	25,20

\*U/mg<sub>p</sub>- unități enzimaticice per mg proteină;

\*\*U/g - unități enzimaticice per g produs.

Tabel 4.19. Recuperarea și purificarea enzimelor din culturi de suprafață de *A. oryzae* 242 prin precipitare cu sulfat de amoniu, fracțiunea 30-90% saturație

Nr. cultură	Proteine η <sub>rec</sub> (%)	Amilaze (I <sub>2</sub> )		Amiloglucozidază	
		F.P.	η <sub>rec</sub> (%)	F.P.	η <sub>rec</sub> (%)
1	34,41	2,62	90,51	0,10	3,34
2	28,47	2,15	60,14	0,24	6,87
3	37,30	2,13	79,57	0,15	5,92

Se observă că în cazul culturii 2 s-a obținut cea mai mare cantitate de produs solid, dar cu o activitate amilazică și un randament de recuperare al enzimelor mai scăzut. Aceasta se datorează probabil faptului că precipitarea cu sulfat de amoniu a fost făcută mai rapid și la temperatură mai ridicată decât în cazul celorlalte culturi.

Amilazele sunt recuperate în proporție de 80-90%, în schimb amiloglucozidaza se dovedește a fi o enzimă foarte sensibilă, în urma precipitării fracționate pierzându-se peste 90% din activitatea inițială. S-au obținut produse solide cu o activitate amilazică mare (2000-3000 U/g), precum și activitate amiloglucozidazică apreciabilă (4-5 U/g).



#### 4.1.4. Concluzii privind obținerea și purificarea amilazelor din culturi de *Aspergillus oryzae*

1. S-au testat tulpini de *Aspergillus oryzae* din colecții de microorganisme, adaptate pentru producția de amilaze. Tulpina cea mai înalt producătoare de amilaze este *Aspergillus oryzae* 242.

2. S-a standardizat mediul de cultură și timpul de biosinteză pentru *A. oryzae* 242 prin cultivare submersă în flacoane agitate, la 30°C. Astfel, mediul optim de cultură este compus din mălai 20 g, făină fasole 3,2 g, tărâțe grâu 7 g, CaCl<sub>2</sub> 0,5 g și KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g la un litru de mediu cu pH 4,8. Biosinteza maximă a enzimelor a fost atinsă după 93 de ore, când s-au obținut 22 U/ml α-amilază și 0,0051 U/ml amiloglucozidază. Producerea proteazelor în mediu a fost complet inhibată, iar producerea transglucozidazelor a început după ce s-a atins nivelul maxim de biosinteză al amilazelor.

3. S-au standardizat condițiile de cultură ale *A. oryzae* și s-a stabilit cinetica biosintezei amilazelor la nivel de bioreactor de 10 l, cu agitare mecanică și insuflare de aer. Însămânțarea se face cu preinocul de cultură submersă de *A. o.* în vârstă de 24 de ore pe același mediu de cultură cu cel din reactor. Volumul preinoculului a fost de 10% din volumul reactorului. Timpul optim de biosinteză a fost de 52 ore la 30°C și un volum de aer de 1-1,5 V/V<sub>mediu</sub>. S-a obținut un complex enzimatic care conține 36 U/ml α-amilază și 0,058 U/ml AMG, de 1,6 respectiv 10 ori mai mult decât la cultura în flacoane.

4. S-a testat inocularea mediului de cultură submers cu inocul de spori de pe tuburi cu mediu Sabouraud și cu inocul de cultură *A. oryzae* dezvoltat pe mediu solid, obținându-se rezultate asemănătoare. Mediul de cultură solid a fost compus din mălai și tărâțe. Acest lucru permite folosirea procedurii de inoculare în fermentator cu inocul de *A. o.* pe mediu solid în tăvi.

5. Tulpina de *A. oryzae* 242 se dezvoltă repede în cultură submersă, atingând un maxim de dezvoltare la 16 ore, iar mediul solid sporulează după 72 ore, această dezvoltare rapidă prevenind apariția infecțiilor cu alte microorganisme.

6. Pentru determinarea activității transglucozidazice, s-a sintetizat fenil-α-D-glucopiranoza în trei etape, pornind de la glucoză.

7. Pentru obținerea unui preparat amilazic parțial purificat s-a ales precipitarea cu sulfat de amoniu față de cea cu acetonă, fiind mai accesibilă, mai ieftină și cu randamente mai mari în amilaze.

6. Se recomandă precipitarea directă cu 90% saturație sulfat de amoniu pentru a cuprinde în precipitat și amiloglucozidaza, enzimă care nu se fracționează.

7. Se recomandă filtrarea precipitatului pe hârtie de filtru și nu centrifugarea sa, deoarece rezultă un produs mai pur, cu activitate specifică amilazică mult mai mare și este înlăturată transglucozidaza. De asemenea procedeul filtrării este mai ieftin decât centrifugarea.

8. La obținerea de amilaze din *Aspergillus oryzae* 242 prin culturi de suprafață s-au obținut produse solide cu o activitate amilazică mare, 2000-3000 U/g, precum și activitate amiloglucozidazică de 4-5 U/g. La separarea produsului prin precipitare fracționată cu sulfat de amoniu 30-90% saturație, amilazele sunt recuperate proporție de 80-90%. Amiloglucozidaza însă este puternic inactivată.

## 4.2. Obținerea și purificarea amiloglucozidazei din culturi de *A. niger*

Deoarece tulpinile de *Aspergillus oryzae* produc în special  $\alpha$ -amilază și mai puțină amiloglucozidază, s-a urmărit găsirea unor tulpini care să producă amiloglucozidază. În general, tulpinile de *Aspergillus niger* sunt cunoscute și utilizate ca producătoare ale acestei enzime.

În acest scop s-au testat o serie de tulpini de *A. oryzae* și *A. niger*, urmărind producția de  $\alpha$ -amilază, amiloglucozidază, transglucozidază și protează [4.9, 4.10]. În testarea tulpinilor s-au avut în vedere observațiile făcute în cazul testărilor anterioare.

### 4.2.1. Selecționarea tulpinilor de *Aspergillus* producătoare de AMG

Se cunoaște că genul *Aspergillus* se dezvoltă extrem de bine pe mediu solid. În acest caz, după perioada de incubare este necesară o fază de extracție a enzimelor din mediul de cultură.

În cazul dezvoltării tulpinilor pe mediu lichid, faza de extracție este eliminată, dar se pare că în acest caz producția de enzime este mai mică, obținându-se un extract brut mai diluat. Având în vedere acest lucru, testările tulpinilor s-au realizat atât pe mediu lichid cât și pe mediu solid.

#### 4.2.1.1. Testarea tulpinilor de *Aspergillus* pe mediu de cultură lichid

##### 4.2.1.1.1. Biosinteza în flacoane

Tulpinile utilizate s-au găsit fie sub formă liofilizată fie sub formă sporulată pe mediu Sabouraud inclinat. În primă fază s-a executat regenerarea tulpinilor, prin pasarea lor pe mediu de cultură lichid, de unde au fost trecute pe mediu solid inclinat, de trei ori. Pentru o sporulare mai rapidă, s-a utilizat mediul extract de malț-agar. Sporii obținuți pe mediu solid inclinat au fost utilizați ca inocul pentru mediile de cultură naturale (cap.6.2.2.1.a).

Testarea potențialului de biosinteză s-a efectuat prin cultivarea tulpinilor de *Aspergillus* pe 250 ml mediu natural de cultură alcătuit din tărâțe de grâu, făină de porumb și soia,  $\text{CaCl}_2$  și  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (cap. 6.2.2.1.b).

S-a realizat un prim test prin sterilizarea mediului de cultură din flacoane la 1 bar (1h, de două ori în 24h). S-a urmărit pH-ul în filtrate și aspectul miceliului la microscop. Deoarece majoritatea mediilor de cultură au fost infectate cu bacili și coci, testul s-a repetat în aceleași condiții, dar sterilizarea s-a realizat la 2 bari (1h, de două ori în 24 h). În acest caz sterilizarea a fost mai eficace și nu a mai apărut infectarea cu tulpini străine.

S-au urmărit pH-ul, conținutul în proteine, activitatea amilazică, amiloglucozidazică, transglucozidazică și proteazică, atât în timpul biosintezei, cât și în filtratul final.

După cum se observă din tabelul 4.20 și figura 4.4, cantitatea cea mai mare de amiloglucozidază a fost produsă de tulpinile *A. niger* IC, IC 106 și *A. niger* Pasteur. Cantitatea de amiloglucozidază produsă de *A. niger* este mai mare decât cea produsă de *A. oryzae* 242 și 376 în culturi submerse, în schimb cantitatea de  $\alpha$ -amilază a fost inferioară. În filtrate a fost decelată prezența activității transglucozidace, în schimb proteazele sunt absente.

S-a încercat în continuare reducerea componentelor de cultură pentru scăderea costurilor. Mediul de cultură folosit a avut următoarea compoziție:

- 7,5 g porumb măcinat grosier
- 200 ml apă de robinet, pH 4,6-4,9 (corectat cu HCl 0,1 N).

Tabel 4.20. Activitatea enzimatică a culturilor de *Aspergillus* pe mediu lichid.

Nr. crt.	Tulpina	Proteine mg/ml	Amilaze (I <sub>2</sub> ) U/ml	Amilaze (DNS) U/ml	AMG U/ml	TG U/ml	Proteaze U/ml
1.	<i>A.oryzae</i> 242	0,80	39,64	34,66	0,06	0,04	-
2.	<i>A.oryzae</i> 376	0,90	3,74	3,33	0,06	0,03	-
3.	<i>A.niger</i> IC	1,06	0,27	0,49	0,49	0,02	-
4.	<i>A.niger</i> IC-ATCC	0,88	0,29	0,07	0,06	0,04	-
5.	<i>A.niger</i> IC 106	1,04	0,44	0,49	0,58	0,03	-
6.	<i>A.niger</i> Solventul	0,69	0,86	2,29	0,32	0,07	-
7.	<i>A.niger</i> Pasteur	0,82	0,10	0,40	0,65	0,07	-
8.	<i>A.niger</i> ICEBIOL	0,97	0,43	0,89	0,14	0,02	0,01
9.	<i>A.niger</i> 349	0,82	0,91	2,67	0,19	-	-
10.	<i>A.niger</i> Z <sub>1</sub>	0,84	0,17	0,09	0,08	0,08	0,10

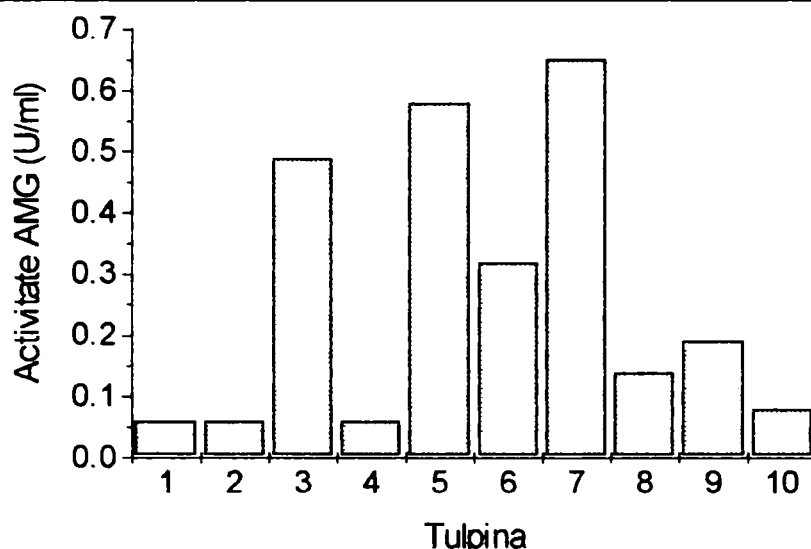


Figura 4.4. Activitatea AMG la cultivarea unor tulpini de *Aspergillus* pe mediu lichid: 1) *A.oryzae* 242; 2) *A.oryzae* 376; 3) *A.niger* IC; 4) *A.niger* IC-ATCC; 5) *A.niger* IC 106; 6) *A.niger* Solventul; 7) *A.niger* Pasteur; 8) *A.niger* ICEBIOL; 9) *A.niger* 349; 10) *A.niger* Z<sub>1</sub>.

S-au realizat două teste, în modul descris mai sus (cap. 6.2.2.1.b), fiecare cultură realizându-se în dublu exemplar. În primul au fost cultivate tulpini de *A. niger* IC, *A. niger* IC-6, *A. niger* Solventul, *A. niger* Pasteur și *A. niger* TIM-1. În al doilea au fost cultivate tulpini de *A. oryzae* 242 (pentru a-i testa potențialul enzimatic pe acest mediu sărac), *A. niger* Solventul (pentru verificare) și *A. niger* TIM-6. Conținutul în proteine, activitatea amilazică, amiloglucozidazică și proteazică sunt prezentate în tabelele 4.21 și 4.22.

Nici una dintre tulpini nu a prezentat activitate proteazică, cu excepția tulpinii de *A. oryzae* 242 (0,02-0,03 U/ml, 0,02-0,04 U/mg la 44 ore timp de fermentație). Toate tulpinile de *A. niger* au prezentat activitate amiloglucozidazică, însă mult inferioară activității la cultivarea pe mediu standardizat. Activitatea cea mai mare s-a observat în cazul tulpinii *A. niger* Solventul, însă și ea inferioară activității determinate pe mediul utilizat anterior. Tulpina *A. oryzae* 242 nu prezintă pe acest mediu sărac activitate amiloglucozidazică, iar activitatea amilazică, deși este mai mare decât la *A.niger* Solventul, este totuși de aproximativ 2 ori mai mică decât cea dezvoltată la cultivarea pe mediul descris anterior.

În concluzie, reducerea componentelor mediului de cultură nu este justificată, deoarece aduce după sine pierdere de activitate, atât amilazică cât și amiloglucozidazică.

Tabel 4.21. Activitatea enzimatică pentru testul 1

Tulpina	Timp Ore	Proteine mg/ml		AMG				Amilaze (I <sub>2</sub> )				Amilaze (DNS)			
				U/ml		U/mg		U/ml		U/mg		U/ml		U/mg	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>A. niger</i> IC	24	0,52	0,79	0,026	0,029	0,049	0,037	-	-	-	-	2,00	2,31	3,83	2,92
	46	0,72	1,17	0,054	0,047	0,076	0,040	0,06	0,15	0,08	0,13	7,58	10,47	10,56	8,96
	68	0,71	1,08	0,012	0,022	0,018	0,021	0,02	0,10	0,03	0,09	5,71	6,60	8,00	6,13
<i>A. niger</i> IC-6	24	0,55	0,71	0,006	0,013	0,011	0,018	0,50	0,11	0,90	0,15	2,13	1,85	3,84	2,61
	46	1,14	1,13	0,056	0,052	0,048	0,046	0,08	-	0,07	-	5,58	5,45	4,89	4,82
	68	1,13	1,09	0,026	0,014	0,023	0,012	0,06	0,08	0,05	0,08	3,26	3,70	2,88	3,39
<i>A. niger</i> Solventul	24	0,64	0,60	-	0,073	-	0,122	0,84	0,87	1,32	1,46	14,14	14,02	22,28	23,44
	46	0,78	0,78	0,103	0,093	0,132	0,120	0,26	0,45	0,34	0,58	11,58	10,02	14,91	12,89
	68	0,75	0,78	0,047	0,043	0,063	0,053	0,38	0,25	0,51	0,32	6,90	5,81	9,14	7,43
<i>A. niger</i> Pasteur	24	0,44	0,56	0,010	0,008	0,023	0,015	0,56	0,58	1,27	1,04	2,78	2,50	6,29	4,44
	46	0,54	0,88	0,015	0,031	0,028	0,035	-	0,31	-	0,35	1,04	4,40	1,80	4,96
	68	0,56	0,98	0,011	0,009	0,020	0,010	0,05	0,19	0,08	0,19	0,66	1,43	1,18	1,45
<i>A. niger</i> TIM-1	24	0,58	0,61	0,041	0,034	0,071	0,056	0,26	0,29	0,45	0,48	1,74	-	3,01	-
	46	0,86	0,90	0,042	0,041	0,048	0,045	-	-	-	-	2,85	4,55	3,30	5,04
	68	0,80	0,74	0,019	0,010	0,024	0,014	0,02	0,11	0,03	0,15	3,68	2,32	4,60	3,15

Tabel 4.22. Activitatea enzimatică pentru testul 2.

Tulpina	Timp Ore	Proteine		Amiloglucozidază				Amilaze (I <sub>2</sub> )				Amilaze (DNS)			
		mg/ml		U/ml		U/mg		U/ml		U/mg		U/ml		U/mg	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
A. oryzae 242	22	0,51	0,48	-	0,001	-	0,002	1,15	0,92	2,25	1,92	13,00	11,90	25,49	24,79
	44	0,67	0,73	0,004	0,001	0,006	0,001	0,50	0,78	0,75	1,52	7,89	7,66	11,76	10,49
A. niger Solventul	22	0,88	0,89	0,089	0,029	0,101	0,032	0,23	0,27	0,26	0,29	15,66	13,70	17,79	15,39
	44	0,77	0,71	0,010	0,212	0,013	0,262	0,29	0,38	0,38	0,47	10,36	11,19	13,45	13,81
A. niger TIM-6	22	0,68	0,71	0,025	0,076	0,037	0,107	0,23	0,13	0,34	0,18	13,66	13,09	20,09	18,44
	44	0,67	0,64	0,008	0,077	0,012	0,120	0,18	0,17	0,27	0,26	7,60	6,75	11,34	10,55



#### 4.2.1.1.2. Biosinteza în bioreactor

A fost utilizat mediul de cultură alcătuit din tărâțe de grâu, făină de porumb și soia,  $\text{CaCl}_2$  și  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , deoarece la testările inițiale a dat rezultatele cele mai bune (cap. 6.2.2.1.b). Pregătirea mediului, a inoculului, a fermentatorului, cultura în fermentator și prelucrarea mediului de cultură s-au realizat ca și în cazul tulpinii de *A. oryzae* 242 (cap. 6.2.1.1.5). Au fost realizate trei culturi de *A. niger* IC în aceleași condiții: A, B și C. În cazul culturii A nu s-a corectat pH-ul, iar în cazul culturii B aerarea a fost redusă, iar pH-ul mediului a fost menținut la 4,6-5,0 (soluție NaOH).

Rezultatele obținute în cazul culturilor submerse A, B și C sunt prezentate în tabelele 4.23, 4.24 și 4.25 și în figurile 4.5, 4.6 și 4.7.

Tabel 4.23. Cultura submersă A de *A. niger* IC

Timp ore	pH	Proteine mg/ml	Amiloglucozidază U/ml	Amilaze ( $I_2$ ) U/ml
22	3,0	0,701	0,0057	0,094
24	2,5	0,778	0,0019	0,104
16	2,0	0,834	0,0045	0,095
28	2,0	0,899	0,0102	0,123
30	1,5	0,959	0,0134	0,116
32	1,0*	0,916	0,0128	0,171
34	3,0	0,826	0,0288	0,244
36	3,0	0,826	0,0243	0,288
38	3,5	0,813	0,0281	0,263
40	3,5	0,878	0,0288	0,204

\*pH-ul a fost corectat la 3 cu NaOH

Tabel 4.24. Cultura submersă B de *A. niger* IC

Timp ore	pH	Proteine mg/ml	Amiloglucozidază U/ml	Amilaze ( $I_2$ ) U/ml
27	4,0	0,62	0,025	0,082
29	4,0	0,62	0,044	0,145
31	4,5	0,63	0,105	0,260
33	5,0	0,66	0,109	0,239
35	4,5	0,66	0,099	0,291
37	4,8	0,70	0,110	0,251

Tabel 4.25. Cultura submersă C de *A. niger* IC

Timp ore	Proteine mg/ml	Amiloglucozidază U/ml	Amilaze (I <sub>2</sub> ) U/ml	Amilaze (DNS) U/ml
27	0,61	0,022	0,08	0,10
29	0,62	0,046	0,14	0,21
31	0,63	0,098	0,26	0,35
33	0,65	0,105	0,27	0,41
35	0,68	0,108	0,29	0,43
37	0,71	0,112	0,13	0,37

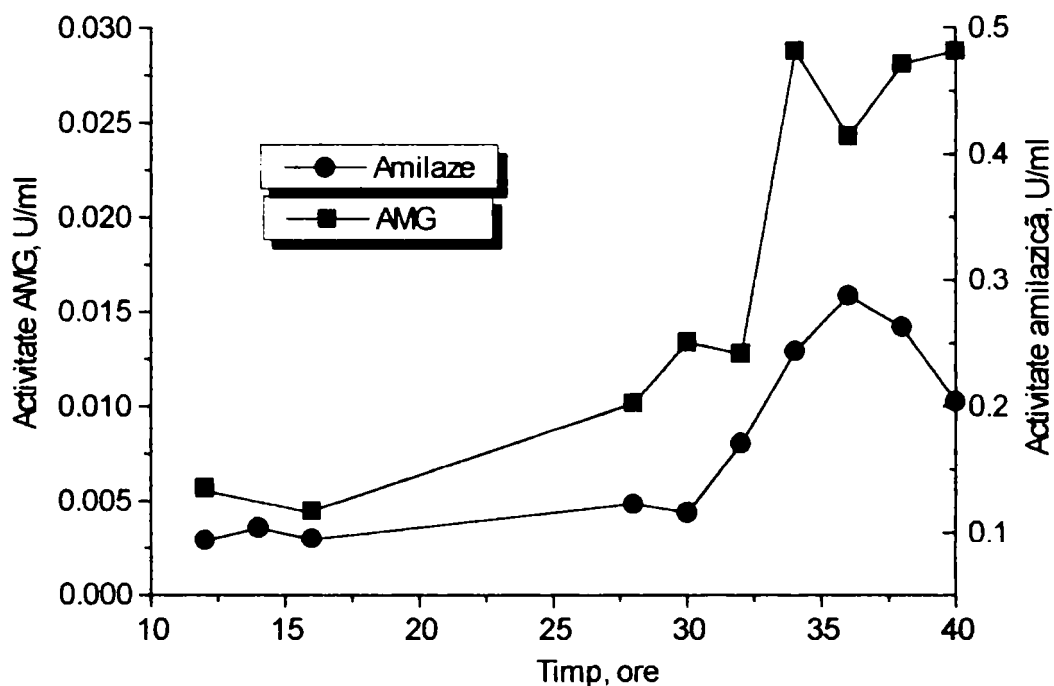


Figura 4.5. Cultura submersă A de *A. niger* IC

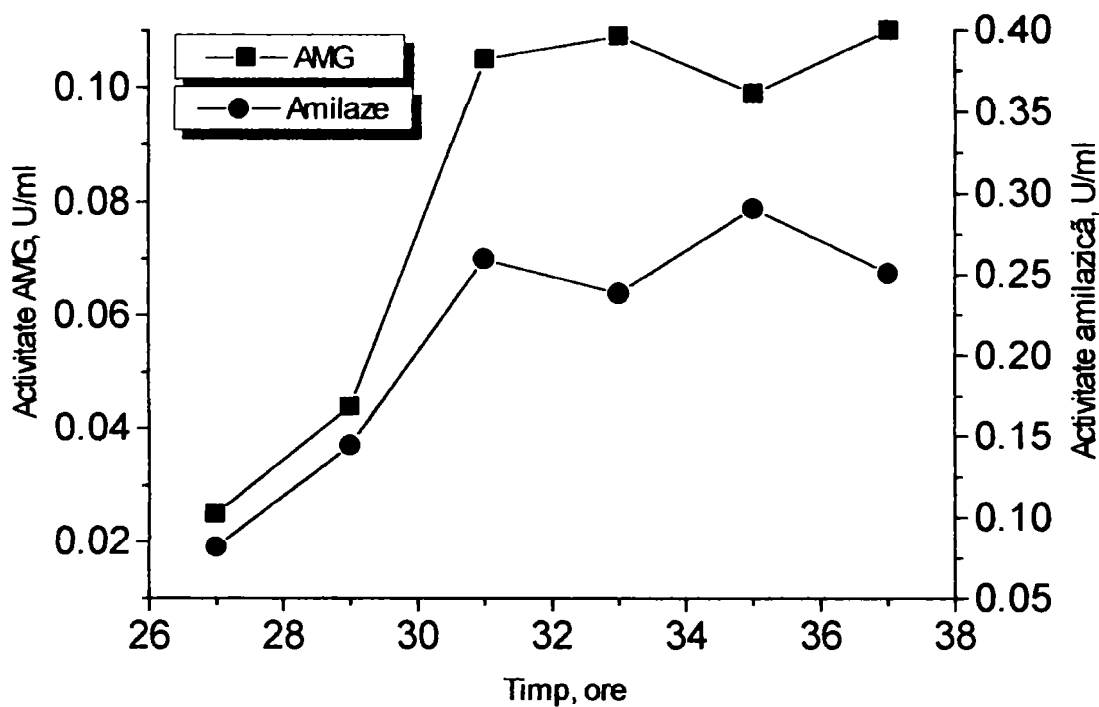
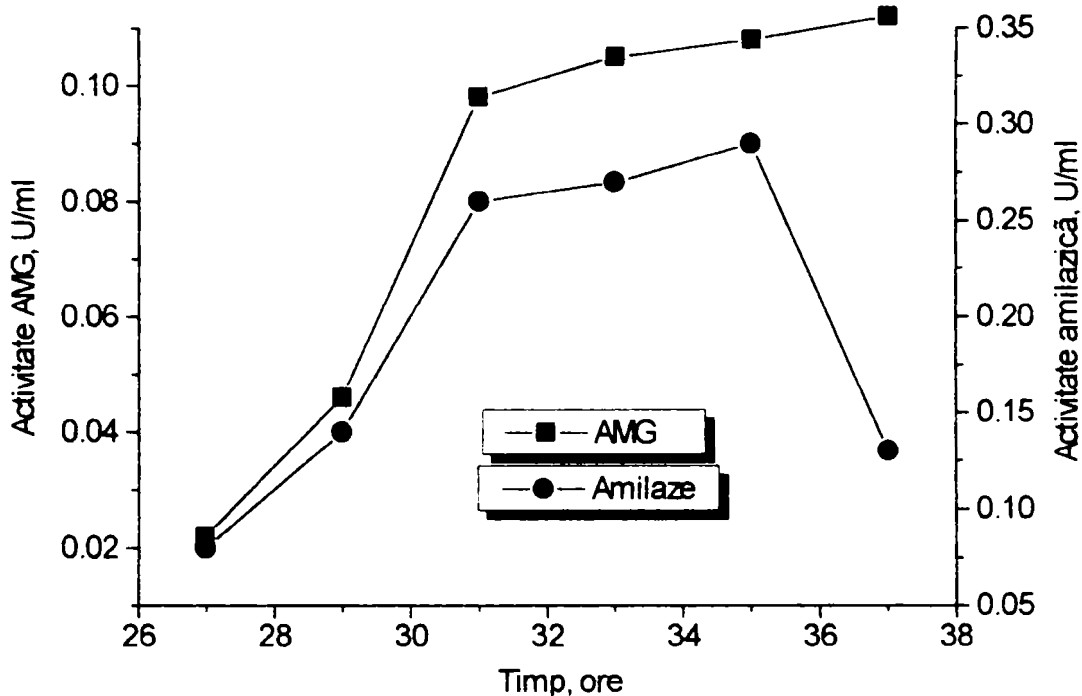


Figura 4.6. Cultura submersă B de *A. niger* IC


 Figura 4.7. Cultura submersă C de *A. niger* IC

Se observă că în cazul culturii A, producția de amilaze prezintă o creștere până la 36 de ore de incubare, apoi scade. Activitatea amiloglucozidazică crește până la valori de 0,024-0,028 U/ml după 34 ore, apoi se stabilizează. Totuși, această activitate este foarte mică.

În cazul culturii B, după 31 de ore, activitatea amiloglucozidazică s-a stabilizat în jurul valorii de 0,1 U/ml, activitate de 3,5 ori mai mare decât în cazul culturii A, dar tot de un nivel scăzut.

Cultura C s-a urmărit la timpii de secreție maximă a enzimei. S-au obținut activități comparative cu cele din cazurile anterioare. Producția maximă de amilaze (0,29 U/ml la metoda cu iod și 0,43 U/ml la metoda cu DNS) a fost la 35 de ore de cultivare a tulpinii. Activitatea AMG a crescut brusc după 31 de ore și a atins valoarea maximă de 0,112 U/ml.

#### 4.2.1.1.3. Separarea enzimelor amilolitice din mediul de cultură de *Aspergillus niger*

Culturile au fost prelucrate în continuare (cap. 6.2.1.1.5.). S-a obținut un preparat proteic solid prin precipitare cu sulfat de amoniu, fracțiunea 30-90%. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele 4.26 și 4.27.

 Tabel 4.26. Analiza produsului enzimatic solid la culturile submerse de *A. niger* IC

Cultura	Masa g	Proteine mg/mg	Amiloglucozidază		Amilaze (I <sub>2</sub> )	
			U/mg <sub>prot</sub>	U/g <sub>solid</sub>	U/mg <sub>prot</sub>	U/g <sub>solid</sub>
<i>A. niger</i> IC A	33,66	0,035	0,076	2,60	3,26	115,0
<i>A. niger</i> IC B	49,14	0,024	0,095	2,28	3,86	92,6

Tabel 4.27. Recuperarea și purificarea enzimelor la culturile submerse de *A. niger* IC

Cultura	Proteine $\eta_{rec}$ (%)	Amiloglucozidază		Amilaze ( $I_2$ )	
		F. P.	$\eta_{rec}$ (%)	F. P.	$\eta_{rec}$ (%)
<i>A. niger</i> IC A	33,41	1,33	43,68	1,70	57,16
<i>A. niger</i> IC B	40,83	1,22	49,97	2,18	88,70

Culturile în mediu submers au dat activități relativ mici. În continuare s-a realizat testarea acestor tulpini pe mediu de cultură solid, în vederea obținerii de activități amiloglucozidazice mai mari.

#### 4.2.2. Testarea tulinilor de *Aspergillus niger* pe mediu de cultură solid

##### 4.2.2.1. Biosinteza în flacoane

Testarea s-a realizat prin cultivarea pe un mediu natural de cultură, compus din tărâțe de grâu și făină de porumb, în flacoane conice de 1 l. Conținutul în proteine și activitatea amilazică, amiloglucozidazică, proteazică și transglucozidazică sunt prezentate în tabelul 4.28.

Tabel 4.28. Activitatea enzimatică a culturilor pe mediu solid în flacoane

Nr. Crt	Tulpina	Proteine mg/ml	Amilaze ( $I_2$ ) U/ml	Amilaze(DNS) U/ml	AMG U/ml	TG U/ml	Proteaze U/ml
1.	<i>A. niger</i> IC	2,66	1,77	0,81	0,68	0,11	-
2.	<i>A. niger</i> IC-ATCC	2,16	0,60	0,40	0,14	0,38	-
3.	<i>A. niger</i> IC-106	2,53	1,81	0,93	0,62	0,41	-
4.	<i>A. niger</i> Solventul	2,10	3,16	1,61	0,28	0,32	-
5.	<i>A. niger</i> Pasteur	2,91	0,76	0,89	0,24	0,62	0,03
6.	<i>A. niger</i> ICEBIOL	2,36	1,31	0,73	0,58	0,28	-
7.	<i>A. niger</i> 349	2,18	3,43	1,80	0,22	0,28	-

Tulpinile de *A. niger* IC, *A. niger* IC 106 și *A. niger* Pasteur, care au prezentat activitate amiloglucozidazică pe mediu lichid, își păstrează potențialul biochimic și pe mediu solid. În plus, tulpina de *A. niger* ICEBIOL a prezentat o activitate amiloglucozidazică crescută de 4 ori.

Tulpina de *A. niger* IC a fost selectată pentru producția de amiloglucozidază pentru că a prezentat în mediul de cultură cea mai redusă cantitate de transglucozidază și nu a secretat proteaze.

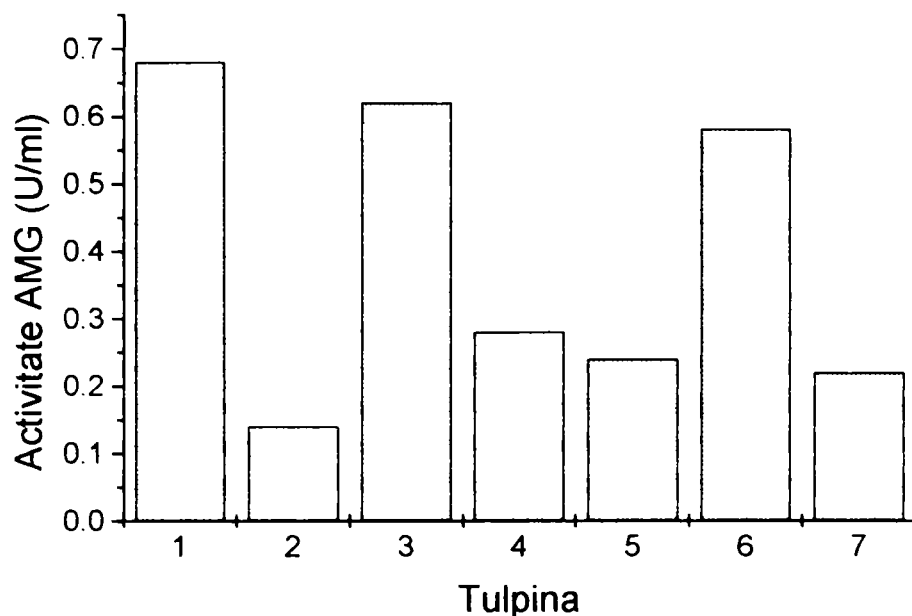


Figura 4.8. Activitatea AMG la cultivarea unor tulpini de *Aspergillus niger* pe mediu de cultură solid: 1) *A. niger* IC; 2) *A. niger* IC-ATCC; 3) *A. niger* IC-106; 4) *A. niger* Solventul; 5) *A. niger* Pasteur; 6) *A. niger* ICEBIOL 7) *A. niger* 349.

#### 4.2.2.2. Biosinteza în tăvi

S-au realizat două culturi identice de *A. niger* IC pe câte o singură tavă (cap. 6.2.2.2.2). Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 4.29 iar randamentele de recuperare a activității enzimatică și factorii de purificare în tabelul 4.30.

Tabel 4.29. Analiza produselor solide obținute prin precipitare cu sulfat de amoniu din culturi de suprafață de *A. niger* IC

Nr. cult.	Masa mg	Proteine mg/ml	Amilaze (I <sub>2</sub> ) U/ml	Amilaze (DNS) U/ml	AMG U/ml	TG U/ml	Proteaze U/ml
1	9948	0,336	0,109	-	0,280	0,030	0,170
2	14963	0,234	0,090	0,027	0,153	0,040	-
3	10260	0,340	0,109		0,272		-
4	14960	0,241	0,094		0,158		-

Tabel 4.30. Randamentele de recuperare și factorii de purificare pentru culturile solide de *A. niger* IC

Nr. cult.	Amilaze (I <sub>2</sub> )		Amiloglucozidază	
	$\eta_{rec}$ (%)	F.P.	$\eta_{rec}$ (%)	F.P.
1	36,8	1,35	77,7	2,88
2	53,3	2,60	51,2	2,65
3	36,3	1,33	81,1	2,96
4	54,2	2,60	55,6	2,64



Produsele solide obținute din culturile de *A. niger* IC au prezentat o activitate amiloglucozidazică de 150-280 U/g, mai mare ca cea obținută de *A. oryzae* 242 (cap. 4.2.3.). Randamentele de recuperare (30-50% pentru amilaze și 50-70% pentru amiloglucozidază) sunt inferioare celor obținute pentru culturile de *A. oryzae* 242.

#### 4.2.3. Concluzii privind obținerea și purificarea amiloglucozidazei din culturi de *Aspergillus niger*

1. La cultivarea tulpinilor de *A. niger* pe un mediu natural de cultură compus din făină porumb, tărâțe grâu, făină soia,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  și apă de fântână, cantitatea cea mai mare de amiloglucozidază a fost produsă de tulpinile *A. niger* IC, *A. niger* IC 106 și *A. niger* Pasteur. Cantitatea de amiloglucozidază produsă de *A. niger* a fost mai mare decât cea produsă de *A. oryzae* 242 și 376, în schimb cantitatea de  $\alpha$ -amilază a fost inferioară. În filtrate a fost decelată prezența activității transglucozidazice, în schimb proteazele sunt absente.

2. La utilizarea unui mediu de cultură sărac, compus din porumb măcinat grosier și apă de robinet, toate tulpinile de *A. niger* testate au prezentat activitate AMG, însă mult inferioară activității la cultivarea pe mediu standardizat. Tulpina *A. oryzae* 242 nu prezintă pe acest mediu sărac activitate amiloglucozidazică, iar activitatea amilazică a fost de 2 ori mai mică decât cea dezvoltată la cultivarea pe mediul de cultură optimizat.

3. La cultivarea tulpinii de *A. niger* IC pe mediul de cultură standardizat, în bioreactor, cantitatea maximă de amilaze (0,29 U/ml la metoda cu iod și 0,43 U/ml la metoda cu DNS) a fost obținută la 35 de ore de cultivare, iar activitatea AMG a crescut brusc după 31 de ore și a atins valoarea maximă de 0,112 U/ml. Prin precipitare cu sulfat de amoniu 30-90% saturație, s-a obținut un preparat proteic solid cu o activitate amiloglucozidazică de 2,3-2,6 U/g, cu un factor de purificare de 1,2-1,3 și un randament de recuperare al activității enzimice de 44-50%.

4. La cultivarea tulpinii de *A. niger* IC pe mediu de cultură solid, în tăvi, s-a obținut un preparat enzimatic cu o activitate amiloglucozidazică de 150-280 U/g, mai mare ca cea obținută de *A. oryzae* 242 (cap. 4.2.3.), dar cu randamente de recuperare (30-50% pentru amilaze și 50-70% pentru amiloglucozidază) inferioare celor obținute pentru culturile de *A. oryzae* 242.

### 4.3. Determinarea parametrilor optimi de acțiune și a stabilității preparatelor enzimatic purificate obținute din culturi de *A. oryzae* și *A. niger*

Utilizarea preparatului enzimatic purificat obținut cu activitate amilazică și amiloglucozidazică în zaharificarea amidonului implică cunoașterea parametrilor optimi de acțiune ai enzimelor. Pentru aceasta s-a studiat experimental influența pH-ului, a temperaturii și a ionilor asupra activității precum și stabilitatea la pH, temperatură și păstrare [4.11, 4.12]. În studiile de determinare a parametrilor optimi de acțiune și de stabilitate s-au utilizat:

- un preparat enzimatic solid obținut din *Aspergillus oryzae* 242 cu activitate amilazică (2,126 mg/ml, în apă, 11,43 U/mg) și activitate amiloglucozidazică (10 mg/ml, în apă, 9,92 U/g);
- un preparat enzimatic solid din *Aspergillus niger* IC obținut prin cultură submersă, cu activitate AMG (10 mg/ml, în apă, 256,5 U/g).

#### 4.3.1. Influența pH-ului asupra activității amilazice și amiloglucozidazice

Variația pH-ul mediului de reacție influențează atât activitatea cât și stabilitatea enzimelor, deoarece poate afecta conformația și/sau starea de ionizare a grupărilor funcționale acide și bazice ale situsului activ sau a altor părți din apoenzimă. Noua conformație sau distribuție de sarcină poate să corespundă sau nu unei enzime active și poate modifica sau nu selectivitatea de substrat. Dependența vitezei de reacție de pH este de obicei o curbă sub formă de clopot. pH-ul corespunzător maximului curbei se numește pH optim. Punctele de inflexiune ale curbei corespund valorilor pK ale unor grupări funcționale cu rol esențial în cataliză. Majoritatea enzimelor prezintă un pH optim în domeniul 5-9. pH-ul poate afecta de asemenea starea de ionizare a reactanților, precum și posibilele reacții secundare.

Activitatea amilazică și amiloglucozidazică s-au determinat în condiții standard, variindu-se pH-ul în domeniul 2,6-8,0, prin utilizarea de tamponi citrat-fosfat de diverse pH-uri (cap. 6.2.3.1.). Rezultatele obținute pentru preparatele din *A. oryzae* și din *A. niger* sunt prezentate în tabelele 4.31 și 4.32 și în figurile 4.9 și 4.10.

$\alpha$ -Amilaza prezintă o activitate maximă la pH 4,6. Activitatea scade foarte mult la pH-uri acide (<3,5) și alcaline (>6,0), fiind de numai 26% la pH 2,6, respectiv 13,5% la pH 8,0, din activitatea maximă.

Amiloglucozidaza este mai puțin sensibilă ca  $\alpha$ -amilaza la influența pH-ului. Enzima prezintă activitate maximă într-un domeniu de pH mai larg (pH 4,6-5,6). Scăderea activității la valori acide, respectiv alcaline este mai lentă, fiind de 60% (pH 2,6) respectiv de 57,6% (pH 8,0) din activitatea maximă.

Ambele enzime prezente în preparatul enzimatic au activitate maximă la același pH. pH-ul optim de zaharificare a amidonului este 4,6. Trebuie evitate variații mari de pH, atât în domeniu acid cât și alcalin, care ar determina inactivarea  $\alpha$ -amilazei și scăderea cu aprox. 40% a activității amiloglucozidazei. Se admit variații de pH în domeniul 4,6-5,6, domeniu în care activitatea ambelor enzime este peste 80% din activitatea maximă.

În cazul preparatului de *A. niger*, activitatea AMG scade încet în domeniul acid. Activitatea relativă la pH 3,0 este 62,6% din activitatea maximă. Activitatea scade rapid în mediu bazic, fiind 8,3% la pH 8,0. Enzima își menține peste 80% din activitate în domeniul de pH de 4,0-6,0.

Domeniul optim de pH pentru activitatea amiloglucozidazică este 4,5-5,0 și este identic cu domeniul de pH optim pentru preparatul enzimatic de *A. oryzae*. Deci, ambele preparate pot fi utilizate în procesul de zaharificare al amidonului în același domeniu de pH, 4,5-5,0.

Tabel 4.31. Influența pH-ului asupra activității preparatului enzimatic de *A. oryzae*

Nr. crt.	pH	Activitate amilazică			Activitate AMG	
		U/ml	U/mg	%	U/g	%
1	2,6	6,59	3,10	27,12	5,97	60,18
2	3,0	9,68	4,55	39,81	5,57	56,15
3	3,6	15,55	7,32	64,04	7,97	80,24
4	4,0	21,22	9,98	87,31	8,87	89,41
5	4,6	24,31	11,43	100,00	9,92	100,00
6	5,0	23,18	10,90	95,36	9,87	99,50
7	5,6	20,19	9,50	83,11	9,92	100,00
8	6,0	15,55	7,32	64,04	9,38	94,55
9	6,6	10,09	4,75	41,56	8,61	86,79
10	7,0	5,25	2,42	21,61	7,20	72,58
11	7,6	2,78	1,31	11,46	5,45	55,34
12	8,0	3,30	1,55	13,56	5,72	57,66

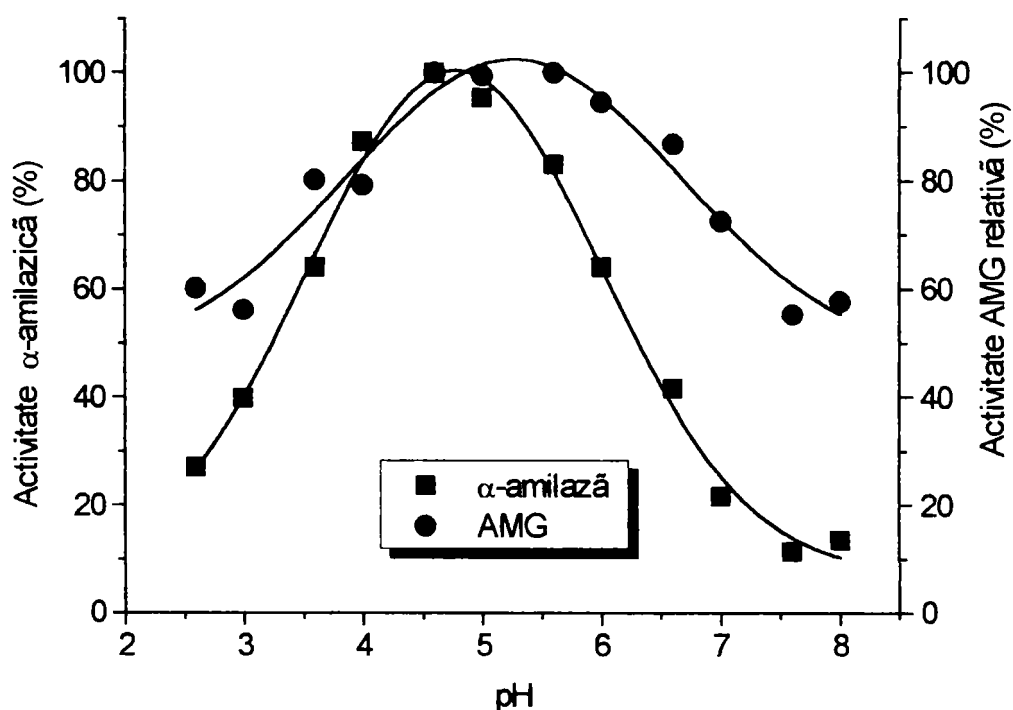


Figura 4.9. Efectul pH-ului asupra activității amilazice și amiloglucozidazice a preparatului de *A. oryzae*.

Tabel 4.32. Influența pH-ului asupra activității preparatului enzimatic de *A. niger*.

Nr. crt.	pH	Activitate AMG	
		U/g	%
1	3,0	140,2	62,56
2	3,5	162,6	72,56
3	4,0	169,6	75,68
4	4,5	224,1	100,00
5	5,0	223,4	99,69
6	5,5	198,5	88,58
7	6,0	167,7	74,83
8	6,5	126,1	56,27
9	7,0	89,7	36,01
10	7,5	46,7	20,84
11	8,0	18,6	8,28

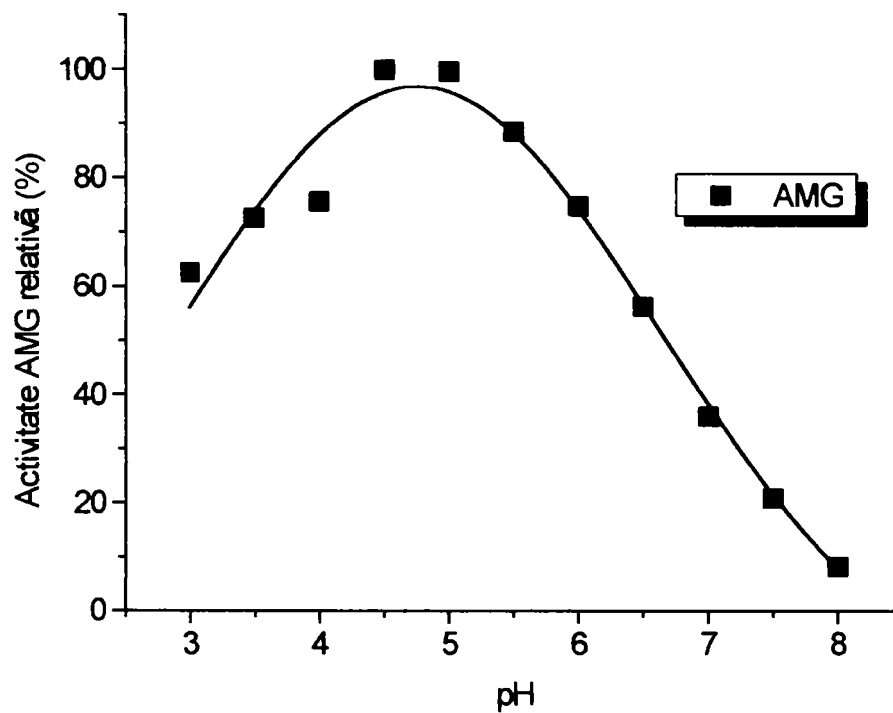


Figura 4.10. Efectul pH-ului asupra activității amiloglucozidazice a preparatului enzimatic de *A. niger*

#### 4.4.2. Influența temperaturii asupra activității amilazice și amiloglucozidazice

Viteza reacțiilor enzimatică crește cu temperatura, pe intervalul de temperatură în care enzima este stabilă și își păstrează întreaga activitate. Peste temperatura optimă, activitatea scade, datorită denaturării termice. Temperatura influențează viteza reacțiilor enzimatică modificând stabilitatea enzimei, afinitatea enzimei pentru substrat, viteza de scindare a complexului enzimă-substrat, etc. De aceea este importantă cunoașterea temperaturii optime de acțiune.

Activitatea amilazică și amiloglucozidazică s-au determinat în condiții standard, în intervalul de 25-80°C (cap. 4.1.5) (tabelele 4.33, 4.34 și figurile 4.11, 4.12).

În cazul preparatului de *A. oryzae*, activitatea crește până la temperatura optimă, 50°C pentru  $\alpha$ -amilază și 60°C pentru amiloglucozidază, apoi scade brusc, datorită denaturării termice a proteinei. La 80°C, activitatea  $\alpha$ -amilazică a fost de 3,88 U/mg (13,6% din maxim), iar activitatea AMG de 2,01 U/g (6,45% activitate relativă). La temperatura optimă, activitatea celor două enzime este de 2,47 și respectiv 5,47 ori mai mare față de cea la 25°C. Domeniul de temperatură optim este 45-60°C. Se recomandă totuși păstrarea temperaturii într-un domeniu mai îngust, de 50-55°C, domeniu în care activitatea catalitică a ambelor enzime este apropiată de valorile maxime.

Temperatura afectează puternic activitatea amiloglucozidazică a preparatului de *A. niger*. Activitatea crește până la 65°C, apoi scade brusc, datorită denaturării termice. La 78°C, activitatea AMG a fost de 55,7 U/g, adică 5,7% din activitatea maximă. Activitatea la temperatura optimă (65°C) este de 4,4 ori mai mare decât cea din condiții standard (37°C). Activitatea catalitică a preparatului enzimatic este mare în domeniul 50-70°C, dar domeniul de 60-65°C este mai recomandat, deoarece în acest domeniu activitatea AMG este cea mai apropiată de valoarea maximă.

Tabel 4.33. Influența temperaturii asupra activității preparatului enzimatic de *A. oryzae*

Nr. crt.	Temperatura °C	Activitate amilazică			Activitate AMG	
		U/ml	U/mg	%	U/g	%
1	25	24,45	11,50	40,38	5,41	17,39
2	30	30,06	14,14	49,65	6,07	19,50
3	35	36,20	17,03	59,79	8,39	26,95
4	40	45,15	21,24	74,58	11,95	38,39
5	45	53,16	25,00	87,78	15,56	49,98
6	50	60,54	28,48	100,00	21,74	69,84
7	55	55,55	26,13	91,75	25,41	81,62
8	60	43,48	20,45	71,80	31,13	100,00
9	65	29,57	13,92	48,87	20,71	66,53
10	70	16,33	7,68	26,96	9,71	31,19
11	80	8,24	3,88	13,62	2,01	6,46



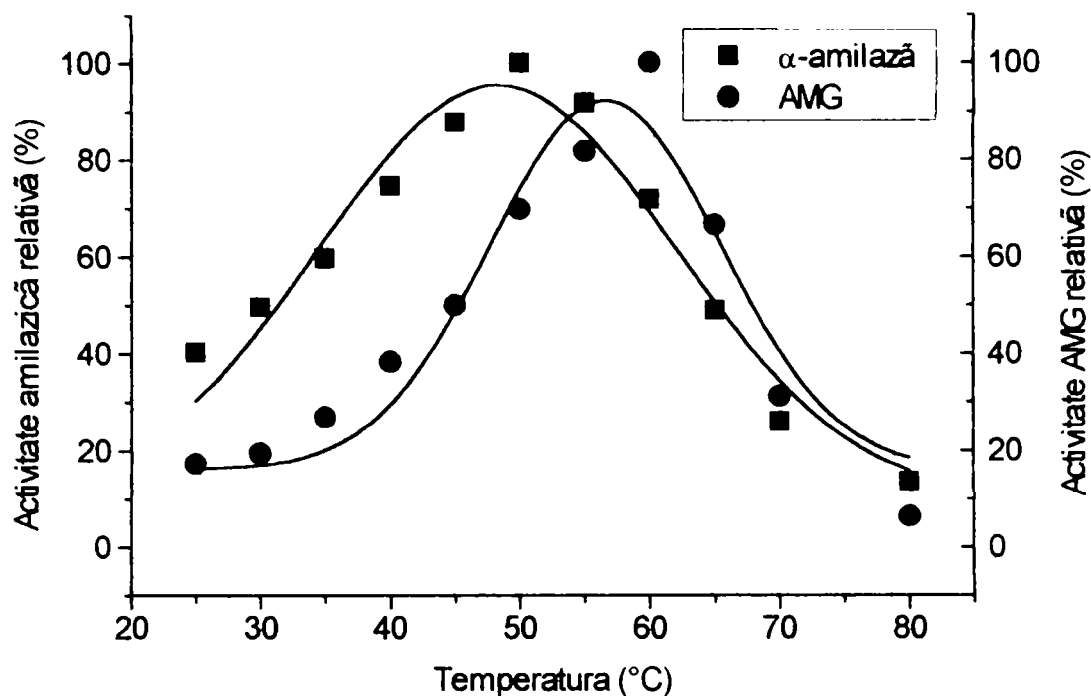


Figura 4.11. Efectul temperaturii asupra activității amilazice și amiloglucosidazice a preparatului de *A. oryzae*.

Tabel 4.34. Influența temperaturii asupra activității preparatului enzimatic de *A. niger*

Nr. crt.	Temperatura °C	Activitate AMG relativă	
		U/g	%
1	30	151,7	15,60
2	37	220,9	22,72
3	40	277,2	28,51
4	45	390,5	40,16
5	50	559,5	57,54
6	55	672,2	69,13
7	60	914,2	94,01
8	65	972,4	100,00
9	70	500,0	51,42
10	78	55,7	5,73

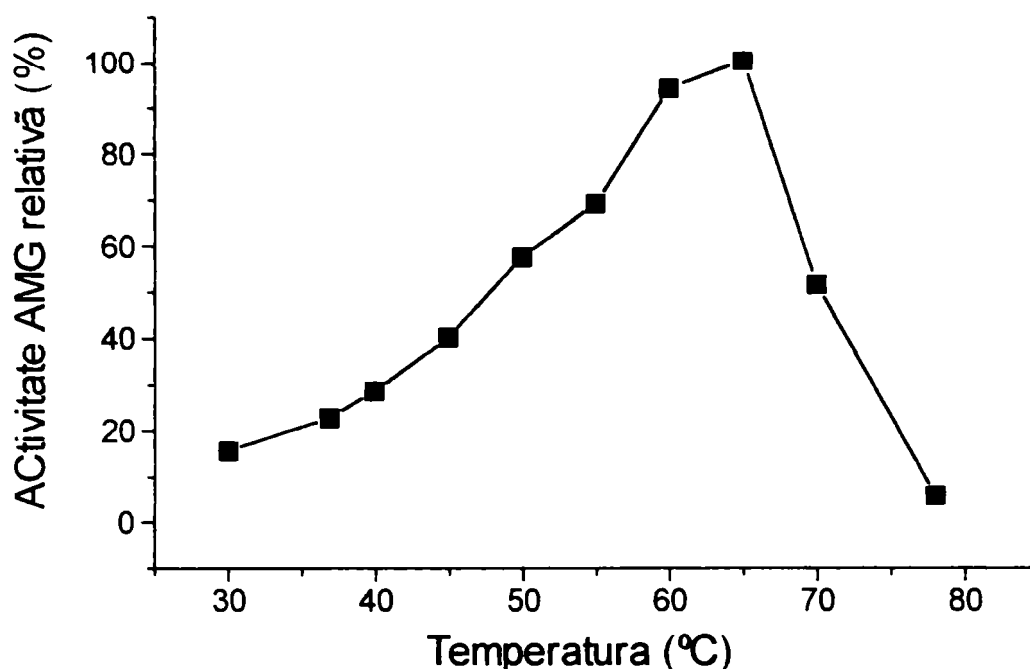


Figura 4.12. Efectul temperaturii asupra activității amiloglucosidazice a preparatului de *A. niger*

#### 4.4.3. Influența ionilor metalici și a anionilor asupra activității amilolitice

S-a studiat efectul cationilor (sub formă de cloruri) și a anionilor anorganici și organici (ca săruri de sodiu) în concentrație de 1 mM ion impurificator asupra activității  $\alpha$ -amilazice și amiloglucozidazice (cap. 4.1.5) (tabelele 4.35, 4.36 și 4.37).

Tabel 4.35. Efectul cationilor metalici asupra activității amilolitice a preparatului de *A. oryzae*

Nr. crt.	Cation	Activitate $\alpha$ -amilazică		Activitate AMG	
		U/mg	%	U/mg	%
1	-	11,12	100,00	5,08	100,00
2	Zn <sup>2+</sup>	11,70	105,20	5,44	107,08
3	Co <sup>2+</sup>	10,68	96,04	5,94	116,92
4	Ba <sup>2+</sup>	7,38	66,36	6,16	121,25
5	K <sup>+</sup>	11,17	100,40	5,80	114,17
6	Cu <sup>2+</sup>	10,97	98,65	5,80	114,17
7	Ni <sup>2+</sup>	11,26	101,25	6,16	121,25
8	Mn <sup>2+</sup>	11,17	100,40	7,73	152,16
9	Fe <sup>2+</sup>	13,89	124,91	7,09	136,56
10	Fe <sup>3+</sup>	11,31	101,70	6,37	125,39
11	Ca <sup>2+</sup>	11,26	101,25	6,30	124,01
12	Mg <sup>2+</sup>	10,88	97,84	6,01	118,30

Tabel 4.36. Efectul anionilor anorganici și organici asupra activității preparatului de *A. oryzae*

Nr. Crt.	Anion	Activitate $\alpha$ -amilazică		Activitate AMG	
		U/mg	%	U/g	%
1	-	11,25	100,00	7,44	100,00
2	Cl <sup>-</sup>	11,89	105,68	8,59	115,45
3	I <sup>-</sup>	12,22	108,62	7,80	104,84
4	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	12,87	114,40	8,52	114,52
5	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	12,30	109,34	8,80	118,28
6	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	12,54	111,47	8,52	114,52
7	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	12,49	111,02	7,23	97,17
8	Formiat	12,20	108,45	7,59	102,02
9	Acetat	12,01	106,75	8,37	112,50
10	Salicilat	12,70	112,89	8,37	112,50
11	Oxalat	11,91	105,87	8,59	115,45
12	Tartrat	13,00	115,55	8,30	111,56
13	EDTA	12,24	108,88	7,30	98,12

 Tabelul 4.37. Efectul cationilor și anionilor anorganici și organici asupra activității AMG a preparatului de *A. niger*

Nr. Crt.	Cation	Activitate AMG		Anion	Activitate AMG	
		U/g	%		U/g	%
1	-	240,79	100,00	-	240,79	100,00
2	Cu <sup>2+</sup>	239,03	99,27	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	192,98	80,14
3	Ni <sup>2+</sup>	256,14	106,37	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	190,79	79,23
4	Pb <sup>2+</sup>	254,38	105,64	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	195,17	81,05
5	Ca <sup>2+</sup>	257,45	106,92	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	52,63	21,86
6	Zn <sup>2+</sup>	188,16	78,14	I <sup>-</sup>	212,72	88,34
7	Mn <sup>2+</sup>	278,95	115,84	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	64,03	26,59
8	Fe <sup>3+</sup>	169,30	70,31	Cl <sup>-</sup>	281,14	116,76
9	Mg <sup>2+</sup>	266,67	110,74	Formiat	187,28	77,78
10	K <sup>+</sup>	272,81	113,29	Acetat	178,95	74,31
11	Ca <sup>2+</sup>	272,37	113,11	Citrat	229,82	95,44
12	Ba <sup>2+</sup>	274,12	113,84	Salicilat	149,12	61,93
13	Na <sup>+</sup>	281,14	116,76	Oxalat	251,31	104,37
14	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	237,28	98,54			

Deoarece preparatele enzimatic conțin cantități mici de cationi (pentru *A. oryzae*: 15 μg/mg Fe, 10,2 μg/mg Na, 25 μg/mg Ca, determinate prin AAS), datorită faptului că în mediul de cultură pentru biosinteză s-au introdus săruri de calciu pentru creșterea randamentului, iar materiile prime folosite (mălai, țărâțe, făină de fasole, etc.) conțin la rândul lor cantități mici de oligoelemente, datele obținute la studiul influenței ionilor asupra activității enzimatic sunt relative. Totuși ele ne dau indicații clare asupra caracterului activator sau inhibitor al diferiților ioni testați.

În cazul preparatului amilazic obținut din culturi de *A. oryzae*, majoritatea cationilor nu influențează sau au un slab efect activator asupra activității α-amilazei (tabelul 4.35). Ionul Fe<sup>2+</sup> mărește de 1,25 ori activitatea α-amilazică, în timp ce ionul Ba<sup>2+</sup> are un efect inhibitor (66% din activitatea în absența cationilor). În cazul activității AMG, toți ionii metalici testați prezintă o activitate activatoare, efectul cel mai pregnant înregistrându-se pentru ionii Mn<sup>2+</sup> (152,16%), Fe<sup>2+</sup> (136,56%), Fe<sup>3+</sup> (125,39%) și Ca<sup>2+</sup> (124,01%). Toți anionii testați (în concentrație 1 mM) măresc activitatea α-amilazică și amiloglucosidazică a preparatului de *A. oryzae* (tabelul 4.36).

În cazul preparatului din *A. niger*, majoritatea cationilor au un efect activator asupra activității AMG (tabel 4.37). Zn<sup>2+</sup> și Fe<sup>3+</sup> sunt inhibitori, în prezența lor enzima menține 78,1% și respectiv 70,3% din activitate. Cea mai mare parte a anionilor anorganici și organici au un efect inhibitor asupra activității (tabel 4.37). Cei mai puternici inhibitori sunt ionii carbonat și fosfat, enzima menținându-și numai 21,9% și 26,6% din activitatea determinată în absența anionilor. Ionii oxalat și clorură au un slab efect activator.

#### 4.4.4. Stabilitatea termică

Temperatura influențează viteza reacțiilor enzimatic afectând stabilitatea enzimei, afinitatea enzimei pentru substrat și viteza de scindare a complexului enzimă-substrat.

Deoarece procesul enzimatic de zaharificare a amidonului se realizează la temperaturi ridicate, este necesară cunoașterea stabilității termice a preparatelor enzimatic purificate obținute în laborator. Pentru aceasta s-a urmărit variația în timp a activității unei soluții apoase de enzimă la diverse temperaturi (30-70°C). Stabilitatea termică s-a studiat în soluție apoasă, în absența substratului. Acest fapt este important, deoarece prezența substratului ar putea mări stabilitatea enzimelor.

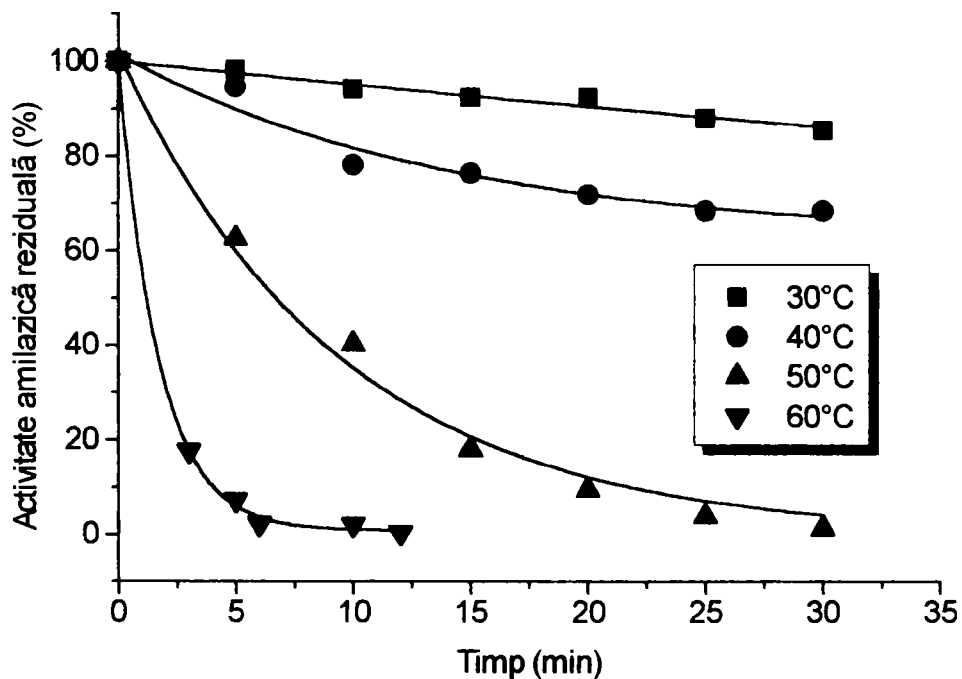
Dezactivarea termică a α-amilazei și a AMG din *A. oryzae* este prezentată în tabelul 4.38, figura 4.13, tabelul 4.39 și figura 4.14, iar a AMG din *A. niger* în tabelul 4.40 și figura 4.15.

Stabilitatea termică a α-amilazei din *A. oryzae* este ridicată la 30°C și 40°C. După 30 minute, enzima își menține 85% și respectiv 68% din activitatea inițială. La temperaturi mai ridicate, enzima se dezactivează lent prin denaturare. La 50°C, în 3 minute, se pierde 83% din activitatea amilazică inițială iar la 60°C enzima se dezactivează complet după 15 minute.

AMG din *A. oryzae* este mai stabilă ca α-amilaza. Ambele enzime se comportă similar la temperaturi scăzute (30°C, 40°C). La temperaturi mai ridicate (50°C, 60°C), dezactivarea AMG este mai lentă. Ea este 1,73 U/g (activitate remanentă 45%) la 50°C după 30 minute și 0,75 U/g (19% activitate remanentă) la 60°C după 15 minute, în timp ce activitatea reziduală a α-amilazei din *A. oryzae* este 1,27% și respectiv 0,38% activitate standard în aceleași condiții.

Tabel 4.38. Stabilitatea termică a  $\alpha$ -amilazei din preparatul din *A. oryzae*

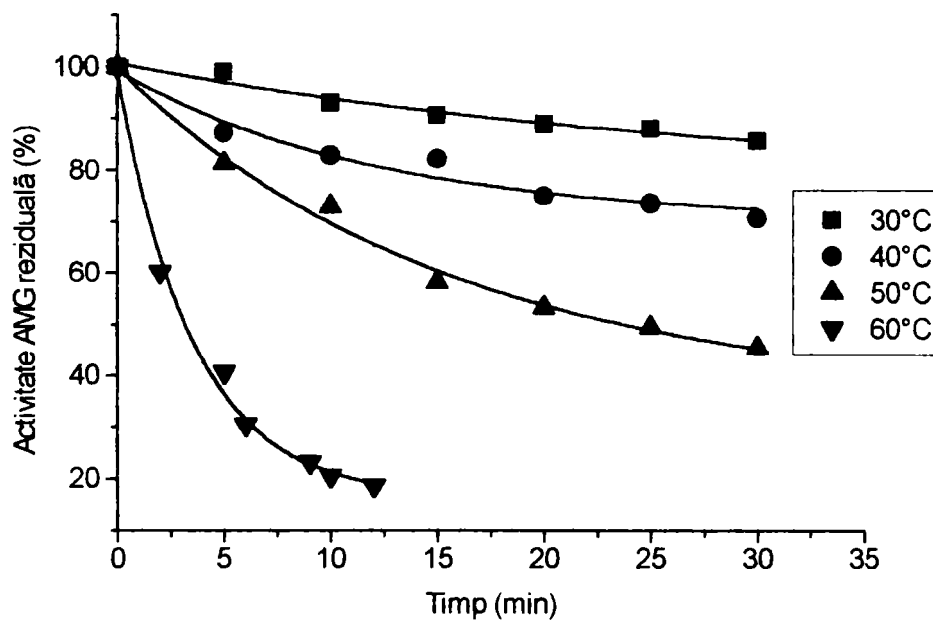
Nr. crt.	Timp min	Activitate $\alpha$ -amilazică		Activitate reziduală %
		U/ml	U/mg	
<b>Temperatura = 30°C</b>				
1	5	23,10	11,55	98,21
2	10	22,16	11,08	94,22
3	15	21,74	10,87	92,43
4	20	21,74	10,87	92,43
5	25	20,67	10,34	87,95
6	30	20,09	10,04	85,42
<b>Temperatura = 40°C</b>				
1	5	22,26	11,13	94,64
2	10	18,37	9,18	78,10
3	15	17,96	8,98	76,36
4	20	16,90	8,45	71,85
5	25	16,10	8,05	68,45
6	30	16,10	8,05	68,45
<b>Temperatura = 50°C</b>				
1	5	14,70	7,35	62,50
2	10	9,45	4,73	40,18
3	15	4,22	2,11	17,94
4	20	2,22	1,11	9,44
5	25	0,89	0,45	3,78
6	30	0,29	0,15	1,27
<b>Temperatura = 60°C</b>				
1	3	4,15	2,07	17,65
2	6	1,70	0,85	7,23
3	9	0,53	0,27	2,25
4	12	0,50	0,25	2,12
5	15	0,09	0,05	0,38


 Figura 4.13. Stabilitatea termică a  $\alpha$ -amilazei din preparatul de *A. oryzae*



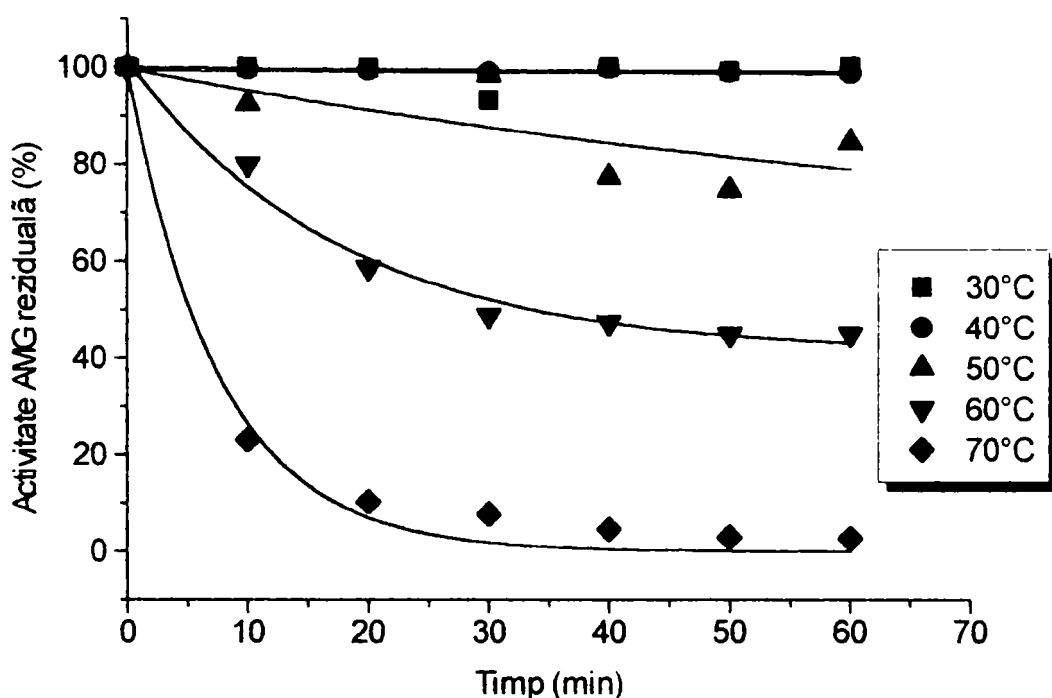
Tabel 4.39. Stabilitatea termică a AMG din *A. oryzae*

Nr. crt.	Timp min	Activitate AMG U/g	Activitate AMG reziduală %
Temperatura = 30°C			
1	5	3,97	99,01
2	10	3,73	93,08
3	15	3,29	90,78
4	20	3,64	88,96
5	25	3,64	88,15
6	30	3,44	85,67
Temperatura = 40°C			
1	5	3,48	87,30
2	10	3,33	82,96
3	15	3,29	82,25
4	20	3,01	75,00
5	25	2,95	73,58
6	30	2,83	70,66
Temperatura = 50°C			
1	5	3,25	81,23
2	10	2,93	73,00
3	15	2,34	58,23
4	20	2,14	53,31
5	25	1,98	49,40
6	30	1,87	45,40
Temperatura = 60°C			
1	2	2,41	60,15
2	5	1,62	40,66
3	6	1,22	30,50
4	9	0,93	23,22
5	12	0,82	20,46
6	15	0,75	18,63


 Figura 4.14. Stabilitatea termică a AMG din *A. oryzae*

Tabel 4.40. Stabilitatea termică a AMG din *A. niger*

Nr.	Timp	Activitate AMG reziduală relativă (%)				
		30°C	40°C	50°C	60°C	70°C
1	10	99,99	99,60	92,42	79,94	23,10
2	20	99,75	99,39	99,76	58,58	10,28
3	30	93,11	98,91	98,41	48,69	7,75
4	40	100,00	99,80	77,29	47,24	4,62
5	50	99,09	98,95	74,65	44,91	2,98
6	60	99,99	98,73	84,28	44,91	2,73


 Figura 4.15. Stabilitatea termică a AMG din *A. niger*

AMG din *A. niger* este mai stabilă termic decât amilazele din *A. oryzae*. La 30°C și la 40°C, activitatea AMG rămâne practic neschimbată, iar la 50°C enzima se dezactivează încet. La 60°C, inactivarea este rapidă, după 10 minute activitatea enzimatică a scăzut de 4,3 ori.

Temperatura optimă determinată este 55°C pentru preparatul din *A. oryzae* și 65°C pentru preparatul din *A. niger* (capitolul 4.4.2.). Inactivarea termică este semnificativă la aceste temperaturi, de aceea sunt indicate temperaturi de până la 40-45°C pentru preparatul din *A. oryzae* și 50-55°C pentru cel din *A. niger*.

#### 4.4.5. Stabilitatea la pH

Concentrația ionilor de hidrogen în mediul de reacție al enzimei modifică atât viteza procesului cât și stabilitatea enzimei prin schimbarea stării de ionizare a enzimei (un polielectrolit), a substratului și chiar a complexului enzimă-substrat, afectând valoarea constantelor cinetice. De aceea este necesară determinarea domeniului de pH în care enzima își menține nemodificate proprietățile catalitice.

În acest scop s-a studiat stabilitatea soluțiilor enzimatice de *A. oryzae* (0,4 mg/ml pentru  $\alpha$ -amilază și 2 mg/ml pentru AMG) (tabelul 4.41 și figura 4.16) și de *A. niger* (2 mg/ml) (tabelul 4.42 și figura 4.17) la păstrare 15 minute la diverse pH-uri.

Tabel 4.41. Stabilitatea  $\alpha$ -amilazei și a AMG din *A. oryzae* la diverse pH-uri

Nr. crt.	pH	Activitate $\alpha$ -amilazică			Activitate AMG	
		U/ml	U/g	%	U/g	%
1	1,8	0,29	0,67	5,03	1,20	28,85
2	2,0	1,13	2,82	19,62	1,92	46,15
3	2,2	2,05	5,12	35,60	2,00	48,08
4	2,5	2,79	6,97	48,40	2,48	59,62
5	2,8	3,73	9,32	59,02	3,20	76,92
6	3,0	4,05	10,14	70,40	3,52	84,62
7	3,5	5,35	13,37	92,85	3,68	88,46
8	3,8	5,46	13,64	94,75		
9	4,0	5,55	13,88	96,40	3,89	93,68
10	4,5	5,76	14,40	100,00	4,16	100,00
11	5,1	5,65	14,20	98,50	3,72	89,42
12	5,7	5,63	14,18	98,42	3,12	75,00
13	6,0	5,24	13,10	91,00	2,92	70,43
14	6,5	5,26	13,15	91,32	2,66	63,94
15	7,0	5,15	12,90	89,40	2,24	53,85
16	7,5	4,92	12,30	85,47	1,96	46,72
17	8,0	4,90	12,25	85,06	1,28	30,76

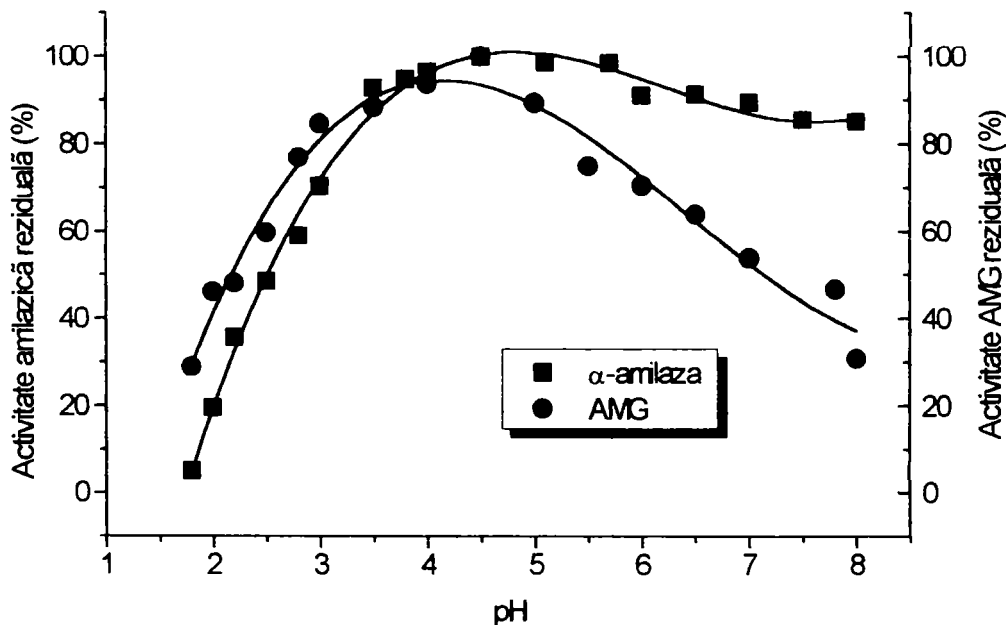


Figura 4.16. Stabilitatea  $\alpha$ -amilazei și a AMG din *A. oryzae* la diverse pH-uri

Tabel 4.42. Stabilitatea la pH a AMG din *A. niger*

Nr. crt.	pH	Activitate AMG	
		U/g	%
1	3,0	139,88	67,54
2	3,5	182,13	87,79
3	4,0	191,11	92,28
4	4,7	207,10	100,00
5	5,5	190,77	92,11
6	6,0	197,17	95,70
7	6,5	195,25	94,28
8	7,0	201,33	97,72
9	7,5	203,89	98,45
10	8,0	205,49	99,22
11	8,5	194,29	93,81
12	9,0	193,33	93,35

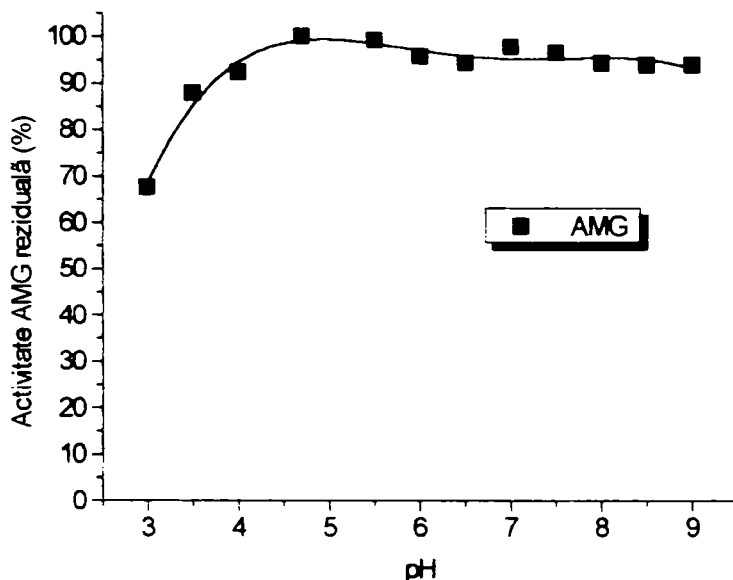


Figura 4.17. Stabilitatea la pH a AMG din *A. niger*

La pH 4,6 (pH-ul optim pentru reacția enzimatică), activitatea  $\alpha$ -amilazei din *A. oryzae* este nemodificată după 15 minute. Activitatea enzimatică scade rapid în domeniul acid, sub pH 3,5.  $\alpha$ -Amilaza reține numai 5% din activitatea inițială după 15 minute la pH 1,80. Enzima se dezactivează încet în domeniu neutru și alcalin (pH 6,0-8,0). Ea reține 85% din activitatea inițială la pH 8. În domeniul de pH 3,5-6,0, activitatea  $\alpha$ -amilazică este mare, activitatea reziduală fiind de peste 90%.

AMG din *A. oryzae* prezintă cea mai bună stabilitate la pH optim (pH 4,6), activitatea catalitică fiind nemodificată după 15 minute. Stabilitatea enzimei scade lent la varierea pH-ului spre valori acide (activitate reziduală 84% la pH 3,0 și 30% la pH 1,8) și scade rapid la creșterea pH-ului la valori peste 5 (30% activitate reziduală la pH 8,0).

Comparând stabilitatea  $\alpha$ -amilazei și a AMG din *A. oryzae*, se observă că ambele enzime sunt stabile la pH optim (pH 4,6), stabilitatea AMG fiind mai mare în domeniul de pH 3,5-1,8, iar cea a  $\alpha$ -amilazei în domeniul 5-8. În domeniul de pH 4-5, în care activitatea catalitică a ambelor enzime este maximă, atât  $\alpha$ -amilaza cât și AMG din *A. oryzae* sunt stabile, după 15 minute regăsindu-se peste 90% din activitatea inițială.

pH 4,8 este pH-ul optim atât pentru activitatea cât și pentru stabilitatea AMG din *A. niger* (tabel 4.41, figura 4.16).

Enzima pierde 30% din activitatea inițială după 15 minute la pH 3. În schimb, pierderea de activitate în domeniul de pH 4,0-9,0 este foarte lentă. Deci, o modificare a pH-ului accidentală, dar scurtă, în domeniul 4,0-9,0 nu afectează activitatea AMG, iar procesul de zaharificare enzimatică a amidonului poate continua în condițiile optime, după corecția de pH.

În domeniul de pH 4-5, ambele preparate enzimatic prezintă activitate și stabilitate maximă și pot fi utilizate împreună la zaharificarea enzimatică a amidonului.

#### 4.4.6. Stabilitatea la conservare

Preparatele enzimatic din *A. oryzae* și *A. niger* au fost păstrate timp de mai multe luni la 4°C, fără o purificare ulterioară și fără utilizarea de agenți de stabilizare (tabelele 4.43 și 4.44).

Tabel 4.43. Stabilitatea la conservare a preparatului amilolitic de *A. oryzae*

Nr. crt.	Nr. luni	Activitate $\alpha$ -amilazică		Activitate AMG	
		U/mg	%	U/g	%
1	-	15,54	100,0	4,42	100,0
2	4	14,40	92,7		
3	6	11,20	72,0	4,38	99,0

Tabel 4.44. Stabilitatea la conservare a preparatului amiloglucozidazic din *A. niger*

Nr. crt.	Nr. luni	Activitate AMG	
		U/g	%
1	0	276,5	100,00
2	1	224,1	81,05
3	2	207,1	74,90

Preparatul enzimatic din *A. oryzae* este stabil la conservare la 4°C: după 6 luni, se menține 72% din activitatea  $\alpha$ -amilazică, iar activitatea AMG este practic neschimbată. Amiloglucozidaza din *A. niger* este mai puțin stabilă: activitatea reziduală este 72% după 2 luni.



#### 4.4.7. Concluzii privind parametrii optimi de acțiune și stabilitatea preparatelor amilazice de *A. oryzae* și *A. niger*

Preparatele amilazice obținute din culturi de *A. oryzae* 242 și *A. niger* IC au prezentat următoarele caracteristici (tabelele 4.45 și 4.46):

Tabel 4.45. Caracterizarea amilazei obținute din culturi de *A. oryzae* 242

Proprietate	$\alpha$ -amilază	Amiloglucozidază
pH optim	4,6-5	4,6-6
Temperatura optimă	50°C	60°C
Ioni metalici: - activatori - inhibitori	Fe <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> Ba <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> -
Anioni - activatori - inhibitori	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Cl <sup>-</sup> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , EDTA
Stabilitate termică (activitate Remanentă după 30 min.)	85% la 30°C 68% la 40°C 1% la 50°C	85% la 30°C 70% la 40°C 45% la 50°C
Stabilitate la pH (activitate Remanentă după 15 min.)	100% la pH 3,5-6	90-100% la pH 4-5

Tabel 4.46. Caracterizarea amiloglucozidazei obținute din culturi de *A. niger* IC

Proprietate	Amiloglucozidază
pH optim	4,5-5,0
Temperatura optimă	60-65°C
Ioni metalici: - activatori - inhibitori	Na <sup>+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Ba <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>
Anioni - activatori - inhibitori	Cl <sup>-</sup> , oxalat CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , salicilat, acetat
Stabilitate termică (activitate Remanentă după 30 min.)	100% la 30°C 98% la 40°C 74% la 50°C 45% la 60°C 3% la 70°C
Stabilitate la pH (activitate Remanentă după 15 min.)	98-100% la 4,5-5

**În concluzie:**

1. S-au determinat parametrii optimi de funcționare ai preparatului enzimatic purificat, cu conținut de  $\alpha$ -amilază și amiloglucozidază.

2. pH-ul optim de reacție este, atât pentru  $\alpha$ -amilază cât și pentru AMG, 4,6. În condiții de utilizare experimentală, pH-ul amestecului de reacție se poate menține într-un domeniu mai larg, între 4-5, când activitatea ambelor enzime reprezintă peste 80% din activitatea înregistrată la pH optim.

3. Temperatura optimă de reacție este, pentru  $\alpha$ -amilază, 50°C, iar pentru amiloglucozidază 60°C. Se admite pentru exploatarea enzimelor un domeniu de temperatură de 45-60°C, când activitățile celor două enzime sunt apropiate de valorile maxime înregistrate la temperatura optimă de reacție (87,8-71,8% pentru  $\alpha$ -amilază, 50-100% pentru amiloglucozidază).

4. Activitatea catalitică a  $\alpha$ -amilazei este mărită de prezența în mediul de reacție a cationilor metalici. Singur, ionul  $Ba^{2+}$  reduce marcant activitatea  $\alpha$ -amilazei. Toți ionii metalici testați măresc activitatea AMG, afectul cel mai pronunțat manifestându-l ionii  $Mn^{2+}$  și  $Fe^{2+}$ . Anionii organici și anorganici prezintă un efect activator asupra activității catalitice a  $\alpha$ -amilazei și amiloglucozidazei din preparatele enzimactice obținute în laborator.

5. Preparatele enzimactice solide purificate obținute în laborator sunt stabile în timp, dacă sunt păstrate la 4°C. Astfel, după șase luni, se menține 72% din activitatea  $\alpha$ -amilazică și 98% din cea amiloglucozidazică.

6. Preparatele enzimactice sunt stabile termic la temperaturi sub 40°C. Stabilitatea la temperaturi peste 50°C este scăzută. Ele pot fi însă utilizate și la temperatura de 40°C, când activitatea catalitică a  $\alpha$ -amilazei este 75% din activitatea maximă înregistrată la temperatura optimă de reacție de 50°C, iar activitatea amiloglucozidazei este 40% din cea determinată la 60°C, temperatura optimă de reacție.

7. Stabilitatea la pH a preparatelor enzimactice purificate este maximă (100%) la valoarea pH-ului optim de reacție, 4,6, și suficient de ridicată în domeniul de pH 4-5.

#### 4.4. Studiul cinetic al reacției de hidroliză a amidonului cu enzime amilolitice

##### 4.4.1. Amidonul-substrat natural al amilazelor

Acțiunea amilazelor asupra amidonului granular este o reacție complexă, deoarece acesta din urmă este insolubil și nu formează un amestec molecular intim cu amilazele, iar hidroliza nu se poate reduce la simpla desfacere a legăturilor  $\alpha$ -1,4- și  $\alpha$ -1,6-glucozidice din lanțurile glucanice.

Hidroliza amidonului are loc în următoarele etape:

- adsorbția amilazelor pe suprafețele expuse de substrat (etapă influențată de starea suprafețelor și de concentrația enzimelor în mediul de reacție);
- penetrația enzimei în granula de amidon (etapă dependentă de structura suprafețelor expuse din granulă (unele fiind penetrate mai ușor, altele mai greu), de structura morfologică și dimensiunea interstițiilor din granulă, precum și de forma și mărimea amilazelor);
- detașarea lanțurilor de glucoză din rețeaua de punți de hidrogen intercatenare, sub acțiunea amilazelor;
- hidroliza lanțurilor glucanice prin desfacerea legăturilor glucozidice până la maltoză, glucoză, izomaltoză, maltotrioză, panoză etc. (etapă influențată cantitativ de etapele anterioare și calitativ de originea enzimelor utilizate) [4.13].

Viteza hidrolizei amidonului și cantitatea de hidrolizat obținute vor fi influențate de rezistența opusă de diferitele părți componente ale granulei și de raportul cantitativ dintre ele. De aceea toate tratamentele mecanice, termice, hidrotermice, etc. care vor modifica raportul calitativ al diferitelor forme morfologice ce vin în contact cu enzima, care vor modifica structura internă și vor labiliza aceste formațiuni glucidice, vor avea o influență primordială asupra hidrolizei. De asemenea, hidroliza este influențată și de raportul enzimă-substrat, pH, temperatură, compoziția și consistența mediului.

Ținând cont de formele morfologice ale granulei de amidon, sunt posibile trei tipuri de hidroliză, diferite ca viteză, în funcție de rezistența opusă de conținutul alveolelor, de membranele alveolare și învelitorile concentrice. Modificarea vitezei de hidroliză arată schimbarea raportului dintre aceste trei genuri de hidroliză. În prima fază, amilazele atacă toate formele structurale ale granulei, însă pe măsură ce zonele labile sunt epuizate, se tinde spre o viteză de hidroliză constantă, corespunzătoare raportului sub care sunt expuse diferitele formațiuni structurale și rezistenței globale a granulelor. Dacă această rezistență se modifică prin diferite tratamente, se modifică și viteza de hidroliză. În ceea ce privește relația dintre concentrația de enzimă, starea substratului și gradul de hidroliză, dozele optime nu se pot preciza a priori, deoarece între o granulă intactă și o granulă total labilizată există o infinitate de stări intermediare, fiecareia corespunzându-i o doză optimă. De asemenea, din cantitatea de enzimă introdusă în reacție, o parte se găsește dispersată în mediu, și numai o parte catalizează efectiv hidroliza substratului insolubil [4.13].

Cele trei căi de atac ale enzimei asupra polizaharidului sunt [4.14, 4.15, 4.16]:

- atacul asupra unui singur lanț polimeric;
- atacul aleator asupra tuturor lanțurilor polimerice;
- atacul combinat, intermediar între cele două posibilități de mai sus.

Considerând că molecula de enzimă are acces nelimitat la substratul polimeric și legăturile sunt cele obișnuite, cinetica degradării poate fi bine descrisă de una din aceste forme de atac. Pentru aceste cazuri, modul de degradare este controlat specific de modul de acțiune al enzimei.

Datorită acestei multitudini de factori care intervin în hidroliza amidonului de către enzimele amilolitice, efectuarea unor studii și stabilirea unor ecuații cinetice care să țină cont de toți parametrii este extrem de dificilă. Din acest motiv există o mare diversitate de abordări, autorii recurgând în general la ipoteze simplificatoare sau abordând numai anumite etape ale procesului de hidroliză.

Prima etapă a depolimerizării amidonului, denumită lichefiere, constă în conversia amidonului nativ în oligozaharide cu mase moleculare mai mici, ceea ce are drept rezultat reducerea vâscozității pastei. Studiile referitoare la acest proces au fost limitate (spre deosebire de cele referitoare la etapele ulterioare de zaharificare sau izomerizare), deoarece substratul este de natură polimerică, iar domeniul mărimilor moleculelor de amidon nativ este foarte larg. Masa moleculară medie a amidonului este în jur de  $10^9$  daltoni, valoare dincolo de limitele detectabile la majoritatea metodelor de analiză utilizate în determinările cinetice. În consecință, majoritatea studiilor de modelare se bazează pe determinarea unor valori globale cum ar fi concentrația zaharurilor reducătoare din sistem.

Introducerea unor metode mai moderne de analiză a permis o cunoaștere mai aprofundată a fenomenelor care intervin în acest proces. Rolling și Thompson [4.17] au studiat hidroliza amidonului din mălai de către o  $\alpha$ -amilază termostabilă (Thermamyl Novo), și au urmărit distribuția maselor moleculare ale produșilor prin cromatografie de excluziune sterică.

Dacă hidroliza se face sub domeniul temperaturilor de gelatinizare ( $60^\circ\text{C}$ ), distribuția maselor moleculare este extrem de neregulată. Se obțin în majoritate produși cu masă moleculară mai mare de  $5 \cdot 10^6$  daltoni și mai mică de  $2 \cdot 10^3$  daltoni, tendința fiind de reducere cantitativă treptată a primilor în favoarea ultimilor. Această distribuție poate fi rezultatul acțiunii enzimei la suprafața amidonului aflat în formă cristalină, similar principial cu atacul la celuloză.

La temperaturi mai ridicate decât domeniul temperaturilor de gelatinizare, distribuția produșilor este de asemenea neuniformă. Însă, pe lângă cei doi produși polimeri menționați, mai apar două categorii, una cu masă moleculară în jur de  $5 \cdot 10^5$  daltoni iar cealaltă de  $2 \cdot 10^4$  daltoni. Tendința de a forma aceste patru categorii de produși polimeri nu poate fi explicată doar pe baza modului de acțiune al enzimei, fiind o consecință a distribuției naturale a maselor moleculare în amidon, a orientării moleculelor în interiorul granulei, sau a proprietăților componentelor macromoleculare ai amidonului. Studii de modificare a granulelor de amidon prin pre-gelatinizare și măcinare au arătat că formarea celor două categorii de produși este de fapt un fenomen asociat cu proprietățile intrinseci ale constituenților macromoleculare ai amidonului.

Se știe că moleculele de oligozaharide formate în cursul hidrolizei pot da fenomenul de agregare formând multimeri. Frația moleculară cu masa moleculară cea mai mică reprezintă acest amidon multimerizat (retrogradat).

După depolimerizarea la  $60^\circ\text{C}$  și măcinare în moara cu bile, fracțiunea de  $5 \cdot 10^6$  daltoni nu mai era prezentă în sistem, ceea ce indică faptul că aceasta poate fi asociată cu regiunea cristalină a granulei de amidon.

În cazul porumbului dezagregat, proporția relativă a fracțiunilor cu mase moleculare medii este considerabil mai mare, în timp ce cea a produșilor finali este mai mică. Produșii de depolimerizare fac parte din aceleași patru categorii cu mase

moleculare bine definite. Proportia relativă a celor patru fracțiuni depinde atât de condițiile din reactor cât și de pretratamentul la care a fost supus substratul. Atât structura granulei de amidon cât și conformația substratului în soluție influențează modul de depolimerizare al substratului.

Într-un model fizic al depolimerizării amidonului, trebuie luate în considerare două cazuri. Când amidonul este prezent în formă cristalină nativă, enzima poate depolimeriza substratul doar la suprafață. Din această cauză produșii de degradare vor fi sau cristalite în mare măsură intacte sau produși finali cu mase moleculare mici. Aceasta nu înseamnă că din granulă nu se eliberează și produși cu mase moleculare intermediare ci doar faptul că ei sunt rapid depolimerizați de enzimă la produșii finali cu mase moleculare mai mici. În consecință, materialul prezent în orice moment în reactor va consta din aceste două extreme. În celălalt caz, când granula de amidon este topită sau dezagregată mecanic, enzima are un acces mai mult sau mai puțin liber la toate legăturile din polimer și va degrada substratul uniform, rezultând produși cu un domeniu larg al maselor moleculare. Anumite grupuri de molecule se vor agrega din nou formând multimeri. Aceste agregate formează o nouă fază în soluție și enzima nu mai are acces liber la legăturile polimerului. Amidonul retrogradat este mai rezistent la atacul enzimatic datorită asocierii intermoleculare polimer-polimer. În consecință acesta se va acumula în interiorul reactorului și va fi degradat încet sub acțiunea enzimei.

Se poate deci concluziona că în cazul hidrolizei amidonului din porumb nu rezultă o distribuție uniformă a produșilor, nici în cazul granulelor de amidon intacte, nici în cazul amidonului gelatinizat. Pentru condiții de reacție similare cu cele industriale este tipică o distribuție a maselor moleculare a hidrolizatorilor corespunzătoare la patru fracțiuni principale, ceea ce nu poate fi prevăzut pe baza multiplicității atacului enzimatic sau a structurii legăturilor prezente în substratul în sine. Proprietățile fizico-chimice intrinseci ale substratului determină formarea unor complecși de asociere inter sau intramoleculară și cel puțin, în parte, determină distribuția observată a produșilor.

Etapa următoare a procesului de obținere a materiilor prime fermentescibile pentru industria alcoolului etilic o constituie zaharificarea amidonului lichefiat. Studiul cinetic al acestei etape este complicat de faptul că într-o anumită fază enzimele de lichefiere și de zaharificare acționează concomitent. În general, pe lângă investigarea cineticii fiecărei enzime în parte, este indicat să se studieze și dacă acțiunea lor concomitentă duce la activarea sau inhibarea procesului.

Modelele privind acțiunea amiloglucozidazei asupra amidonului solubil utilizează cinetica Michaelis-Menten modificată cu efectul inhibitor al produșilor [4.18]. S-a stabilit că  $V$  și  $K_m$  variază cu masa moleculară a substratului. S-a găsit că  $K_m$  și  $K_i$  descresc în timp ce constanta de viteză crește cu masa moleculară.

În concluzie se poate afirma că hidroliza materialelor cu conținut de amidon, sub acțiunea catalitică a enzimelor amilolitice, este un proces complex, necunoscut încă în amănunțime la nivel de transformări elementare. Din punct de vedere aplicativ însă are relevanță doar determinarea parametrilor optimi de hidroliză, pentru care o cunoaștere globală a procesului este suficientă. Pornind de la aceste considerente, în studiile cinetice efectuate s-a urmărit în principal determinarea performanțelor cinetice ale enzimelor obținute, în comparație cu enzime similare de firmă, și nu studiul hidrolizei granulei de amidon, solubil sau sub formă de mălai lichefiat.



#### 4.4.2. Determinarea parametrilor cinetici ai reacției de hidroliză a amidonului cu enzime amilolitice

Amidonul este scindat de enzimele amilolitice la dextrine și zaharuri reducătoare. O măsură a eficacității catalitice a enzimelor o reprezintă  $V$  și  $K_m$ , respectiv raportul  $k_2/K_m$ . În vederea determinării parametrilor cinetici ai reacției catalizate enzimatic, s-a pornit de la un substrat bine caracterizat, amidonul Zulkovsky, care a fost hidrolizat atât cu enzime de firmă (Fungamyl (Novo), Amyloglucosidase (Novo)), cât și cu produsele amilazice obținute (preparat  $\alpha$ -amilazic din *A. oryzae* și amiloglucozidazic din *A. niger*). Apoi produsele amilazice s-au experimentat pe suportul lor natural (mălai lichefiat, Solventul Timișoara) [4.19, 4.20, 4.21].

S-au utilizat enzimele atât separat, cât și împreună. Utilizarea concomitentă a  $\alpha$ -amilazei și amiloglucozidazei este posibilă deoarece cele două enzime au activitate maximă în domenii apropiate de pH (la pH 4,5-5,5 ambele enzime rețin peste 90% din activitatea maximă) (capitol 4.3.1). Deoarece ambele enzime au activitate maximă la 50-60°C, însă sunt relativ puțin stabile la temperaturi peste 45°C, determinările cinetice s-au efectuat la 37°C, când enzimele prezintă aproximativ jumătate din activitatea maximă.

S-a studiat în acest scop influența concentrației de substrat asupra vitezei inițiale de reacție la o concentrație dată de enzimă. Această dependență este redată de ecuația Michaelis-Menten:

$$v_i = \frac{V \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

unde:

- $v_i$  = viteza inițială
- $V$  = viteza maximă
- $[S]$  = concentrația substratului
- $K_m$  = constanta Michaelis

Parametrii cinetici se obțin fie prin liniarizare (de exemplu corelând  $1/v_i$  în funcție de  $1/[S]$  în liniarizarea Lineweaver-Burk) fie prin corelarea directă, hiperbolică, a lui  $v_i$  în funcție de  $[S]$ .

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V}$$

$$\frac{[E_0]}{v_i} = \frac{K_m}{k_2} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{k_2}$$

Viteza inițială de reacție s-a determinat urmărind variația concentrației de substrat, respectiv de produs, în timp. La concentrații suficient de mici de substrat, în primele minute ale reacției, deci în condiții inițiale, această variație este o dreaptă. Panta dreptei reprezintă viteza inițială de reacție. Parametrii cinetici s-au calculat prin rezolvarea ecuației Michaelis-Menten.

#### 4.4.2.1. Cinetica reacției de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) cu $\alpha$ -amilază (Fungamyl Novo și *A. oryzae*) [4.20]

##### a) Determinarea activității $\alpha$ -amilazei prin metoda dinamică

Determinarea activității  $\alpha$ -amilazei se bazează pe reacția de hidroliză a amidonului sub efectul catalitic al enzimei. Există mai multe moduri de exprimare a activității  $\alpha$ -amilazei, fiecare firmă producătoare de enzime având unitatea sa enzimatică definită aparte.

Astfel, firma Novo lucrează în unități FAU (Fungamyl  $\alpha$ -Amylase Unit) definită astfel: 1 FAU reprezintă cantitatea de enzimă care hidrolizează 5,26 g amidon (Merck, Amylum Solubile BRG.6, Batch 9947275) per oră prin metoda standard de analiză Novo în următoarele condiții:

- Substrat..... amidon solubil
- Timp de reacție..... 7-20 minute
- Temperatură..... 37°C
- pH..... 4,7.

Deoarece determinările de activitate implică un anumit tip de substrat (amidon de o anumită proveniență), iar timpul de reacție după care se determină cantitatea de amidon lichefiat introduce erori din cauza perioadei de inducție sau de salt, este de preferat să se lucreze cu determinări de activitate folosind viteza inițială. Aceasta reprezintă de fapt metoda dinamică de determinare a activității enzimatice în condiții standard: concentrația substratului 5,00 mg/ml (amidon Zulkovsky), temperatura de 37°C, pH 4,6 (cap. 6.1.7.1).

Variația concentrației zaharurilor reducătoare (metoda DNS de analiză) în timp, în primele momente ale reacției, reprezintă viteza inițială de hidroliză a amidonului sub efectul catalitic al enzimei. Viteza inițială, determinată în condiții standard de reacție, este de fapt concentrația activității enzimatice pe care am exprimat-o în  $\mu$ moli maltoză eliberată/ml-min (U/ml). Paralel am urmărit și variația concentrației amidonului în timp prin metoda iodometrică de analiză ( $[S_0]=5,0$  mg/ml, Fungamyl Novo,  $t=37^\circ\text{C}$ , pH =4,6) (tabelul 4.47, figura 4.18):

Tabel 4.47. Variația concentrației amidonului și maltozei în timp

Nr. crt.	Timp min.	Concentrația	
		Amidon (mg/ml)	Maltoză (mM)
1	0	4,74	0,12
2	2	4,38	0,28
3	4	3,96	0,40
4	6	3,52	0,54
5	8	3,18	0,65
6	10	2,80	0,85
7	12	2,30	0,99
8	14	2,20	1,10
9	16	2,02	1,91
10	18	1,75	1,34

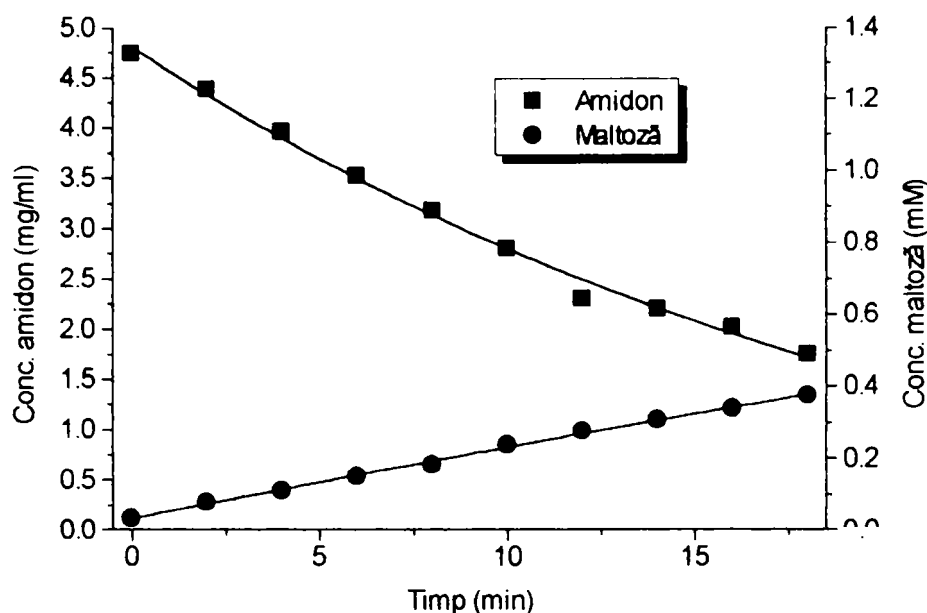


Figura 4.18. Variația concentrației maltozei în timp.

Corelând concentrația maltozei cu timpul de reacție ( $r=0,998$ ), se obține viteza inițială:

$$v_i = [E_0] = 6,796 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol/ml} \cdot \text{min} \text{ (U/ml)}.$$

Comparând cele două moduri de exprimare a activității enzimaticе, unitatea FAU și unitatea enzimatică U, se constată că Fungamyl Novo are o activitate de 1000 FAU/ml, deci activitatea unei soluții enzimaticе la diluția de 10  $\mu\text{l/l}$  (de  $10^5$  ori) este de  $10^{-2}$  FAU/ml. Concentrația activității enzimaticе în amestecul de reacție  $[E_0]$  este  $10^{-3}$  FAU/ml (4 ml enzimă în 40 ml amestec de reacție standard).

Concentrația activității enzimaticе, determinată experimental prin metoda vitezei inițiale și exprimată în U/ml, este  $[E_0] = 6,8 \cdot 10^{-2}$  U/ml. Deci 1 FAU = 68 U, definită la 37°C, pH 4,6 și raport reactanți: 20 ml soluție amidon Zulkovsky 1%, 16 ml tampon citrat-fosfat 0,15 M, pH 4,6 și 4 ml enzimă.

Activitatea preparatului enzimatic amilolitic s-a efectuat în aceleași condiții ca pentru enzima Fungamyl Novo, cu specificația că s-a folosit o soluție enzimatică de concentrație 0,16 mg/ml.

Lucrând în condițiile standard de determinare a activității dinamice se observă (tabel 4.48, figura 4.19) o dependență liniară a concentrației maltozei în timp, ceea ce permite corelarea datelor experimentale pentru determinarea vitezei inițiale de hidroliză (pentru primele 7 puncte  $r=0,9993$ ). În aceste condiții, viteza inițială va fi de fapt concentrația activității enzimaticе în amestecul de reacție și ea are valoarea  $[E_0] = 0,261 \mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}$ .

Tabel 4.48. Variația concentrației amidonului și a maltozei în timp: amidon Zulkovsky (5 mg/ml),  $\alpha$ -amilază (0,16 mg/ml, 37°C, pH 4,6).

Nr. crt.	Timp min	Concentrație	
		Amidon (mg/ml)	Maltoză (mM)
1	0	5,668	0,548
2	2	3,280	1,114
3	4	2,437	1,699
4	6	1,743	2,186
5	8	1,206	2,703
6	10	0,771	3,230
7	12	0,456	3,669
8	14	0,262	4,000
9	16	0,132	4,498
10	18	0,012	4,585

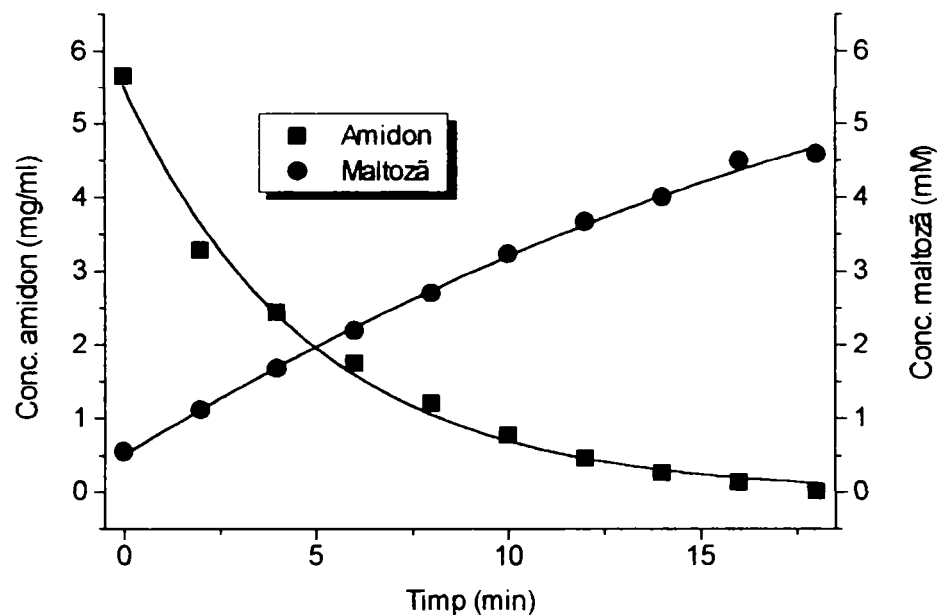


Figura 4.19. Variația concentrației maltozei în timp.

#### b) Determinarea parametrilor cinetici ai reacției de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) cu $\alpha$ -amilază (Fungamyl Novo)

Pentru determinarea parametrilor cinetici ai reacției de hidroliză enzimatică a amidonului cu  $\alpha$ -amilază, s-a studiat influența concentrației substratului (amidon Zulkovsky) asupra vitezei inițiale de hidroliză în intervalul 1,50-6,25 mg/ml, la 37°C, pH 4,6,  $[E_0] = 6,796 \cdot 10^{-2}$  U/ml (cap. 6.1.7.2).

Deoarece prin acțiunea  $\alpha$ -amilazei se eliberează în sistem maltoză, iar a amiloglucozidazei glucoză, în continuare s-a utilizat ca unic etalon pentru metoda cu DNS glucoza. În intervalul concentrațiilor de substrat studiate, viteza de apariție a glucozei este cuprinsă între  $3,9 \cdot 10^{-2}$  și  $7,1 \cdot 10^{-2}$   $\mu\text{mol/ml-min}$ , în timp ce dispariția amidonului este situată la o valoare medie de 0,16 mg/ml-min (tabel 4.49).

Tabel 4.49. Dependența vitezei de reacție de concentrația substratului

Nr. crt.	[S] mg/ml	1/[S] ml/mg	$10^2 \cdot v_i$ amidon Mg/ml·min	$10^2 \cdot v_i$ glucoză $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$		$1/v_i$ glucoză ml·min/ $\mu\text{mol}$
				exp.	calc.	
1	6,25	0,160	17,17	7,123	7,212	14,04
2	5,00	0,200	16,78	6,796	6,753	14,71
3	4,25	0,235	15,91	6,454	6,393	15,49
4	3,75	0,267	15,14	5,999	6,104	16,67
5	3,25	0,308	15,67	6,058	5,764	16,51
6	2,50	0,400	11,40	4,945	5,121	20,22
7	2,00	0,500	16,97	4,470	4,569	22,37
8	1,50	0,666	17,82	3,943	3,874	25,35

Corelând  $1/v_i$  în funcție de  $1/[S]$  (figura 4.20), în liniarizarea Lineweaver-Burk, se obțin valorile parametrilor cinetici, valori care servesc ca date inițiale pentru corelarea hiperbolică a lui  $v_i$  în funcție de  $[S]$ .

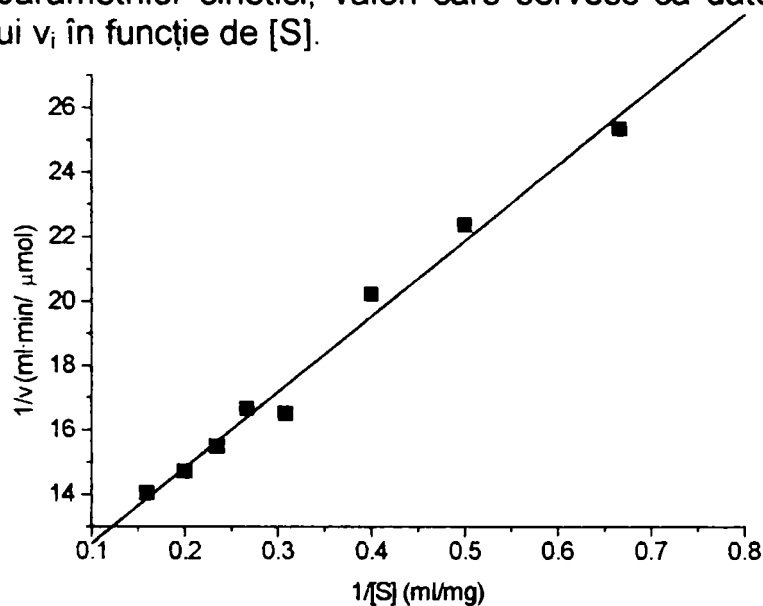


Figura 4.20. Liniarizarea Lineweaver-Burk pentru sistemul amidon (Zulkovsky)- $\alpha$ -amilază (Fungamyl Novo) ( $[E_0]=0,068$  U/ml,  $t$  37°C, pH 4,6)

Din datele de corelare hiperbolică rezultă:

- $K_m = 2,337$  mg/ml
- $V = 0,0991$   $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$
- $k_2 = 1,458$   $\mu\text{mol/min}\cdot\text{U}$
- $r = 0,990$
- suma pătratelor erorilor =  $1,568 \cdot 10^{-5}$ .

Comparând datele cinetice cu cele ale  $\alpha$ -amilazei utilizate de Fuji și Kawamura [4.22] ( $K_m=33$  mg/ml,  $V=1,22$   $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$ ,  $k_2=0,26$ , substrat amidon Merck M=37000), se observă că Fungamyl Novo este o enzimă deosebit de activă. Valorile mici ale lui  $K_m$  dovedesc o asociere bună a enzimei cu substratul, iar valorile mari ale  $k_2$ , o viteză bună de disociere a complexului intermediar enzimă-substrat. Specificitatea de substrat a enzimei Novo ( $k_2/K_m=1,624$ ) este cu mult mai mare decât a  $\alpha$ -amilazei utilizate de cercetătorii japonezi menționați ( $k_2/K_m=0,0079$ ).



**c) Determinarea parametrilor cinetici ai reacției de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) cu preparatul amilazic de *A. oryzae***

Parametrii cinetici pentru reacția de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) cu preparatul  $\alpha$ -amilazic din *A. oryzae* au fost determinați studiind variația vitezei inițiale de hidroliză a amidonului în funcție de concentrația substratului, așa cum s-a descris mai sus (cap. 6.1.7.2). S-a urmărit viteza de apariție a glucozei prin metoda de analiză cu DNS.

Se observă că în domeniul concentrațiilor de substrat studiate (2,0-6,25 mg/ml), vitezele de apariție a glucozei variază între 0,15-0,25  $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$ , iar cele de dispariție a amidonului se situează în jurul valorii de 0,3 mg/ml·min (tabel 4.50).

Tabel 4.50. Dependența vitezei inițiale de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) de concentrația substratului, folosind  $\alpha$ -amilaza din *A. oryzae* (0,16 mg/ml,  $[E_0] = 0,261 \text{ U/ml}$ ,  $37^\circ\text{C}$ , pH 4,6).

Nr. crt.	[S] mg/ml	1/[S] ml/mg	$V_i$ amidon mg/ml·min	$V_i$ glucoză $\mu\text{moli/ml}\cdot\text{min}$		1/ $V_i$ glucoză ml·min/ $\mu\text{moli}$
				exp.	calc.	
1	6,25	0,160	0,328	0,248	0,250	4,034
2	5,00	0,200	0,384	0,231	0,235	4,314
3	3,75	0,267	0,333	0,220	0,214	4,552
4	3,25	0,308	0,293	0,206	0,202	4,850
5	2,75	0,364	0,318	0,187	0,188	5,350
6	2,50	0,400	0,333	0,189	0,181	5,297
7	2,25	0,444	0,244	0,167	0,172	5,984
8	2,00	0,500	0,207	0,155	0,162	6,464

Prin liniarizarea Lineweaver-Burk (figura 4.21) se obțin pentru parametrii cinetici valorile:

- $K_m = 2,444 \text{ mg/ml}$
- $V = 0,3540 \mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$
- $r = 0,982$
- suma pătratelor erorilor =  $1,79 \cdot 10^{-5}$

Calculul hiperbolei conduce la următoarele valori optimizate:

- $K_m = 2,174 \text{ mg/ml}$
- $V = 0,3374 \mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$
- $r = 0,971$
- suma pătratelor erorilor =  $2,11 \cdot 10^{-4}$

Valoarea lui  $K_m$  destul de mare dovedește o asociere relativ slabă cu substratul, în schimb viteza de scindare a complexului enzimă-substrat ( $k_2=1,526 \text{ mol/min}\cdot\text{U}$ ) este destul de mare și competitivă pentru scopuri industriale. Valoarea  $k_2/K_m=0,624$  este comparabilă cu valoarea determinată pentru enzima Fungamyl Novo.

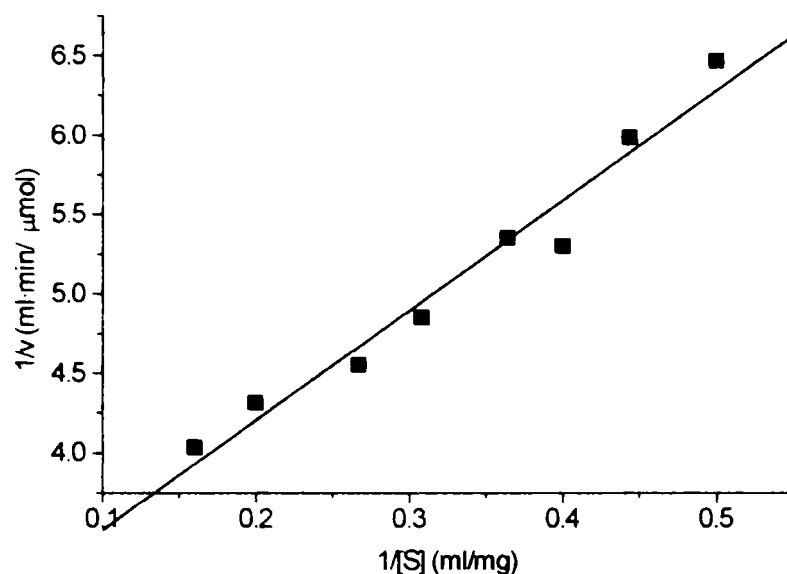


Figura 4.21. Liniarizarea Lineweaver-Burk pentru sistemul amidon (Zulkovsky)- $\alpha$ -amilază din *A. oryzae* (0,16 mg/ml,  $[E_0]=0,261$  U/ml, 37°C, pH 4,6)

#### 4.4.2.2. Cinetica reacției de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) cu amiloglucozidază (Amyloglucosidase Novo și *A. niger*) [4.21]

##### a) Determinarea parametrilor cinetici ai reacției de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) cu Amyloglucosidase (Novo)

În domeniul concentrațiilor studiate (1,50-6,25 mg/ml), viteza inițială de apariție a glucozei se situează în domeniul 0,54-0,71  $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$ , iar dispariția amidonului la o valoare medie de 0,29 mg/ml·min (tabel 4.51). Aceasta dovedește o viteză slabă de hidroliză a amidonului cu amiloglucozidaza, ceea ce și era de așteptat având în vedere specificitatea și mecanismul de acțiune al acestei enzime.

Tabel 4.51. Dependența vitezei de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) de concentrația substratului, folosind amiloglucozidaza (Novo) ( $[E_0]=43,1$   $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$ , 37°C, pH 4,6).

Nr. crt.	[S] mg/ml	1/[S] ml/mg	$V_i$ amidon mg/ml·min	$V_i$ glucoză $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$		1/ $V_i$ glucoză mol·min/ $\mu\text{mol}$
				exp.	calc.	
1	6,25	0,16	0,301	0,688	0,691	1,474
2	5,00	0,20	0,261	0,712	0,674	1,404
3	4,25	0,23	0,294	0,651	0,660	1,536
4	3,75	0,27	0,277	0,645	0,647	1,548
5	3,25	0,31	0,320	0,613	0,632	1,631
6	2,50	0,40	0,280	0,568	0,600	1,762
7	2,00	0,50	0,303	0,577	0,568	1,734
8	1,50	0,67	0,286	0,541	0,522	1,847

Corelând  $1/v_i$  glucoză în funcție de  $1/[S]$  (figura 4.22), se obțin datele inițiale ale lui  $K_m$  și  $V$  pentru corelarea hiperbolică:  $K_m=0,645$  mg/ml,  $V=0,7558$   $\mu$ mol/ml·min,  $r=0,933$ .

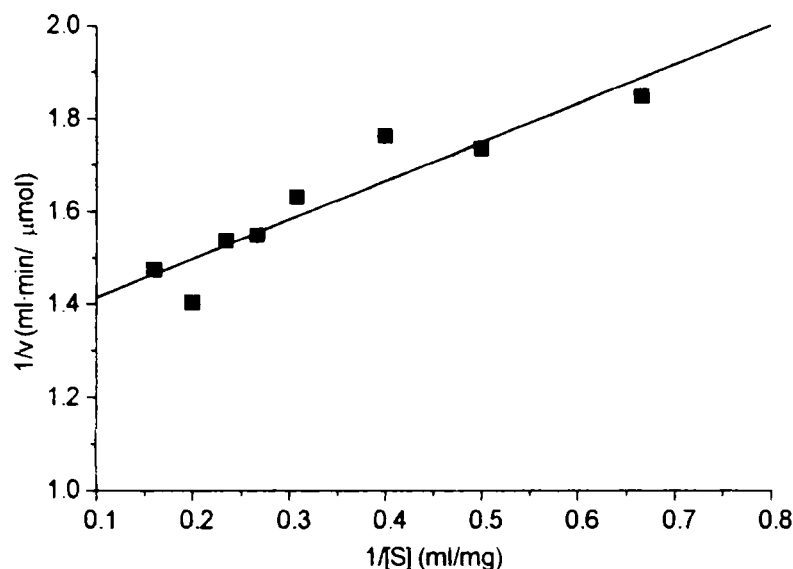


Figura 4.22. Liniarizarea Lineweaver-Burk pentru sistemul amidon (Zulkovsky)-amiloglucozidază (Novo) ( $[E_0]=43,1$   $\mu$ mol/ml·min,  $37^\circ\text{C}$ , pH 4,6).

Valorile calculate ale vitezelor inițiale de hidroliză, urmărite prin apariția glucozei, sunt foarte apropiate de cele experimentale. Din calculul hiperbolei se obține:

- $K_m = 0,711$  mg/ml
- $V = 0,7701$   $\mu$ mol/ml·min
- $k_2 = 0,018$   $\mu$ mol/ml·U
- $r = 0,950$
- suma pătratelor erorilor =  $3,36 \cdot 10^{-3}$

Deși asocierea enzimei cu substratul este bună ( $K_m=0,711$  mg/ml), viteza de scindare a complexului enzimă-substrat este mică ( $k_2=0,018$   $\mu$ mol/ml·U). Specificitatea de substrat  $k_2/K_m=0,0253$ , arată că această enzimă hidrolizează amidonul foarte încet și utilizarea ei singură este complet dezavantajoasă.

#### b) Determinarea parametrilor cinetici ai reacției de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) cu preparatul amiloglucozidazic de *A. niger*

În condiții similare cu cele de mai sus, viteza inițială de apariție a glucozei se situează în domeniul 0,03-0,06  $\mu$ mol/ml·min, iar dispariția amidonului la o valoare de 0,04-0,06 mg/ml·min (tabel 4.52). Aceasta dovedește din nou o slabă viteză de hidroliză a amidonului.

Corelând  $1/v_i$  glucoză în funcție de  $1/[S]$  (figura 4.23), se obțin:

- $K_m=2,68$  mg/ml
- $V=0,3164$   $\mu$ mol/ml·min
- $k_2 = 0,0052$   $\mu$ mol/ml·U
- $r=0,979$

Se constată că preparatul enzimatic obținut din *A. niger* are viteza maximă mai mică decât cel de firmă, în schimb  $K_m$  este mai mare, deci afinitatea față de substrat este mai mare, probabil datorită prezenței și a  $\alpha$ -amilazei în preparatul enzimatic.

Tabel 4.52. Dependența vitezei de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) de concentrația substratului, folosind amiloglucozidaza (*A. niger*) ( $[E_0]=60,4 \mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$ ,  $37^\circ\text{C}$ , pH 4,6).

Nr. crt.	[S] [mg/ml]	1/[S] [ml/mg]	$V_{\text{amidon}}$ [mg/ml·min]	$V_{i \text{ glucoză}}$ [ $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$ ]	$1/V_{i \text{ glucoză}}$ [min·ml/ $\mu\text{mol}$ ]
1	6,25	0,16	0,0693	0,0618	16,18
2	5,00	0,20	0,0628	0,0540	18,46
3	4,00	0,25	0,0591	0,0371	26,92
4	3,25	0,31	0,0456	0,0350	28,57
5	2,50	0,40	0,0436	0,0277	36,15

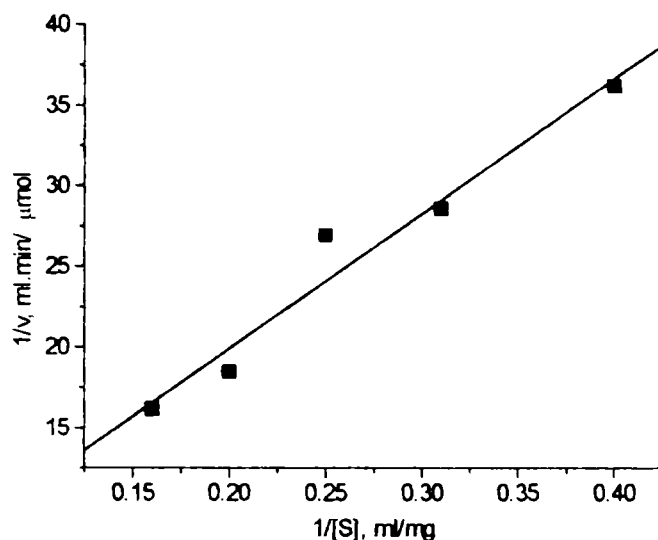


Figura 4.23. Liniarizarea Lineweaver-Burk pentru sistemul amidon (Zulkovsky)-amiloglucozidază (*A. niger*) ( $37^\circ\text{C}$ , pH 4,6,  $[E_0]=60,4 \mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$ ).

#### 4.4.2.3. Cinetica reacției de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) folosind sistemul $\alpha$ -amilază - amiloglucozidază

Studiul cinetic al acțiunii combinate a celor două enzime, prima o exo-amilază, cea de-a doua o endo-amilază, are sens deoarece în principiu enzima cu endo-acțiune, adică  $\alpha$ -amilaza, produce molecule de substrat pentru enzima cu exo-acțiune, adică amiloglucozidaza. Utilizând un raport corespunzător al celor două enzime, în anumite condiții, se poate pune în evidență un efect sinergetic.

Modelul cinetic al acțiunii sinergetice se bazează pe următoarele ipoteze [4.22]:

1. reactivitatea  $\alpha$ -amilazei și glucoamilazei față de fiecare moleculă de substrat este aceeași, când masa moleculară a substratului depășește o anumită valoare;
2. pe măsură ce are loc reacția catalizată de  $\alpha$ -amilază, crește concentrația de substrat pentru acțiunea glucoamilazei;
3. acțiunea  $\alpha$ -amilazei poate fi neglijată în momentul în care masa moleculară a substratului scade sub o anumită valoare;
4. din acest motiv reactivitatea egală a glucoamilazei din ipoteza 1 nu se mai menține și parametrii din ecuația vitezei de reacție se schimbă cu scăderea masei moleculare a substratului;

5. după acest punct din nou concentrația molară totală a substratului rămâne constantă până la terminarea reacției;
6. viteza de formare a glucozei este retardată de o inhibiție prin produs;
7. cinetica tuturor reacțiilor poate fi estimată prin ecuații de tip Michaelis-Menten.

Acțiunea sinergetică nu se manifestă dacă masa moleculară a substratului scade sub o anumită valoare (ipoteza 3) sau dacă concentrația de substrat este suficient de mare pentru a forma toți complexii glucoamilază-substrat, când viteza de formare a glucozei devine independentă de acțiunea  $\alpha$ -amilazei.

Am urmărit punerea în evidență a acestei acțiuni sinergetice prin determinarea parametrilor cinetici globali, respectiv a specificității de substrat și compararea acestora cu valorile individuale ale celor două enzime, atât în cazul preparatelor de firmă, cât și în cel al preparatelor de *A. oryzae* și *A. niger*.

**a) Determinarea parametrilor cinetici ai reacției de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) cu sistemul  $\alpha$ -amilază - amiloglucozidază (Novo)**

Efectul sinergetic al  $\alpha$ -amilazei și amiloglucozidazei a fost studiat în reacția de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) cu un amestec de  $\alpha$ -amilază (Fungamyl Novo, 1000 FAU/ml, diluție 10  $\mu$ l/l) și amiloglucozidază (Novo, 300 U/g, 1 mg/ml).

Variația vitezei inițiale de hidroliză a amidonului în funcție de concentrația substratului a fost studiată urmărind apariția glucozei prin metoda cu DNS. Între 1,5 – 5,0 mg/ml amidon, vitezele inițiale de apariție a glucozei sunt cuprinse între 0,289 – 0,403  $\mu$ mol/ml·min, iar dispariția amidonului în jurul valorii de 0,26 mg/ml·min (tabelul 4.53).

Valorile vitezelor inițiale de apariție a glucozei calculate din ecuația hiperbolei sunt foarte apropiate de cele experimentale, ceea ce dovedește o bună corelare hiperbolică a datelor experimentale.

Valorile găsite din liniarizarea Lineweaver-Burk (figura 4.24) sunt următoarele:

- $K_m = 1,002$  mg/ml;
- $V = 0,484$   $\mu$ mol/ml·min;
- $r = 0,990$ .

Corelarea hiperbolică duce la următoarele valori optime:

- $K_m = 0,985$  mg/ml;
- $V = 0,4817$   $\mu$ mol/ml·min;
- $r = 0,996$ .

Tabel 4.53. Dependența vitezei inițiale de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) de concentrația substratului, folosind  $\alpha$ -amilază și amiloglucozidază (Novo) ( $[E_o]_{\text{amilază}} = 3,4 \cdot 10^{-2}$  U/ml, 37°C, pH 4,6).

Nr. crt.	[S] mg/ml	1/[S] ml/mg	V <sub>i</sub> amidon mg/ml·min	V <sub>i</sub> glucoză $\mu$ mol/ml·min		1/ V <sub>i</sub> glucoză ml·min/ $\mu$ mol
				Exp.	calc.	
1	5,00	0,200	0,259	0,402	0,402	2,485
2	3,75	0,267	0,267	0,380	0,381	2,634
3	2,50	0,400	0,265	0,349	0,345	2,865
4	2,00	0,500	0,212	0,322	0,321	3,102
5	1,50	0,666	0,209	0,289	0,291	3,457



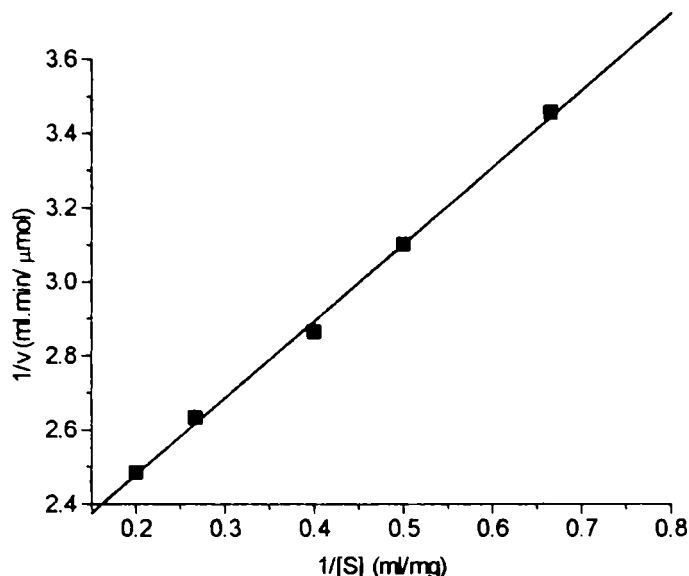


Figura 4.24. Liniarizarea Lineweaver-Burk pentru sistemul amidon (Zulkovsky) -  $\alpha$ -amilază/amiloglucozidază (Novo) ( $[E_0] = 3,4 \cdot 10^{-2}$  U/ml,  $37^\circ\text{C}$ , pH 4,6)

Pentru concentrația de activitate enzimatică pentru amilază  $[E_0] = 3,4 \cdot 10^{-2}$  U/ml, rezultă  $k_2 = 14,17$   $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{U}$ , iar specificitatea de substrat în acest caz este  $k_2/K_m = 14,38$ , cu mult mai mare decât la enzimele luate separat.

Se poate lucra cu  $[E_0]_{\text{amilază}}$  deoarece amestecul sintetic de  $\alpha$ -amilază și amiloglucozidază este apropiat de compoziția amilazei obținute prin culturi microbiene, iar aceasta conține amiloglucozidază cu două ordine de mărime mai puțin (exprimat în unități de activitate) decât  $\alpha$ -amilaza.

#### b) Determinarea parametrilor cinetici ai reacției de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) cu $\alpha$ -amilază (*A. oryzae*) - amiloglucozidază (*A. niger*)

Am reluat experimentele anterioare utilizând un amestec de  $\alpha$ -amilază (*A. oryzae*) și AMG (*A. niger*), în condiții similare cu cele de mai sus.

La concentrații de substrat variind între 1,5 – 5,0 mg/ml amidon, vitezele inițiale de apariție a glucozei sunt cuprinse între 0,225 – 0,325  $\mu\text{mol}/\text{ml} \cdot \text{min}$ , iar dispariția amidonului între 0,232-0,324 mg/ml·min (tabelul 4.54).

Tabel 4.54. Dependența vitezei inițiale de hidroliză a amidonului (Zulkovsky) de concentrația substratului, folosind  $\alpha$ -amilază (*A. oryzae*) și amiloglucozidază (*A. niger*) ( $[E_0]_{\text{amilază}} = 4,85 \cdot 10^{-2}$  U/ml,  $37^\circ\text{C}$ , pH 4,6).

Nr. crt.	[S] mg/ml	1/[S] ml/mg	$V_i$ amidon mg/ml·min	$V_i$ glucoză $\mu\text{mol}/\text{ml} \cdot \text{min}$	1/ $V_i$ glucoză ml·min/ $\mu\text{mol}$
1	6,25	0,16	0,324	0,325	3,071
2	5,00	0,20	0,293	0,301	3,318
3	4,00	0,25	0,288	0,298	3,352
4	3,25	0,31	0,254	0,267	3,750
5	2,50	0,40	0,284	0,244	4,089
6	2,00	0,50	0,232	0,225	4,451

Valorile găsite din liniarizarea Lineweaver-Burk (figura 4.25) sunt următoarele:

- $K_m = 1,578 \text{ mg/ml}$ ;
- $V = 0,399 \text{ } \mu\text{moli/ml}\cdot\text{min}$ ;
- $r = 0,997$ .

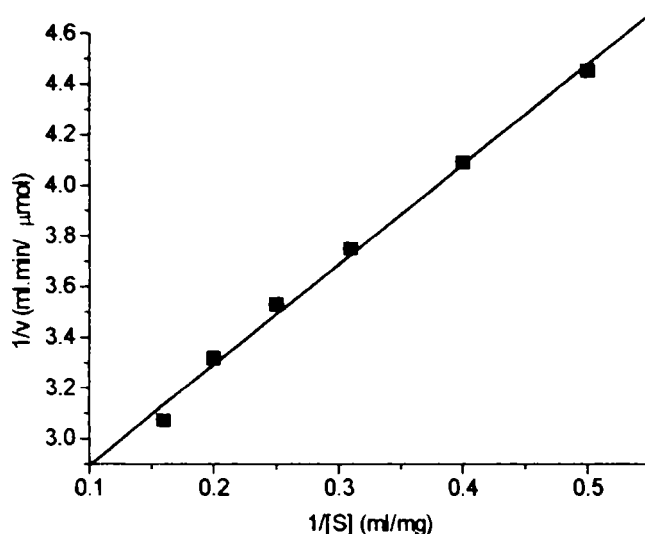


Figura 4.25. Liniarizarea Lineweaver-Burk pentru sistemul amidon (Zulkovsky) -  $\alpha$ -amilază/amiloglucozidază (Novo) ( $[E_0] = 4,85 \cdot 10^{-2} \text{ U/ml}$ ,  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH } 4,6$ )

Pentru concentrația de activitate enzimatică pentru amilază  $[E_0] = 4,85 \cdot 10^{-2} \text{ U/ml}$ , rezultă  $k_2 = 8,23 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{U}$ , iar specificitatea de substrat în acest caz este  $k_2/K_m = 5,217$ , cu mult mai mare decât la enzimele luate separat (1,526 pentru enzima de *A. oryzae* și 0,0052 pentru enzima de *A. niger*), dar de 2,75 ori mai mică decât la amestecul enzimelor de firmă.

Datele cinetice obținute în cazul amestecului de enzime sunt net superioare celor ale enzimelor luate separat, adică  $K_m$  este mai mică iar  $V$  este mai mare,  $k_2/K_m$  fiind de asemenea semnificativ mai mare, în condiții în care cantitatea de enzimă nu a fost optimizată în fiecare caz în parte.

#### 4.4.2.4. Cinetica reacției de hidroliză a mălaiului lichefiat cu amilaza. Determinarea parametrilor cinetici

Studiul cinetic al reacției de hidroliză a mălaiului lichefiat s-a efectuat în condițiile specifice substratului sub formă de suspensie. Astfel, prelevarea probelor din reactorul termostatat s-a efectuat cu ajutorul unor pipete speciale, iar reacția a fost stopată cu reactivul de culoare, DNS. După fierberea obișnuită și diluția cu apă, probele au fost centrifugate timp de 5 minute la 4000 rot/min, pentru eliminarea suspensiei și spectrofotometrate la 540 nm.

S-a lucrat cu concentrații de enzimă de 2,0 mg/ml, mai mari ca cele din experimentele anterioare, când reacția decurge cu viteză măsurabilă, în condiții care permit efectuarea calculelor cinetice. Mărind concentrația mălaiului și deci implicit a amidonului în sistem, se observă că gradul de transformare a amidonului pentru 2,0 mg/ml concentrație de enzimă rămâne în jurul valorii de  $25 \pm 4\%$  cu excepția ultimei concentrații când gradul de transformare atinge abia valoarea de 15% (tabel 4.55), situație explicabilă prin apariția inhibiției de substrat. Va exista deci un prag de concentrație a substratului pentru care nu se mai înregistrează o creștere a vitezei de reacție, prag care poate fi depășit prin creșterea concentrației de enzimă în sistem.

Tabel 4.55. Variația gradului de transformare a mălaiului cu concentrația substratului folosind  $\alpha$ -amilază (*A. oryzae*) (2,01 mg/ml, 37°C, pH 4,6)

Compoziția amestecului de reacție, ml			Concentrație amidon mg/ml		Amidon transformat/18 min. %
A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>	C <sup>c</sup>	Inițial	final	
1	4	35	2,00	1,50	25,0
2	4	34	3,15	2,29	27,3
3	4	33	4,85	3,45	28,8
4	4	32	5,98	4,75	20,6
5	4	31	6,18	5,27	14,7

<sup>a</sup> mălai; <sup>b</sup> enzimă; <sup>c</sup> tampon citrat-fosfat 0,15 M, pH 4,6.

În domeniul de concentrații de substrat studiate (2,0-6,2 mg/ml amidon), vitezele inițiale de hidroliză variază între 0,36-0,46  $\mu$ mol/ml-min (Tabel 4.56). Valorile calculate sunt apropiate de cele experimentale și dovedesc o bună corelare Lineweaver-Burk a datelor experimentale ( $r=0,977$ ) (figura 4.26).

Tabel 4.56. Dependența vitezei inițiale de hidroliză de concentrația substratului (mălai lichefiat)  $\alpha$ -amilază (*A. oryzae*) (2,01 mg/ml,  $[E_0]=0,798$  U/ml, 37°C, pH4,6).

Nr. crt.	[S] mg/ml	1/[S] ml/mg	V <sub>i</sub> glucoză $\mu$ moli/ml-min		1/ V <sub>i</sub> glucoză ml-min/ $\mu$ moli	
			Exp.	calc.	Exp.	calc.
1	2,00	0,500	0,365	0,364	2,740	2,740
2	3,15	0,317	0,417	0,417	2,396	2,398
3	4,85	0,206	0,457	0,458	2,186	2,188
4	6,18	0,162	0,495	0,476	2,025	2,021
5	5,98	0,167	0,456	0,474	2,190	2,193

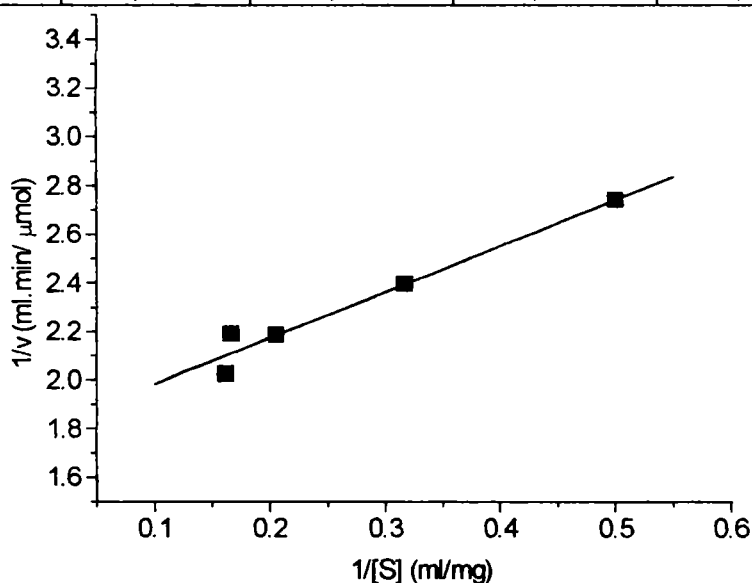
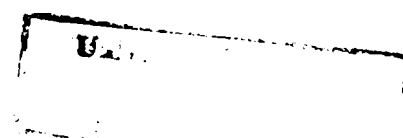


Figura 4.26. Liniarizarea Lineweaver-Burk pentru sistemul mălai lichefiat- $\alpha$ -amilază (*A. oryzae*) (2,01 mg/ml,  $[E_0]=0,798$  U/ml, 37°C, pH 4,6)



Parametrii cinetici calculați prin liniarizarea Lineweaver-Burk, la o concentrație a activității enzimatică de 0,798 U/ml sunt:

- $K_m = 1,052 \text{ mg/ml}$ ;
- $V = 0,5567 \text{ } \mu\text{moli/ml}\cdot\text{min}$ .
- $k_2 = 0,705 \text{ } \mu\text{moli/minU}$ ;
- $k_2/K_m = 0,671$ .

La concentrația activității enzimatică de 0,798 U/ml, valoarea  $k_2$  este 0,705  $\mu\text{mol/min}\cdot\text{U}$ , valoare care indică o bună viteză de hidroliză a mălaiului, ca urmare a scindării bune a complexului intermediar enzimă-substrat.

Datorită faptului că și asocierea enzimei cu substratul este destul de bună ( $K_m = 1,052 \text{ mg/ml}$ ), ea poate fi folosită în condiții bune la hidroliza industrială a amidonului.

#### 4.4.3. Studiul zaharificării mediilor amidonoase cu complexul amilolitic obținut din culturi de *A. oryzae* și *A. niger*

##### 4.4.3.1. Zaharificarea amidonului solubil

Studiul zaharificării enzimatică a amidonului solubil s-a realizat folosind ca substrat o soluție amidon 10%, la pH 5,0 (tampon acetat 0,1 M). Reacția de hidroliză enzimatică s-a inițiat prin introducerea unei cantități bine determinate de enzimă sau amestec de enzime. Amestecul s-a menținut sub agitare la 45°C, timp de 5-6 ore. Din amestecul de reacție s-au luat probe din timp în timp, care s-au analizat pentru determinarea amidonului rezidual și a zaharurilor reducătoare, respectiv a glucozei formate.

Amidonul rezidual din amestecul de reacție s-a determinat prin metoda spectrofotometrică cu iod, modificată în sensul că în probă nu se mai introduce soluție de enzimă. Cantitatea de amidon din soluție se determină cu relația:

$$C_{\text{amidon}} = \frac{E \cdot c_0}{E_0 \cdot V_{\text{pr}}}, \quad \text{mg/ml}$$

unde:

- $E$  = extincția la  $\lambda=595 \text{ nm}$  a probei analizate;
- $E_0$  = extincția la  $\lambda=595 \text{ nm}$  a probei standard de amidon;
- $c_0$  = concentrația inițială a soluției standard de amidon, mg/ml;
- $V_{\text{pr}}$  = volumul de probă luat în lucru.

Concentrația oligozaharidelor reducătoare, exprimate ca glucoză, s-a determinat prin metoda spectrofotometrică cu DNS, care a fost modificată în sensul că în probă nu se mai introduc enzimele amilolitice. S-a utilizat relația:

$$C_{\text{glucoză}} = \frac{E_p - E_m}{E_{SG}} \cdot \frac{c \cdot M \cdot V}{V_{\text{pr}} \cdot 10^{-3}}, \quad \text{mg/ml}$$

unde:

- $E$  = extincția soluției, la  $\lambda=505 \text{ nm}$ ;
- $\epsilon = 6,04 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , coeficientul molar de extincție al chinoniminei formate;
- $M$  = masa molară a glucozei, g;

- $V$  = volumul amestecului analizat, ml;
- $V_{pr}$  = volumul de probă luat în lucru.

Conținutul în amidon și respectiv cantitatea totală de glucoză ce se poate forma prin hidroliză, pentru amidonul solubil utilizat ca substrat în experimente, au fost determinate prin metoda Bertrand. Prin această metodă s-a determinat pentru soluția de amidon utilizată o concentrație de 9,32% amidon, ce corespunde unei soluții de glucoză de concentrație de 10,25%. Aceste valori au fost utilizate pentru determinarea conversiei reacției de hidroliză:

$$X = \frac{G_{\text{glucoză exp.}}}{G_{\text{glucoză teor.}}} \cdot 100, \%$$

S-au utilizat următoarele preparate enzimatic, cu activitatea amilazică și amiloglucozidazică determinată prin metodele standard:

- preparat enzimatic solid obținut din *A. oryzae*:

-  $a_{\alpha\text{-amilază}}$  = 14,0 U/mg solid;

-  $a_{\text{amiloglucozidază}}$  = 0,6 U/mg solid;

- preparat enzimatic solid obținut din *A. niger*:

-  $a_{\alpha\text{-amilază}}$  = 0,38 U/mg solid;

-  $a_{\text{amiloglucozidază}}$  = 0,66 U/mg solid;

- Fungamyl (Novo):

-  $a_{\alpha\text{-amilază}}$  = 25724,0 U/ml;

-  $a_{\text{amiloglucozidază}}$  = 11,52 U/ml;

- SAN (Novo):

-  $a_{\alpha\text{-amilază}}$  = 252,0 U/ml;

-  $a_{\text{amiloglucozidază}}$  = 368,1 U/ml;

În mediul descris, s-a studiat zaharificarea amidonului solubil, efectuându-se seturi de experimente în care s-a modificat tipul preparatului enzimatic; pentru același preparat enzimatic, s-a urmărit influența variației concentrației catalizatorului în mediul de reacție asupra producerii glucozei. În experimentele efectuate, concentrațiile inițiale ale amidonului în soluția de substrat și concentrațiile activității enzimatică în mediul de reacție au fost astfel alese încât să fie cât mai apropiate de cele utilizate în condiții industriale.

Urmărind variația amidonului în timp, s-a observat că în cazul utilizării enzimei obținute din *A. oryzae*, amidonul este hidrolizat total la dextrine în primele 60 minute de reacție; în schimb, când se realizează hidroliza cu preparatul enzimatic obținut din *A. niger*, consumul amidonului este mult mai lent (tabel 4.57, 4.58, figura 4.27). Acest fapt se poate explica prin diferența între concentrațiile de  $\alpha$ -amilază și amiloglucozidază în cele două produse, cât și prin mecanismele diferite de acțiune asupra amidonului ale celor două enzime.



Tabel 4.57. Consumul amidonului solubil sub acțiunea enzimelor amilolitice

Nr. crt.	Preparate enzimatice			Timp min	C <sub>amidon</sub> mg	Amidon rezidual %
	Enzimă	A <sub>α-amilază</sub> , U/ml	A <sub>AMG</sub> , U/ml			
1	<i>A. oryzae</i>	10,5	0,45	0	2,98	100,00
				2	1,98	66,44
				30	0,98	6,04
				60	0,08	2,72
				90	0,02	0,008
2	<i>A. niger</i>	0,58	0,51	0	2,98	100,00
				2	2,54	85,23
				30	2,06	69,13
				60	1,84	61,74
				90	1,50	50,33

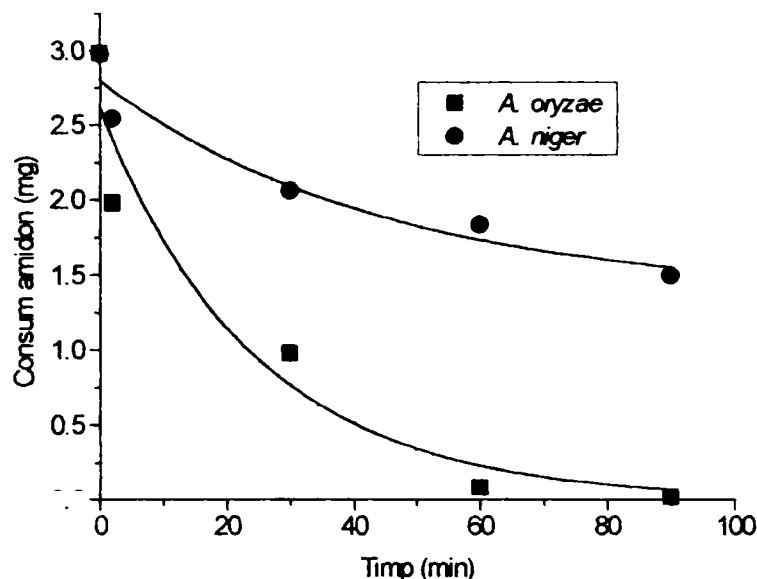


Figura 4.27. Consumul amidonului solubil sub acțiunea enzimelor amilolitice

Din datele prezentate se observă preparatele amilazice obținute hidrolizează și zaharifică amidonul. Prin acțiunea preparatului solid obținut din *A. oryzae* asupra amidonului se realizează o hidroliză totală a acestuia până la dextrine; concentrația glucozei în mediul de reacție, după 3 ore, nu depășește 1%. Rezultă că acest produs poate fi asimilat cu  $\alpha$ -amilaza.

Prin acțiunea preparatului enzimatic obținut din *A. niger* asupra amidonului, reacția este dirijată în sensul obținerii glucozei, mare parte din amidon rămânând nehidrolizat. Se desprinde de aici concluzia că produsul enzimatic solid obținut din *A. niger* poate fi asimilat cu amiloglucozidaza.

Prin acțiunea combinată a ambelor enzime ( $\alpha$ -amilaza și amiloglucozidaza) asupra amidonului (tabel 4.58) se realizează atât hidroliza cantitativă a amidonului cât și zaharificarea lui. Creșterea concentrației amiloglucozidazei în mediul de reacție de la 0,51 U/ml amestec la 24,8 U/ml amestec duce la o creștere a conversiei amidonului în glucoză de la 2 la aprox. 10%.

Tabel 4.58. Zaharificarea amidonului solubil

Nr. crt.	Preparat enzimatic	Timp min	Glucoză (DNS) mg	Conversie %
1.	Enzimă <i>A. oryzae</i> 10,5 U/ml $\alpha$ -amilază 0,45 U/ml AMG	15	11,72	0,37
		30	13,44	0,37
		45	15,70	0,42
		60	17,05	0,50
		90	18,74	0,61
		120	20,58	0,68
		150	21,82	0,78
		180	21,52	0,85
2.	Enzimă <i>A. niger</i> 0,58 U/ml $\alpha$ -amilază 0,51 U/ml AMG	0	0,30	-
		10	3,56	-
		20	1,20	0,25
		30	1,73	0,30
		45	2,67	0,44
		60	3,98	0,57
		75	4,73	0,62
		90	5,75	0,67
		105	8,53	0,89
		120	8,64	1,03
3	Enzimă <i>A. oryzae</i> 11,2 U/ml $\alpha$ -amilază 0,5 U/ml AMG + Enzimă <i>A. niger</i> 14,28 U/ml $\alpha$ -amilază 24,8 U/ml AMG	1	-	0,17
		15	20,97	1,19
		30	25,95	1,71
		60	27,77	3,14
		90	31,96	3,98
		120	30,66	5,23
		150	35,66	6,68
		180	38,06	9,94
4	Fungamyl 6,493 U/ml $\alpha$ -amilază $3 \cdot 10^{-3}$ U/ml AMG + SAN 0,315 U/ml $\alpha$ -amilază 0,567 U/ml AMG	1	25,43	0,71
		15	67,93	2,28
		30	66,55	2,14
		45	67,10	2,19
		60	38,46	3,86
		90	38,34	3,81
		120	37,72	3,92
		140	36,13	3,91
		175	26,22	3,49
		200	35,97	3,94
1540	37,55	10,83		

Comparând rezultatele obținute la zaharificarea amidonului realizată cu enzimele amilolitice obținute precum și cu enzimele de firmă Fungamyl și SAN, se observă că la concentrații aproximativ egale de  $\alpha$ -amilază și amiloglucozidază în mediul de reacție, se obțin rezultate similare (hidroliza totală a amidonului, respectiv conversia la glucoză de aprox. 10%).

În toate experimentele se observă o scădere a vitezei de reacție în timp, fapt ce se poate explica prin apariția unei inhibiții manifestate de produsul de reacție, glucoza, asupra activității enzimelor amilolitice.

#### 4.4.3.2. Zaharificarea mălaiului lichefiat

Cunoscând acțiunea preparatelor amilolitice din *A. oryzae* și *A. niger* asupra amidonului solubil, s-a studiat comportarea lor asupra mălaiului lichefiat, substratul amilazelor în procesele industriale.

Studiul reacției de hidroliză a mălaiului lichefiat s-a efectuat ținând cont din nou de condițiile specifice substratului sub formă de suspensie, prin prelevarea probelor cu ajutorul unor pipete speciale și stoparea reacției cu reactivul de culoare, DNS. După fierberea obișnuită și diluția cu apă, probele au fost centrifugate timp de 5 minute la 4000 rot/min, pentru eliminarea suspensiei și filtratele analizate pentru determinarea glucozei formate.

Conținutul în amidon și respectiv cantitatea totală de glucoză ce se poate forma prin hidroliză, pentru mălaiul lichefiat, s-au determinat prin metoda Bertrand. Astfel, suspensia de mălai conține 10,42% amidon, ceea ce corespunde unei concentrații de glucoză de 11,57%. Aceste date au fost folosite pentru determinarea conversiei amidonului în glucoză.

În studiile de zaharificare efectuate s-a modificat tipul de preparat enzimatic, respectiv concentrația enzimelor în mediul de reacție. Concentrațiile activității enzimatice în mediul de reacție au fost astfel alese încât să fie apropiate de cele utilizate în condiții industriale. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 4.59.

Se observă că amilaza din *A. oryzae* produce o hidroliză totală a amidonului la dextrine, dar concentrația glucozei în amestecul de reacție nu depășește 0,6-1,75 mg/ml. Prin utilizarea combinată a preparatelor obținute din *A. oryzae* și *A. niger*, respectiv  $\alpha$ -amilază și AMG, se realizează atât hidroliza totală a amidonului cât și o zaharificare mai eficientă, obținându-se conversii ale amidonului în glucoză de aproximativ 10%. Se observă apariția inhibiției de produs.

Rezultatele obținute la zaharificarea amidonului cu enzimele amilolitice obținute sunt similare cu cele obținute cu preparatele comerciale Fungamyl și SAN.

Tabel 4.59. Zaharificarea mălaiului lichefiat

Nr. crt.	Preparat enzimatic conc. U/ml	Timp ore	Glucoză (DNS) mg	Conversie %
1	Enzimă <i>A. oryzae</i>	10	0,25	0,15
	21,0 U/ml $\alpha$ -amilază	30	7,93	0,21
	0,9 U/ml AMG	60	11,05	0,42
		93	13,30	0,55
		125	13,21	0,92
		150	14,62	0,87
		180	14,83	0,87
		210	15,08	0,94
		240	16,08	1,17
		1540	18,11	1,07
2	Enzimă <i>A. oryzae</i>	120	18,86	3,37
	70,0 U/ml $\alpha$ -amilază	180	19,61	5,21
	3,0 U/ml AMG	240	16,20	5,66
	+	300	22,68	8,44
	Enzimă <i>A. niger</i> 8,25 U/ml AMG	1540	26,50	10,13
3	Fungamyl	120	26,52	8,94
	6,43 U/ml $\alpha$ -amilază	180	25,92	11,06
	3·10 <sup>-3</sup> U/ml AMG	240	18,52	9,90
	+	300	26,75	12,62
	SAN	1540	29,82	12,78
	0,315 U/ml $\alpha$ -amilază 0,567 U/ml AMG			

#### 4.5. Concluzii

1. S-au determinat parametrii cinetici ai enzimelor produse de *A. oryzae* 242 și *A. niger* IC și s-au comparat cu cei ai unor enzime etalon, de firmă. Preparatul produs de *A. oryzae* a prezentat o afinitate mare față de substrat (amidon sau mălai) și o capacitate de transformare mare a acestuia în oligozaharide, dar o viteză relativ mică de formare de zaharuri reducătoare. Preparatul produs de *A. niger* hidrolizează și el amidonul, dar foarte încet. De aceea este utilă utilizarea concomitentă a lor, pentru că amestecul întrunește avantajele ambelor enzime: o bună viteză de hidroliză a amidonului, cu formare de oligozaharide, substrat pentru glucoamilază, și o viteză relativ bună de transformare a lor în zaharuri reducătoare, comparabilă cu cea a enzimelor de firmă.

2. Preparatele amilazice obținute hidrolizează și zaharifică amidonul. Prin acțiunea preparatului solid obținut din *A. oryzae* asupra amidonului se realizează o hidroliză totală a acestuia până la dextrine; concentrația glucozei în mediul de reacție, după mai multe ore, este minimă. Rezultă că acest produs poate fi asimilat cu  $\alpha$ -amilaza.

3. Prin acțiunea preparatului enzimatic obținut din *A. niger* asupra amidonului, reacția este dirijată în sensul obținerii glucozei, mare parte din amidon rămânând nehidrolizat. Se desprinde de aici concluzia că produsul enzimatic solid obținut din *A. niger* poate fi asimilat cu amiloglucozidaza.

4. Prin acțiunea combinată a ambelor enzime ( $\alpha$ -amilaza și amiloglucozidaza) asupra amidonului se realizează atât hidroliza cantitativă cât și zaharificarea lui. Creșterea concentrației amiloglucozidazei în mediul de reacție duce la o creștere a conversiei amidonului în glucoză până la aprox. 10%. La concentrații aproximativ egale de  $\alpha$ -amilază și amiloglucozidază în mediul de reacție, se obțin rezultate similare cu cele obținute la utilizarea unor enzime de firmă (Fungamyl, SAN).

5. În toate experimentele se observă o scădere a vitezei de reacție în timp, fapt ce se poate explica prin apariția unei inhibiții manifestate de produsul de reacție, glucoza, asupra activității enzimelor amilolitice.

6. Amilaza din *A. oryzae* produce o hidroliză totală a amidonului din mălai la dextrine, dar concentrația glucozei în amestecul de reacție rămâne redusă. Prin utilizarea combinată a preparatelor obținute din *A. oryzae* și *A. niger* se realizează atât hidroliza totală a amidonului din mălai cât și o zaharificare mai eficientă, obținându-se conversii ale amidonului în glucoză de aproximativ 10%. Se observă apariția inhibiției de produs. Și în acest caz rezultatele sunt similare cu cele obținute cu preparatele comerciale Fungamyl și SAN.



#### 4.6. Bibliografie

- 4.1. A. Anghel, A. Kaycsa, E. Deretey, C. Boeriu, S. Eisler, G. Preda, F. Peter în Al-VI-lea Simpozion de microbiologie industrială și biotehnologie, 10-12.09. 1987, Ed N. D. Topală, Societatea de Științe Biologice, Filiala Iași, p. 205-210.
- 4.2. A. Anghel, A. Kaycsa, E. Deretey, C. Boeriu, S. Eisler, G. Preda în Al-VI-lea Simpozion de microbiologie industrială și biotehnologie, 10-12.09. 1987, Ed. N. D. Topală, Societatea de Științe Biologice, Filiala Iași, p. 211-216.
- 4.3. C. Boeriu, G. Preda, *Buletinul Științific și Tehnic al IPTVT, seria Chimie*, **34** (48), 93 (1989).
- 4.4. --- *Organic Syntheses*, vol. 3, John Wiley, New York, 1965, p. 10.
- 4.5. --- *Beilsteins Handbuch der Organischen Chemie*, vol. 2, Springer Verlag, Berlin, 1923, p. 160.
- 4.6. The Aldrich Library of Infrared Spectra, 2<sup>nd</sup> edition, 1975, 330E.
- 4.7. W. E. Traveyan, *Carbohydrate Res.*, **2** (5), 418 (1966).
- 4.8. T. C. Benner, E. J. Baume, S. McNally, *J. Chem. Soc.* (1962) 761
- 4.9. A. Anghel, Adriana Stoi, E. Deretey, Gabriela Preda, Gr. Pop, G. Musca, Simpozion ICECHIM, 30 ian. 1987.
- 4.10. Adriana Stoi, M. Buliga, E. Deretey, Gabriela Preda, Sigrun Eisler, Al III-lea Congres Național de Chimie, București, România, 21-24 sept. 1988, ICECHIM, Academia RSR, vol.III, p. 772.
- 4.11. G. Preda, C. Boeriu, E. Deretey, M. Medeleanu, F. Peter, *Chem. Bull. Tech. Univ. Timișoara*, **39**, 37 (1994).
- 4.12. G. Preda, C. Boeriu, E. Deretey, F. Peter, *Chem. Bull. Tech. Univ. Timișoara*, **41** (55), 51 (1996).
- 4.13. x x x *Biochimia produselor alimentare*, Ed. Tehnică, București, 1971, p. 493-518.
- 4.14. K. Plowmann, *Enzyme Kinetics*, Ed. Mc. Graw-Hill, New York, 1972.
- 4.15. D. E. Metzler, *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells*, Academic Press, New York, 1972.
- 4.16. J. F. Robyt, D. French, *Ach. Biochem. Biophys.* **122**, 8 (1967).
- 4.17. J. E. Rollings, R. W. Thomson, *Biotechnol. Bioeng.* **29**, 453 (1987).
- 4.18. K. Kusunoki, K. Kawakani, F. Sharaishi, K. Kato, H. Kaim, *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 347 (1982).
- 4.19. G. Preda, F. Peter, M. Dragomirescu, C. Csunderlik, A. Chiriac, *Amilaze fungice*, Seria Monografii de Chimie nr. 45, Tipografia Universității de Vest din Timișoara, 2002.
- 4.20. G. Preda, C. Boeriu, F. Peter, *Annals of West University of Timișoara, ser. chem.*, **6**, 331 (1997).
- 4.21. G. Preda, M. Dragomirescu, F. Peter, *Lucrări științifice, Zootehnie și Biotehnologii*, vol. XXXIII, 495 (2000).
- 4.22. M. Fuji, Y. Kawamura, *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 260 (1985).

*Motto:*

*Il y a la science et les applications de la science, liées  
entre elles comme le fruit à l'arbre qui l'a porté.*

Louis Pasteur, 1871

## 5. Sinteza aminoacizilor optic activi prin rezoluție cinetică enzimatică cu enzime proteolitice

Piața mondială de enzime poate fi împărțită convențional în trei segmente: enzime industriale, enzime cu aplicații terapeutice și enzime pentru analiza clinică și a produselor alimentare.

Piața enzimelor la nivelul anului 1990 a fost de aproximativ 500 milioane \$, din care ~75% au reprezentat enzimele pentru trei domenii importante: detergenți, produse lactate (în special brânzeturi) și prelucrarea amidonului, adică proteaze (~50%), amilaze (~20%) și lipaze (2%), situație valabilă în principiu și astăzi. Astfel, piața de proteaze a fost de 285 milioane \$, din care proteazele alcaline bacteriene pentru detergenți 180 milioane \$ (36% din piața mondială de enzime), renina de vițel și microbiană 70 milioane \$, iar proteazele de plante 25 milioane \$. Este normal că în aceste condiții, producătorii s-au preocupat cu preponderență de obținerea unor enzime cu aplicații în aceste domenii mari și nu pentru sinteza organică fină. Cu toate acestea, sinteza organică poate beneficia de dezvoltarea unor enzime performante în alte industrii. Într-adevăr, multe enzime utilizate în mod curent în sintezele organice enantioselective au fost dezvoltate pentru alte aplicații: subtilizina pentru detergenți sau lipaza din *Mucor miehei* pentru industria de brânzeturi.

Prețurile enzimelor industriale importante (ca proteină 100%) se pot compara cu cele ale catalizatorilor de metale tranzitionale. Astfel, proteaza alcalină utilizată în industria de detergenți costă aproximativ 100 \$/kg enzimă pură (1991) și reprezintă 1-4% din costul detergenților. Chimozina (renina de vițel), deși costă 5000 \$/kg, reprezintă doar 0,1-0,3% din costul brânzeturilor. Comparativ, catalizatorul de platină utilizat în rafinarea petrolului costă 16.000 \$/kg (1991) și reprezintă sub 5% din costul produsului [5.1]. Aceasta deoarece, chiar dacă prețul enzimelor este relativ mare, datorită activității lor ridicate, sunt necesare cantități mici, ceea ce determină consumuri specifice mici și deci cheltuieli pe unitatea de produs reduse.

Prima utilizare a unui biocatalizator în sinteza organică a fost raportată în 1961: utilizarea chimotripsinei în hidroliza enantiospecifică a esterilor. Nu a urmat însă o aplicare largă a enzimelor în sinteza organică. Aceasta deoarece s-a menținut mult timp concepția greșită că enzimele lucrează numai în mediu apos iar cataliza enzimatică este incompatibilă cu cea mai mare parte a sintezelor organice care se desfășoară în mediu neapos. Situația s-a modificat esențial la mijlocul anilor '80 când A. M. Klibanov a demonstrat că majoritatea enzimelor lucrează bine în solvenți organici, ceea ce a marcat începutul unei dezvoltări explozive în aplicarea enzimelor în sinteza organică enantioselectivă. Acestui fapt i s-au adăugat tehnologia ADN recombinat (ingineria microbiană) și ingineria proteinelor care au permis proiectarea și obținerea de enzime în cantitate industrială pentru tehnologii atractive comercial.

Aplicația descrisă în continuare reprezintă un exemplu de utilizare a unui catalizator enzimatic relativ ieftin și utilizat pe scară largă într-o industrie bine dezvoltată cum este cea de detergenți, în sinteza organică.

Ca o tendință generală a ultimilor ani se remarcă utilizarea solvenților organici ca mediu de reacție pentru reacțiile enzimatică. Folosirea solvenților organici prezintă o serie de avantaje, între care se numără solubilitatea mare a substraturilor polare și nepolare în numeroși solvenți și inhibarea reacțiilor secundare, nedorite, datorate activității ridicate a apei.

Cu toate acestea, efectele mediului de reacție asupra selectivității enzimelor nu sunt încă pe deplin cunoscute. În literatură sunt descrise o serie de reacții în care enantioselectivitatea enzimei este dependentă de natura solventului organic, cum ar fi hidroliza de esteri, esterificarea sau transesterificarea catalizate de diverse tipuri de proteaze sau lipaze [5.33].

Conținutul în apă al unui solvent organic poate fi un factor decisiv în enantiospecificitatea unei enzime. Astfel, prin selectarea unui mediu apos-organic potrivit se poate găsi o cale optimă de rezoluție cinetică enzimatică a unor amestecuri racemice.

Așa cum s-a arătat în capitolul de sinteze de aminoacizi optic activi, principalele metode de obținere a acestora sunt metodele de cristalizare (rezoluția racemaților prin cristalizarea diastereomerilor), procedeele fermentative, sinteza asimetrică din substraturi prochirale, chemo sau biocatalitică, sau rezoluția cinetică enzimatică. Care metodă este cea mai avantajoasă economic pentru un anumit aminoacid depinde mult de economicitatea procesului și de cererea pieței, de importanța la un moment dat a aminoacidului ca sinton chiral. Dintre metodele biocatalitice, la prima vedere sinteza asimetrică pare a avea un avantaj net, și anume randamentul teoretic de 100%, comparativ cu 50% pentru rezoluția cinetică. Din păcate, lucrurile sunt ceva mai complicate și rezoluția cinetică are o serie de avantaje față de sinteza asimetrică. În primul rând pentru că rezoluția cinetică este un proces mai simplu, care adesea are loc cu o productivitate mai mare, la o puritate optică echivalentă. În al doilea rând, are avantajul că excesul enantiomeric al substratului nereacționat poate fi modificat în sensul dorit prin modificarea conversiei. În practică, se preferă sacrificarea unui anumit procent din randamentul chimic, în scopul obținerii unui material de o puritate optică mai mare.

Dezavantajul major al rezoluției cinetice este acela că necesită cel puțin o etapă în plus, și anume racemizarea enantiomerului nedorit. Din păcate, racemizarea este adesea cea mai dificilă etapă din întregul proces. Tocmai de aceea, dacă se reușește racemizarea enantiomerului nedorit, rentabilitatea procesului crește. O alternativă la racemizare este găsirea unui mijloc de inversie a configurației enantiomerului nedorit. În unele cazuri, de excepție din păcate, el poate suferi o racemizare spontană *in situ*, într-un proces de rezoluție cinetică dinamică, echivalent formal cu o sinteză asimetrică.

Succesul rezoluției cinetice depinde de diferența de viteză cu care reacționează enantiomerii unui amestec racemic cu un reactant chiral. Din punct de vedere economic, este de preferat ca acesta din urmă să se utilizeze în cantități catalitice, indiferent dacă este un catalizator chimic sau biologic.

Rezoluția cinetică poate fi definită ca un proces în care unul dintre enantiomerii unui amestec racemic este transformat mai rapid decât celălalt, reacția oprindu-se undeva la o conversie între 0 și 100%. În cazul ideal, o reacție decurge mult mai repede ca cealaltă și un amestec inițial 50/50, la o conversie de 50%, conduce la 50% reactant și 50% produs. Natura produsului, chirală sau achirală, este irelevantă din punctul de vedere al rezoluției cinetice.

Raportul enantiomeric,  $E$ , este o măsură a eficacității rezoluției cinetice. El este raportul constantelor de viteză de ordin pseudo întâi ale celor doi enantiomeri, adică într-o reacție în care enantiomerul  $S$  reacționează selectiv,  $E_S = k_S/k_R$ . Conducând reacția la

conversii convenabile, se poate obține cu puritate optică mai mare fie enantiomerul mai reactiv, fie cel mai puțin reactiv. În general, pentru a obține randamente acceptabile economic de produs cu puritate enantiomerică suficientă, E ar trebui să fie de ~ 20, preferabil >100.

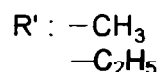
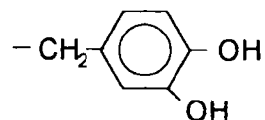
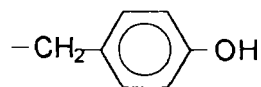
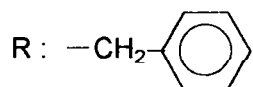
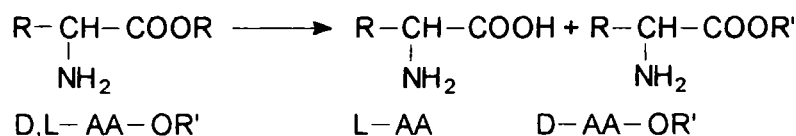
Numărul total de etape este important în economicitatea oricărui proces. Mai multe etape înseamnă un timp de reacție mai lung, costuri mai mari și productivități mai mici. În procesul de rezoluție, dacă produsul cerut este format direct, el se numește atractiv, dacă nu, se numește substractiv. Diferența dintre un proces substractiv și unul atractiv rezidă în numărul de pași chimici, și anume cel substractiv are mai mulți pași.

Poziția etapei de rezoluție în sinteză are de asemenea un rol în economicitatea reacției. Regula este că treapta de rezoluție trebuie să fie cât mai în față în succesiunea de etape. Acesta deoarece orice etapă care implică un racemat poartă după sine în proces 50% balast enantiomeric. Eliminarea acestui balast mărește automat cantitatea de reactivi, solvenți, volumul reactorului, etc., din etapele următoare.

Un alt factor care influențează numărul total de etape ale procesului de rezoluție este natura substratului, și anume dacă substratul este un precursor sau un derivat al produsului racemic. Astfel, o rezoluție a unui precursor necesită cu două etape mai puțin decât procesul echivalent care implică rezoluția unui derivat al substanței de separat. Trebuie văzut evident și care dintre cei doi se sintetizează mai ușor și mai economic.

Dintre variantele de sinteze de aminoacizi optic activi, în prezentul studiu m-am oprit asupra rezoluției cinetice a esterilor de aminoacizi cu enzime proteolitice. În alegerea procesului un criteriu de bază a fost accesibilitatea enzimei. Apoi, am ales o singură etapă de derivatizare, lucrând cu esteri de aminoacizi. Principial se poate lucra în două variante: cu esteri de aminoacizi neacilați, sau esteri de N-acil-aminoacizi, ceea ce implică o etapă de derivatizare în plus. Am ales prima variantă, care mai are un avantaj suplimentar, și anume faptul că, dacă se lucrează într-un mediu apos-organic potrivit, produsul principal de reacție, L-aminoacidul, este insolubil în acesta și poate fi separat direct, fără o etapă fizică suplimentară de concentrare prin evaporare la vid.

Obiectivul propus a fost obținerea de aminoacizi optic activi prin hidroliza enantioselectivă a esterilor de aminoacizi racemici în solvenți organici, cu enzime proteolitice, cum sunt de exemplu Alcalase și Savinase (Novo). Sinteza aminoacizilor optic activi decurge conform următoarei reacții:



Alcalase și Savinase sunt proteaze industriale produse de firma Novo-Nordisk și utilizate în formularea detergentilor, pentru eliminarea resturilor proteice puțin solubile și



aderente la suprafața textilelor. Alcalase și Savinase hidrolizează aceste proteine la peptide ușor dizolvate și dispersate de soluțiile de spălare.

Alcalase și Savinase sunt serin-proteinaze cu performanțe deosebite, Alcalase la temperatură ridicată și alcalinitate moderată iar Savinase la pH ridicat. Sunt produse prin fermentație în mediu submers, Alcalase dintr-o tulpină selecționată de *Bacillus licheniformis* iar Savinase dintr-o specie alcalofilă de *Bacillus* modificată genetic [5.2].

Enzimele hidrolizează enantioselectiv doar esterul de L-aminoacid. Produsul de reacție, L-aminoacidul liber, precipită în mediul apos-organic datorită solubilității sale scăzute. Esterul de D-aminoacid, nehidrolizat, rămâne practic cantitativ în soluție.

Studiul procesului implică deci două etape:

- esterificarea aminoacidului racemic,
- hidroliza enzimatică a esterului de aminoacid.

### 5.1. Esterificarea aminoacizilor

Esterificarea aminoacizilor cu diferiți alcooli se poate efectua în prezență de acid clorhidric [5.3, 5.4, 5.5], metoda clasică introdusă de Emil Fischer, clorură de tionil [5.3, 5.4, 5.6] sau acid p-toluensulfonic [5.4].

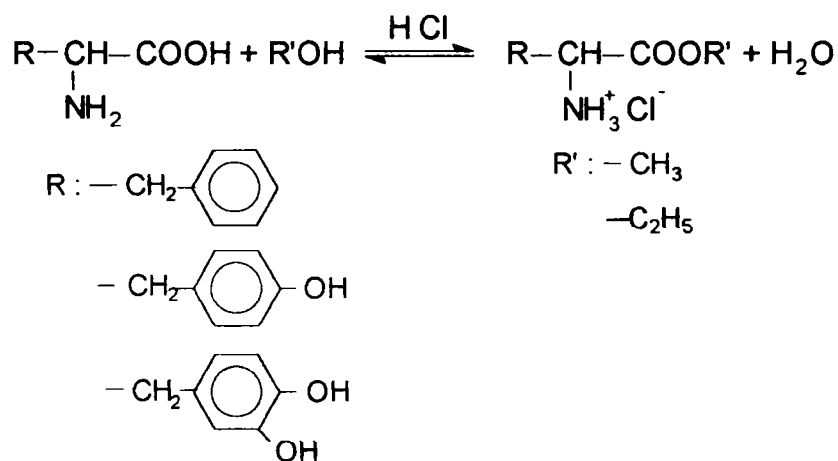
Dintre variantele indicate în literatură, am utilizat metodele de esterificare cu alcool și acid clorhidric gazos, respectiv alcool și clorură de tionil. Scopul a fost găsirea unei metode simple, dar eficiente de esterificare cantitativă a DL-aminoacizilor. Aceasta pentru că, deși esterificarea poate fi considerată o etapă banală, ea este foarte importantă deoarece randamentul poate fi o problemă, din cauza echilibrului, iar puritatea esterilor de aminoacizi este un factor esențial în performanțele reacției de rezoluție cinetică.

Au fost esterificați trei aminoacizi aromatici: fenilalanină, tirozină și DOPA. Aceasta deoarece enzimele testate, Alcalase și Savinase, sunt serin-proteinaze cu specificitate maximă de substrat pentru tirozină. În încercările preliminare au mai fost esterificate și fenilglicina și leucina, dar reacțiile de rezoluție cinetică au mers cu randamente mici, produșii obținuți având excесе enantiomerice insatisfăcătoare în comparație cu cei trei aminoacizi aromatici amintiți.

Esterii de aminoacizi s-au obținut și s-au utilizat sub formă de clorhidrați, mult mai ușor de manipulat decât esterii liberi.

#### 5.1.1. Esterificarea cu alcool anhidru și acid clorhidric gazos

Reacția de esterificare decurge conform următoarei ecuații:





Esterificarea s-a realizat la rece, cu metanol anhidricat [5.7] sau etanol anhidru [5.8], utilizat atât ca reactant cât și ca solvent. Drept catalizator s-a utilizat acid clorhidric gazos, generat din NaCl și H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc., dizolvat în soluție până la saturație și barbotat pe tot timpul esterificării (cap. 6.2.5.1.a,c). S-au obținut esterul metilic al DL-fenilalaninei, DL-tirozinei și al DL-DOPA și esterul etilic al DL-tirozinei. Cantitățile de reactanți, randamentele și caracteristicile fizice ale produșilor sunt prezentate în tabelele 5.1 și 5.2.

 Tabelul 5.1. Esterificări cu alcool anhidru/HCl<sub>g</sub>

Nr. crt.	Denumire	DL-AA		R'OH anh. <sup>a</sup>		Raport molar	DL-AA-OR'.HCl	
		g	mmoli	ml	nr. moli	DL-AA : R'OH	g	η (%)
1	DL-Phe-OMe.HCl	20	0.120	238.6	7.45	1:62.0	23.0	88.12
2	DL-Phe-OMe.HCl	10	0.060	119.3	3.73	1:62.0	11.8	90.42
3	DL-Tyr-OMe.HCl	15	0.083	225.0	5.57	1:67.0	16.3	84.78
4	DL-Tyr-OEt.HCl	10	0.055	150.0	2.57	1:47.0	12.1	89.23
5	DL-DOPA-OMe.HCl	5	0.025	85.0	0.38	1:15.2	6.0	95.54
6	DL-DOPA-OMe.HCl	10	0.050	150.0	4.69	1:93.8	11.7	93.40

<sup>a</sup>Alcoolul utilizat a fost: MeOH (sintezele 1,2,3,5,6) și EtOH (sinteza 4);

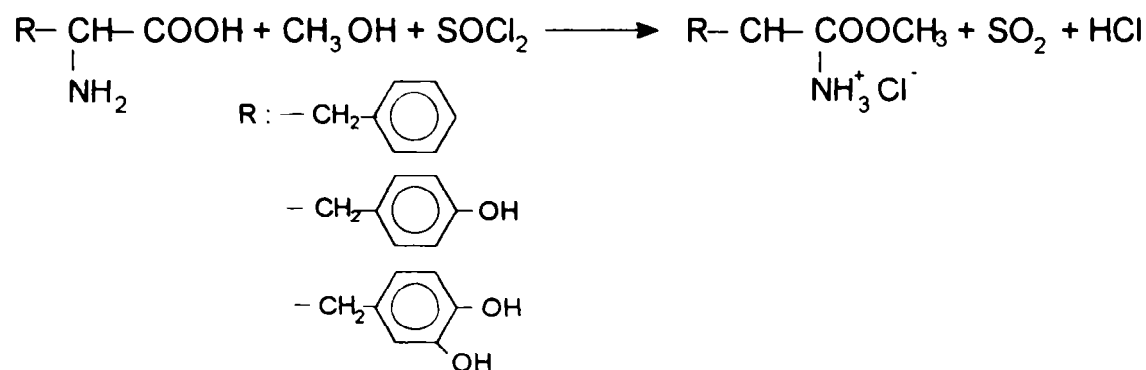
Esterii de aminoacizi (DL-Phe-OMe.HCl, DL-Tyr-OMe.HCl, DL-Tyr-OEt.HCl, DL-DOPA-OMe.HCl) au fost obținuți sub formă de clorhidrați, cu randamente ridicate, de 88-95%. Ei au fost purificați prin dizolvare în MeOH și reprecipitare cu eter (MeOH<sub>anh</sub>:eter 1:4, v/v) pentru îndepărtarea aminoacidului neesterificat și caracterizați prin punct de topire, spectru IR și cromatografie în strat subțire (tabelul 5.2). Spectrele IR reprezentative ale esterilor de aminoacizi sunt prezentate în anexă.

Tabelul 5.2. Caracteristicile fizico-chimice ale esterilor de aminoacizi

Nr. crt.	Denumire	p. t. °C	R <sub>f</sub> ester	R <sub>f</sub> aminoacid nereacționat	Eluent
1	DL-Phe-OMe.HCl	156-158	0,67	0,57	nBuOH:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O 60:20:20
2	DL-Phe-OMe.HCl	157-159	0,67	0,57	nBuOH:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O 60:20:20
3	DL-Tyr-OMe.HCl	177-180	0,64	0,53	nBuOH:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O 60:20:20
4	DL-Tyr-OEt.HCl	161-163	0,87	0,80	nBuOH:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O 60:20:20
5	DL-DOPA-OMe.HCl	171-173	0,59	0,43	nBuOH:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O 60:20:20
6	DL-DOPA-OMe.HCl	173-175	0,80	0,67	nBuOH:CH <sub>3</sub> COOH:CH <sub>3</sub> COOCH <sub>3</sub> : H <sub>2</sub> O 1:1:1:1

### 5.1.2. Esterificarea cu alcool și clorură de tionil

Aminoacizii se esterifică cu metanol și clorură de tionil conform următoarei reacții:



Esterificarea se realizează prin introducerea lentă, la rece, în metanol anhidru, a clorurii de tionil, apoi a aminoacidului și încălzire ușoară (cap. 6.2.5.1.b) Cantitățile de reactanți, randamentele de reacție și caracteristicile fizico-chimice ale produșilor sunt prezentate în tabelele 5.3 și 5.4.

Tabel 5.3. Esterificarea aminoacizilor cu metanol și clorură de tionil

Nr. crt.	Denumire	DL-AA		MeOH ml	SOCl <sub>2</sub> ml	Raport molar AA:MeOH:SOCl <sub>2</sub>	Timp h	DL-AA-Me-HCl <sup>b</sup>	
		g	mmoli					g	η (%)
1	DL-Phe-OMe-HCl	5	30	9,20	2,50	1 : 7,6 : 1,10	5,0	4,58	70,12
2	DL-Phe-OMe-HCl	5	30	9,10	2,40	1 : 7,5 : 1,10	3,5	5,14	79,43
3	DL-Tyr-OMe-HCl	5	28	8,40	2,10	1 : 7,5 : 1,04	2,5	5,56	86,98
4	DL-Tyr-OMe-HCl	0,9	5	1,50	0,40	1 : 7,6 : 1,12	2,0	1,17	100,00
5	DL-Tyr-OMe-HCl	8	44	13,40	3,60	1 : 7,5 : 1,10	3,0	9,00	87,98
6	DL-DOPA-OMe-HCl	1	5	2,05	0,41	1 : 10,1 : 1,12	2,8	1,16	87,20
7	DL-DOPA-OMe-HCl	1	5	3,10	0,41	1 : 15,3 : 1,12	5,0	1,21	91,04

Tabelul 5.4. Caracteristicile fizico-chimice ale esterilor de aminoacizi

Nr. crt.	Denumire	p. t. °C	R <sub>f</sub> ester	R <sub>f</sub> aminoacid nereacționat	Eluent
1	DL-Phe-OMe-HCl	152-154	0,66	0,57	nBuOH:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O 60:20:20
2	DL-Phe-OMe-HCl	149-151	0,63	0,56	nBuOH:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O 60:20:20
3	DL-Tyr-OMe-HCl	158-161	0,65	0,55	nBuOH:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O 60:20:20
4	DL-Tyr-OMe-HCl	157-160	0,65	0,55	nBuOH:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O 60:20:20
5	DL-Tyr-OMe-HCl	172-174	0,75	0,57	nBuOH:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O 60:20:20
6	DL-DOPA-OMe-HCl	171-173	0,80	0,71	nBuOH:CH <sub>3</sub> COOH:CH <sub>3</sub> COOCH <sub>3</sub> : H <sub>2</sub> O 1:1:1:1
7	DL-DOPA-OMe-HCl	168-170	0,80	0,71	nBuOH:CH <sub>3</sub> COOH:CH <sub>3</sub> COOCH <sub>3</sub> : H <sub>2</sub> O 1:1:1:1

Esterii de aminoacizi (DL-Phe-OMe-HCl, DL-Tyr-OMe-HCl, DL-DOPA-OMe-HCl) au fost obținuți cu randamente ridicate. În cazul DL-DOPA, randamentul a crescut cu mărirea raportului molar metanol:aminoacid. Producții de reacție au fost caracterizate prin punct de topire, spectru IR și cromatografie în strat subțire. Spectrele IR ale esterilor sunt prezentate în anexă.

### 5.1.3. Caracterizarea produșilor

Esterii de aminoacizi au fost caracterizați pe baza proprietăților lor fizico-chimice, prin comparație cu valorile indicate în literatură după cum urmează:

#### a) Spectroscopia de infraroșu

Spectrele IR au fost folosite pentru identificarea atât a aminoacizilor (Tyr, Phe, DOPA) cât și a esterilor corespunzători. Spectrele au fost înregistrate în pastilă de KBr.

În tabelul 5.5 sunt prezentate benzile caracteristice ale aminoacizilor și esterilor lor metilici [5.9]. S-a urmărit apariția benzilor caracteristice grupării esterice, și anume vibrația de valență a carbonilului de la  $1735-1750\text{ cm}^{-1}$  și vibrația de valență a legăturii C-O din esteri de la  $1100-1300\text{ cm}^{-1}$ .

Tabel 5.5. Benzi caracteristice ale aminoacizilor și esterilor lor

Grupare	Vibrație	Poziție, $\text{cm}^{-1}$	Observații
$\text{NH}_3^+$	$\nu_{\text{as}}$	3030-3130	În clorhidrați Banda I-aminoacizi în clorhidrați Banda II-aminoacizi în clorhidrați
	$\nu_{\text{s}}$	2000-3000	
		3050-3150	
	$\delta_{\text{as}}$	1610-1660	
		1590-1610	
	$\delta_{\text{s}}$	1485-1550 1470-1550	
$\text{COO}^-$	$\nu_{\text{as}}$	1560-1600 i,l 1410 asc.	
$\text{NH}_2$	$\nu$	3300-3500	
COOH	$\nu_{\text{C=O}}$	1725-1755	
	$\nu_{\text{C-O}}$	1215-1230 i	
OH aromatic		3100-3500 i	
Inel aromatic		1615	Phe, Tyr
-CH <sub>2</sub> -		1330	
COOR	$\nu_{\text{C=O}}$	1735-1750 fi	1170 în esteri metilici
	$\nu_{\text{C-O as, s}}$	1050-1300 fi	