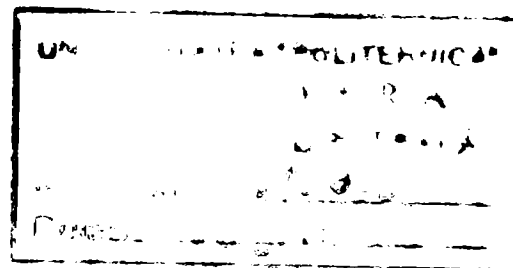


Ing. Kaycsa Adriana Doina

**OBȚINEREA, PURIFICAREA ȘI IMOBILIZAREA
UNOR ENZIME CU APLICAȚII FARMACEUTICE,
CLINICE SAU ALIMENTARE**

BIBLIOTECA CENTRALA
UNIVERSITATEA "POLITEHNICA"
TIMISOARA

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



**TIMIȘOARA
2002**

CUPRINS

	Pag.
Introducere	1
Partea I. Studiu documentar despre aminoacilaze și reacții catalizate de aminoacilaze	5
1. Obținerea, purificarea și caracterizarea aminoacilazelor	5
1.1. Clasificarea L-aminoacilazelor	5
1.1.1. Acilaza I	5
1.1.2. Aspartoacilaza sau acilaza II	6
1.1.3. Acillizin deacilaza	6
1.1.4. Acilaza III.	7
1.1.5. Aminoacilazele hepatice	7
1.1.6. Aminoacilazele de natură microbiană	8
1.2. Rolul biochimic al aminoacilazelor	9
1.2.1. Rolul în metabolismul proteic	9
1.2.2. Rolul în modularea semnalelor intercelulare la procariote	10
1.2.3. Rolul în detoxifierea organismelor animale	10
1.2.4. Bioactivarea xenobioticelor de către aminoacilaze	11
1.2.5. D-aminoacilaza	13
1.3. Izolarea, purificarea și caracterizarea aminoacilazei I	14
1.3.1. Izolarea și purificarea aminoacilazei I animale	15
1.3.2. Izolarea și purificarea aminoacilazei I microbiene	19
1.3.2.1. Obținerea aminoacilazei I prin culturi de suprafață	20
1.3.2.2. Obținerea aminoacilazei I prin culturi submerse	20
1.4. Structura aminoacilazei I și a centrului activ	24
1.4.1. Structura aminoacilazelor I animale	24
1.4.2. Structura aminoacilazelor I microbiene	28
1.5. Specificitatea de reacție și de substrat a aminoacilazei I	30
1.5.1. Specificitatea de reacție	30
1.5.2. Specificitatea de substrat pentru reacția de hidroliză a N-acetil-aminoacizilor	33
1.6. Influența factorilor asupra activității aminoacilazei I, cinetica și mecanismul de reacție.	37
1.6.1. Influența pH-ului asupra activității aminoacilazei I	37
1.6.2. Efectele anionilor asupra activității aminoacilazei I	38
1.6.3. Efectul temperaturii asupra activității aminoacilazei I	38
1.6.4. Influența ionilor metalici asupra activității aminoacilazei I	39
1.6.5. Inhibiția aminoacilazei I	42
1.6.6. Cinetica și mecanismul reacției de hidroliză/sinteză a N-acetil-aminoacizilor în cataliza aminoacilazei I	44
2. Imobilizarea aminoacilazei I	46
2.1. Metode generale de imobilizare a enzimelor și celulelor	46
2.1.1. Clasificarea metodelor de imobilizare	47
2.1.2. Suporturi pentru imobilizarea enzimelor	47
2.1.3. Metode de imobilizare a enzimelor	49
2.1.3.1. Fixare prin adsorbție	50

2.1.3.2.	Fixare prin legare ionică	50
2.1.3.3.	Fixare prin incluziune - entraparea enzimei în gel sau microcapsule	51
2.1.3.4.	Fixare chimică prin legături covalente	52
2.1.4.	Metode de imobilizare a celulelor	52
2.2.	Metode de imobilizare a aminoacilazei I	53
2.3.	Caracterizarea aminoacilazei I imobilizată	55
2.3.1.	Influența pH-ului	55
2.3.2.	Dependența de temperatură	56
2.3.3.	Energia de activare a aminoacilazei imobilizate	58
2.3.4.	Constante cinetice	59
2.3.5.	Stabilitatea față de reactivi	60
2.3.6.	Influența ionilor asupra activității aminoacilazei I	61
2.4.	Alte studii privind imobilizarea aminoacilazei I	62
3.	Tehnologia obținerii aminoacizilor	66
3.1.	Metode generale de obținere a aminoacizilor	67
3.1.1.	Hidroliza totală a proteinelor	67
3.1.2.	Sinteza chimică	67
3.1.3.	Fermentația	68
3.1.4.	Cataliza enzimatică	68
3.1.5.	Obținerea L-aminoacizilor cu aminoacilază I solubilă	70
3.1.6.	Obținerea L-aminoacizilor cu aminoacilază I fixată pe suport	73
3.1.7.	Utilizări ale aminoacizilor	77
Partea II.	Contribuții originale. Separarea unor L-aminoacizi din racemic prin biocataliză cu aminoacilază	79
4.	Identificarea și izolarea aminoacilazei	79
4.1.	Metode de analiză	79
4.1.1.	Determinarea activității aminoacilazei solubile	79
4.1.2.	Determinarea aminoacizilor cu ninhidrină	82
4.1.3.	Determinarea conținutului în proteine - metoda Lowry	82
4.1.4.	Determinarea concentrației de sulfat de amoniu - Metoda Nessler	83
4.2.	Obținerea aminoacilazei I din țesuturi animale	83
4.3.	Obținerea aminoacilazei din culturi de fungi. Stabilirea condițiilor optime de cultură	85
4.3.1.	Identificarea unor tulpini producătoare de aminoacilază	85
4.3.2.	Stabilirea condițiilor optime de cultură pe mediu solid	86
4.3.3.	Obținerea aminoacilazei din culturi de <i>A. oryzae</i> pe mediu solid	89
4.3.4.	Obținerea aminoacilazei din culturi de <i>A. oryzae</i> pe medii submerse	91
4.3.4.1.	Culturi submerse statice	91
4.3.4.2.	Culturi submerse agitate	93
4.2.4.3.	Cultură submersă în fermentator	95
4.4.	Concluzii	96
5.	Purificarea aminoacilazei microbiene	97
5.1.	Separarea prin precipitare fracționată cu săruri	97
5.2.	Separarea prin precipitare fracționată cu solvenți organici	100
5.3.	Desalefierea fracțiilor precipitate cu sulfat de amoniu prin dializă	101
5.4.	Purificarea aminoacilazei prin cromatografia de gel-filtrare	102
5.4.1.	Desalefierea prin gel-filtrare a fracțiilor precipitate cu sulfat de amoniu	102

5.4.2.	Influența debitului de eluție asupra desalefierii soluției acilazice pe Sephadex G 25 fine	106
5.4.3.	Desalefierea prin gel-filtrare la scară pilot	107
5.4.4.	Purificarea aminoacilazei prin gel-filtrare pe Sephadex G-100 și Filtradex R-100	108
5.5.	Obținerea unor preparate aminoacilazice solide	110
5.6.	Concluzii	111
6.	Imobilizarea aminoacilazei	113
6.1.	Determinarea activității aminoacilazei imobilizate	113
6.2.	Imobilizarea aminoacilazei prin legare covalentă	114
6.3.	Imobilizarea aminoacilazei prin legare ionică	117
6.3.1.	Imobilizarea aminoacilazei prin legare ionică pe suporturi tip Ponilex AS	117
6.3.2.	Imobilizarea aminoacilazei prin legare ionică pe suporturi tip Sephadex și Filtradex	120
6.3.2.1.	Influența caracteristicilor tamponului asupra imobilizării aminoacilazei	121
6.3.2.2.	Influența încărcării suportului asupra imobilizării aminoacilazei	123
6.3.3.	Imobilizarea aminoacilazei pe DEAE-Filtradex R50 la scară semipilot	124
6.4.	Concluzii	125
7.	Influența parametrilor de reacție asupra activității aminoacilazei solubile și imobilizate	127
7.1.	Influența concentrației inițiale a substratului asupra vitezei de reacție și determinarea parametrilor cinetici K_m și V_{max}	127
7.2.	Influența concentrației de enzimă asupra vitezei inițiale de reacție	135
7.3.	Influența pH-ului asupra activității aminoacilazei	136
7.4.	Influența temperaturii asupra activității aminoacilazei	139
7.5.	Influența ionilor metalici asupra activității aminoacilazei	140
7.6.	Influența concentrației ionului Co^{2+} asupra activității aminoacilazei	142
7.7.	Concluzii	143
8.	Obținerea D-fenilglicinei și L-metioninei	144
8.1.	Obținerea D-fenilglicinei prin hidroliza enzimatică a N-acetil-D,L-fenilglicinei	144
8.1.1.	Generalități privind obținerea D-fenilglicinei	144
8.1.2.	Acetilarea D,L-fenilglicinei	150
8.1.3.	Hidroliza racemicului de N-acetil-D,L-fenilglicină cu aminoacilază imobilizată	155
8.1.4.	Regenerarea enzimei imobilizate	160
8.1.5.	Obținerea D-fenilglicinei	161
8.1.5.1.	Separarea L-fenilglicinei din hidrolizatului enzimatic	161
8.1.5.2.	Separarea N-acetil-D-fenilglicinei din hidrolizatului enzimatic	162
8.1.5.3.	Hidroliza N-acetil-D-fenilglicinei	163
8.1.6.	Racemizarea L-fenilglicinei	164
8.1.7.	Concluzii	165
8.2.	Obținerea L-metioninei prin hidroliza enzimatică a N-acetil-D,L-metioninei	166
8.2.1.	Date introductive	166
8.2.2.	Acetilarea D,L-metioninei	168
8.2.3.	Hidroliza N-acetil-D,L-metioninei cu aminoacilază imobilizată	170
8.2.3.1.	Hidroliza N-acetil-D,L-metioninei cu aminoacilază imobilizată pe DEAE-Sephadex A-50	170

8.2.3.2.	Regenerarea pe coloană a enzimei imobilizate	173
8.2.4.	Hidroliza N-acetil-D,L-metioninei cu aminoacilază imobilizată pe DEAE-Filtradex R-50	174
8.2.5.	Hidroliza N-acetil-D,L-metioninei cu aminoacilază imobilizată pe Ponilex AS-57	175
8.2.6.	Separarea și purificarea L-metioninei din hidrolizatul enzimatic	176
8.2.7.	Racemizarea N-acetil-D-metioninei și separarea racemicului	177
8.2.8.	Concluzii	178
	Concluzii generale	179
	Bibliografie	184

Introducere

Enzimele sunt catalizatori de natură organică. Fiecare reacție care are loc în celulele vii este catalizată de enzima ei particulară. Este dificil să se facă o estimare precisă a numărului de enzime diferite din fiecare celulă, dar se pare că o celulă bacteriană cum ar fi *Escherichia coli* produce aproximativ 3000 proteine diferite, iar o celulă eucariotă aproximativ 50000, din care majoritatea sunt enzime. În absența enzimelor, multe din aceste reacții nu ar avea loc chiar după ani de zile, iar viața, așa cum o cunoaștem noi, nu ar fi posibilă.

Activitatea catalitică a enzimelor produse de către microorganisme a fost utilizată de om de câteva mii de ani în procese ca fermentația alcoolică și obținerea brânzeturilor, dar explicația acestor procese complexe nu a putut fi dată decât în secolul XX [1].

Prima descoperire a unei enzime se datorează lui Payer și Persoz care în anii 1833 separă dintr-un extract apos de malț o substanță, astăzi numită amilază, capabilă să scindeze amidonul la zaharuri mai simple. Următoarea enzimă separată a fost pepsina de către Schwann în 1834.

La început enzimele au fost numite fermenți, de la latinescul *ferveo* - a fierbe. Între anii 1860 - 1895 are loc celebra dispută între Pasteur și Leibig referitoare la fermenții organizați (microorganisme de tipul drojdiilor) și fermenții neorganizați (substanțe chimice de tipul amilazei și pepsinei). Noțiunea de ferment organizat a fost abandonată după ce frații Buchner extrag din celulele drojdiei de bere un suc capabil să reproducă, în condiții de laborator, întregul proces fermentativ.

Cuvântul enzimă, derivat de la grecescul *zyme* (în drojdie) este prima dată utilizat de Kühne în 1878 pentru fermenții din interiorul celulelor, deci cei neorganizați.

În 1894 Emil Fischer studiază enzime ce intervin în metabolismul carbohidraților și demonstrează "specificitatea unei enzime pentru substratul său". Pe baza acestor experimente Fischer propune "lacătul și cheia", ipoteză care să descrie această specificitate.

În această perioadă (anii 1890) natura chimică a enzimelor nu este clară. De fapt aceasta este stabilită mulți ani mai târziu, după ce o seamă de enzime sunt cristalizate și se arată că ele constau aproape în întregime din proteine. Prima enzimă cristalizată este ureaza (în 1926 de către Sumner). Astăzi este știut că dacă Sumner ar fi dispus de metode de analiză mult mai sensibile ar fi găsit că preparatul său conținea o cantitate mică de nichel (aproximativ 0,1%) care este esențială pentru cataliză.

Construirea ultracentrifugii de către Svedberg (în anii 1920) permite obținerea de câmpuri centrifugale înalte, capabile să sedimenteze macromolecule. Aceste studii arată că proteinele în soluții constau, în general, din molecule omogene, cu masă moleculară definită (10^4 - 10^7 Daltoni) și nu sunt suspensii coloidale. Astfel este posibilă descrierea structurii proteinelor în termeni chimici preciși. Acest lucru este prima dată făcut în 1960 când se deduce secvența ribonucleazei (Hirs, Moore și Stein). În 1965 este dedusă, prin tehnica cristalografică cu raze X, structura tridimensională a lizozimului.

În anii 1950 - 1960 se fac o serie de observații care sugerează că activitatea catalitică a unor enzime este reglată ca răspuns la schimbările condițiilor fiziologice. Aceasta permite lui Monod și colaboratorilor, în 1965, să propună modelul "alosteric" pentru a explica în mod cantitativ cum poate fi reglată activitatea unor anumite enzime prin legarea unor molecule mici (efectori), permițând astfel explicarea controlului enzimelor în celulă.

În sfârșit, un punct cheie în enzimologie îl constituie prima sinteză chimică a unei enzime, ribonucleaza, din aminoacizii componenți, realizată de Gutte și Merrifield în 1969 [1-4].

Cea mai importantă proprietate a enzimelor din punctul de vedere al capacității lor biocatalitice este specificitatea [5,6], care poate fi de două tipuri principale:

1. Specificitate de reacție; în funcție de aceasta enzimele au fost clasificate în 6 mari grupe:

- oxidoreductaze
- transferaze
- hidrolaze
- liaze
- izomeraze
- ligaze

2. Specificitate de substrat, care la rândul ei poate fi:

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

Trebuie menționat că majoritatea reacțiilor catalizate de enzime în organismele vii sunt enantiospecifice. Enantiospecificitatea poate să se manifeste concomitent cu oricare dintre celelalte trei tipuri de specificitate de substrat. Pe de altă parte, reacțiile secundare sunt practic neglijabile. Reacțiile chimice obișnuite, pentru a putea fi realizate în mod eficient, necesită adeseori temperaturi și/sau presiuni înalte, în timp ce cu ajutorul enzimelor aceleași procese pot fi îndeplinite în condiții blânde. În afară de aceasta, utilizarea enzimelor este recomandată și din considerente toxicologice și de protecție a mediului, comparativ cu procesele chimice uzuale.

Dintre cele peste 2500 de enzime cunoscute și clasificate la această oră, doar un număr relativ mic au fost investigate în vederea utilizării cu rol catalitic în sinteze chimice organice. Mai mult de jumătate din aceste utilizări sunt datorate unor enzime din clasa hidrolazelor, urmate de oxidoreductaze. Frecvența utilizării diferitelor clase de enzime este prezentată în Figura 1 [7].

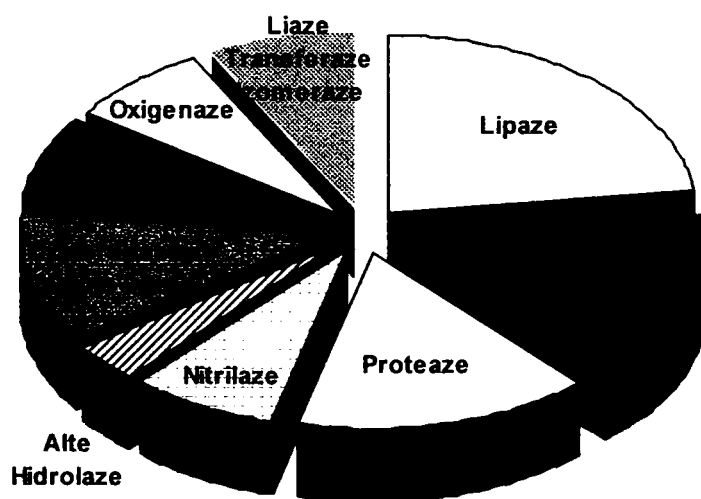


Figura 1. Frecvența de utilizare a anumitor biocatalizatori în biotransformări

O serie din aceste enzime s-au dovedit a fi, datorită specificității de substrat reduse pe care o manifestă, catalizatori eficienți pentru transformarea unui număr mare de compuși.

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

- menținerea activității pentru o serie de enzime în sisteme bifazice apă-solvent organic și chiar în medii organice practic anhidre, conținând doar urme de apă;
- manifestarea stereoselectivității enzimelor și asupra unor substraturi total diferite de cele ale căror transformări le catalizează în mod uzual.

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

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

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

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

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

Biotehnologia poate fi definită ca procesul de aplicare a organismelor biologice, sistemelor biologice sau a proceselor biologice în industria manufacturieră sau de serviciu.

Organismele biologice pot fi de diferite tipuri:

- unicelulare simple ca cele mai multe celule bacteriene sau drojdii
- filamente multicelulare simple: Streptomycetaceae și Aspergillaceae
- unicelulare complexe: celule eucariote, linii celulare de plante și insecte
- organisme întregi ca în plante 'transgenice' și animale transgenice

Sistemele biologice pot include:

- biofermenți
- biofilme
- biosenzori

Procesele biologice sunt foarte variate, incluzând:

- enzime immobilizate (pentru bioconversii), anticorpi sau receptori (pentru diagnostic)
- organisme immobilizate (pentru bioconversie)
- tratamentul apelor reziduale
- producția de biomasă
- procese fermentative tradiționale (alcool, produse lactate)
- biodegradare, de exemplu detoxifierea mediului înconjurător și reciclarea resurselor naturale
- generare de biocarburanți
- bioinoculanți (Rhizobium și plante leguminoase)
- exploatarea microorganismelor pentru obținerea sulfurilor de metale grele sau țigăi brut

Biotehnologia este de obicei multidisciplinară și implică cooperarea unor diverse domenii de expertiză. Procesul poate fi divizat în trei stadii elementare:

1. Cercetare și dezvoltare la scară de laborator (construirea tulpinii producătoare, selectarea și cultivarea la scară mică); necesită microbiologi, geneticieni moleculari, biologi celulari.

2. Scară semipilot și pilot, cu utilizare de fermentatoare mai mari (culturi de 10 - 100 litri); necesită specialiști în fermentație și ingineri chimiști.

3. Proces industrial care implică și recuperarea și purificarea produsului final; necesită biochimiști, enzimologiști, chimiști organicieni.

Gama de produse oferită de biotehnologie este extrem de diversă și crește rapid. Poate fi, subiectiv, subdivizată în trei grupe mari:

1. Produse cu masă moleculară mică: această grupă include așa numiții metaboliți primari (utilizați ca aditivi alimentari și aromatizanți) și metaboliți secundari (cum sunt antibioticele, coloranții organici, solvenții organici, etc.).

2. Produse cu masă moleculară intermediară: sunt incluși hormonii peptidici ca insulina sau hormonii de creștere.

3. Produse cu masă moleculară mare: sunt incluși așa numiții biopolimeri ca polizaharidele și proteinele; acest al doilea grup este subdivizat în enzime și proteine cu înaltă valoare terapeutică și vaccinurile de tip proteic.

Cele mai multe dintre procesele biotehnologice au loc în vase mari numite (bio)fermentatoare [8].

Biotehnologiile au devenit tehnologii puternice și variate, ce utilizează și produc componente „curați”, nepoluanti. Sunt competitive cu alte tehnologii din punct de vedere al costurilor și riscurilor, nu sunt limitate ca scară de operare și au un impact major în industria ecologică [9].

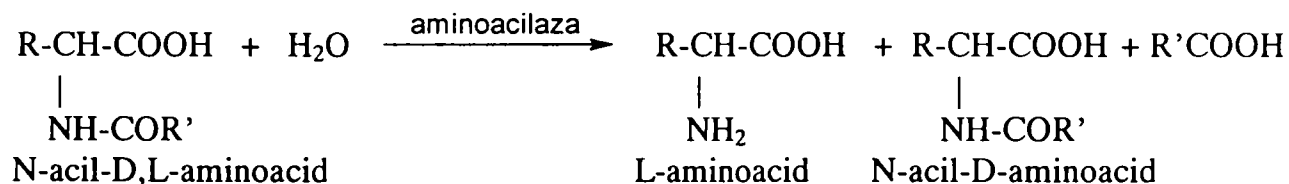
Nu este nici un dubiu la ora actuală faptul că enzimele sunt practic catalizatori industriali. Sunt aplicate în toate sectoarele manufacturiere și în 1998 piața estimată a enzimelor a fost 0,6 N 1,6 milioane \$; 5% din totalul publicațiilor în 1996 se refereau la conversii în cataliză enzimatică.

Aminoacilaza I, conform clasificării adoptate pe baza recomandărilor Comisiei de Enzimologie a Uniunii Internaționale de Biochimie, face parte din clasa hidrolazelor, subclasa hidrolazelor C-N (ne-peptidice) și sub-subclasa amide liniare și are denumirea sistemică N-acilamino acid amidohidrolaza și codul E.C. 3.5.1.14. Rolul ei biologic, chiar dacă nu pe deplin lămurit, este în catabolizarea proteinelor și anume de a hidroliza gruparea N-acil a aminoacizilor. În general aceștia, în structura proteică, sunt aminoacizi N-terminali care sunt hidrolizați specific de o aminopeptidază. Dar s-a demonstrat, in vitro, că aminoacilaza I poate cataliza și alte reacții, cum ar fi N-acilarea aminoacizilor (reacția inversă celei știute), hidroliza unor dipeptide, hidroliza unor esteri ai aminoacizilor, chiar și esterificări și transesterificări. Reacția de hidroliză a N-acilaminoacizilor este aplicată industrial de la sfârșitul anilor 1960, dar noile cercetări au perspective largi de aplicare industrială pentru obținerea unor compuși optic activi, în special cu aplicare farmaceutică. Aminoacilaza este situată printre primele 10 enzime utilizate în biotehnologie [10].

Cercetările care fac obiectul prezentei teze, axate pe izolarea, purificarea, caracterizarea și imobilizarea aminoacilazei I, urmate de utilizarea produsului imobilizat pentru separarea racemicurilor de aminoacizi, au constituit parte din tematica de cercetare a Colectivului de Cataliză de la Institutul de Energetică Chimică și Biochimică, devenit în 1991 Laboratorul de Sinteze Organice Fine și Biotehnologii din cadrul Institutului de Științe Chimice și Tehnologice Timișoara, iar din anul 1996 Colectivul de Biocataliză de la Institutul de Electrochimie Timișoara. Acest colectiv a fost înființat de Prof. Dr. Radu Bacaloglu și a constituit, de fapt începutul cercetării biocatalizei în România. Deși nu a dispus de metode moderne de investigare analitică și structurală, esențiale în acest domeniu, a obținut, totuși rezultate remarcabile, realizând prima tehnologie omologată pe bază de enzime din țara noastră și anume obținerea de L-aminoacizi optic puri din racemic, utilizând aminoacilaza I imobilizată pe suporturi românești.

Partea I. Studiu documentar despre aminoacilaze și reacții catalizate de aminoacilaze

Una dintre primele enzime utilizate la scară industrială (firma japoneză Tanabe în 1969) este aminoacilaza din *Aspergillus oryzae*. Această enzimă catalizează reacția de hidroliză stereoselectivă a N-acil-aminoacizilor conform schemei:



Se obține L-aminoacidul și N-acil-D-aminoacidul corespunzător.

Prođușii de reacție au proprietăți fizice diferite astfel încât se pot folosi metode clasice de separare ca schimbul ionic și cristalizarea. Eficiența procesului este net determinată de faptul că D-acil-aminoacidul se poate racemiza și reintroduce în proces.

Aminoacilaza I (E.C. 3.5.1.14) este cunoscută de mai bine de 100 ani; de fapt aminoacilaza renală este una dintre primele enzime intracelulare descrisă (de către Schmiedeberg în 1881). În anii 1940-1950 Greenstein și colaboratorii au cercetat specificitatea de substrat pentru un preparat enzimatic parțial purificat din rinichi de porc îngrășat și au demonstrat utilitatea ei în rezoluția racemicurilor de aminoacizi. Aminoacilaza I aproape pură (omogenă) a devenit disponibilă în anii 1960-1970.

1. Obținerea, purificarea și caracterizarea aminoacilazelor

1.1. Clasificarea L-aminoacilazelor

După cum s-a arătat anterior, aminoacilaza catalizează reacția de hidroliză a N- α -acilaminoacizilor la aminoacizi și acid. Au fost identificate o serie de aminoacilaze renale care diferă prin specificitatea de substrat. Acestea au fost clasificate de către Anders [11] după cum urmează:

- Acilaza I (E.C. 3.5.1.14, N-acilamino acid amidohidrolaza);
- Aspartoacilaza sau acilaza II (E.C. 3.5.1.15, N-acil-L-aspartat amidohidrolaza);
- Acilizin deacilaza (E.C. 3.5.1.17, N^e-acil-L-lizin amidohidrolaza);
- acilaza III, care catalizează preferențial N-deacetilarea N-acilaminoacizilor aromatici.

1.1.1. Acilaza I

Această enzimă, numită, de fapt aminoacilază, catalizează hidroliza unui număr mare de aminoacizi N-acilați. Deoarece această enzimă reprezintă domeniul actualului studiu, ea va fi prezentată pe larg ulterior.

1.1.2. Aspartoacilaza sau acilaza II

Studii inițiale asupra selectivității aminoacilazelor au arătat că anumite fracții ale extractelor de rinichi de porc hidrolizează mulți N-acilaminoacizi, dar nu și N-acetil- sau N-cloroacetil-D,L-aspartatul [12]. Studiile ulterioare au indicat faptul că aspartații N-acilați sunt hidrolizați de către o altă enzimă și nu acilaza I. S-a izolat o fracție proteică ce hidrolizează N-acetil- și N-cloroacetil-D,L-aspartatul, pe când N-cloroacetil-D,L-glutamatul, N-cloroacetil-D,L-alanina, N-cloroacetil-D,L-leucina, N-cloroacetil-D,L-serina și N-acetil-D,L-metionina au fost hidrolizate cu viteze foarte mici; această enzimă a fost numită acilază II.

Aparent, nu s-au găsit xenobiotice, derivate de la aminoacizi, care să servească drept substrat pentru aspartoacilază. Această enzimă a fost purificată din creier bovin. Este o proteină monomerică, cu masă moleculară 58 kDa și a cărei activitate este crescută în prezența cationilor divalenți, detergenților neionici și ditiotreitului.

Funcția aspartoacilazei nu este bine cunoscută dar, probabil, are un rol în biologia creierului. N-acetil-L-aspartatul (NAA) este prezent predominant în neuroni și în sistemul nervos central al vertebratelor homeotermice în concentrații mari (9-11 mM). Această substanță se găsește în interiorul celulelor și foarte puțin în lichidul extracelular; 40% se găsește în fracția mitocondrială a terminațiilor nervoase și restul de 60% în citosol. Substanța este sintetizată în mitocondrie din aspartat și acetil-CoA și este metabolizată de aspartoacilază la aspartat și acetat în citosol. NAA este compusul predominant detectat prin spectroscopie RMN ($^1\text{H-MRS}$) în creier. De aceea este util ca marker în afecțiunile neuronale sau neurodegenerative ca scleroza amiotrofică laterală, scleroza multiplă, boala Alzheimer, epilepsie, de vreme ce este prezent mai ales în neuroni [13,14].

Bhakoo [15] a găsit că activitatea aspartoacilazică este corelată cu maturarea materiei albe la creierul de șobolan. Activitatea a crescut remarcabil după 7 zile și coincide cu perioada de mielinizare a nervilor. În creierul adult de șoarece este o diferență de 18 ori între activitatea aspartoacilazică în corpus callosum comparată cu cortexul. Neuronii corticali nu prezintă activitate. Aspartoacilaza crește în activitate în timp la astrocitele proaspăt izolate, cu o creștere semnificativă după 15 zile de cultură. Concluzia este că activitatea aspartoacilazică în creierul postnatal corespunde maturării mielinizării.

Chakraborty afirmă că aspartoacilaza are rolul de a furniza grupări acetil pentru sinteza unor lipide mielinice, identificând aceste lipide în neuronii maturi ai nervului optic [16].

Interesant este faptul că o deficiență în activitatea aspartoacilazei și N-acetil-L-aspartaciduria sunt markeri ai bolii Canavan, boală autozomală recesivă, caracterizată prin degenerarea spongioasă a creierului.

1.1.3. Acilizin deacilaza

Observația că N^{ϵ} -acetil-L-lizina, dar nu și N^{α} -acetil-L-lizina, a avut aproape același efect ca și L-lizina în producerea creșterii în greutate a șobolanilor, a dus la propunerea că, probabil, N^{ϵ} -acetil-L-lizina este enzimatic hidrolizată și eliberează L-lizină. Studiile ulterioare au arătat că o enzimă prezentă în rinichiul și ficatul șobolanilor hidrolizează într-adevăr N^{ϵ} -acetil-L-lizina și formează L-lizina ca produs. Enzima a mai fost identificată în splină, intestin și miocard, cu activitate de la 3 la 7 ori mai redusă decât în rinichi [17]. Enzima din rinichi a fost purificată de 100000 ori printr-o procedură ce a cuprins omogenizare, adsorbție pe gel de fosfat tricalcic și precipitare cu sulfat de amoniu, dializare și liofilizare; apoi a fost caracterizată (pH optim, temperatură optimă, stabilitate la temperatură, specificitate de substrat).

N^{ϵ} -trifluoroacetil-L-lizina, legată în proteine, a fost identificată în ficatul de șobolan, fiind un metabolit, legat covalent, al halotanului și al 2,2-diclor-1,1,1-trifluoretanului (HCFC-123). Studii recente au arătat că N^{ϵ} -trifluoroacetil-L-lizina este hidrolizată, producând L-lizină

[11]. Deci acilizin deacilaza poate cataliza hidroliza lizinei modificată de anumite xenobiotice.

1.1.4. Acilaza III.

O comparare a vitezelor de hidroliză a unui număr de N-acilaminoacizi în cataliza unei acilaze I purificate și a unor omogenate de rinichi a indicat prezența unei aminoacilaze care catalizează hidroliza N-acilaminoacizilor aromatici. Această enzimă a fost numită acilază III.

Endo [18] a purificat parțial aminoacilaza din rinichi de șobolan, și anume enzima care hidrolizează preferențial N-acilaminoacizii aromatici, inclusiv N-acetil-L-triptofanul, N-acetil-L-tirozina, N-acetil-L-fenilalanina. Enzima are masa moleculară aproximativ 55 000 Da, este slab inhibată de acidul p-mercuribenzoic și are un pH optim \cong 8. Cu substrat N-acetil-L-triptofan activitatea enzimei hepatice a fost o zecime din cea renală. În plus, la hrănirea șoarecilor cu N-acetil-L-triptofan s-a observat că în rinichi se acumulează L-triptofan, ceea ce indică o semnificativă deacetilare [19]. De asemenea studiile au arătat că, la șoarece, atât activitatea acilazică I cât și III sunt mici la naștere și ating un platou la vârsta de aproximativ 5 săptămâni.

George [20] co-purifică din rinichi de maimuță N- α -acetilencefalic carboxipeptidaza cu N-acetiltirozin deacetilaza. Studiile făcute confirmă ideea că această acilază III poate acționa ca o carboxipeptidază asupra peptidelor ce prezintă aminoacizi hidrofobi la capătul C-terminal.

1.1.5. Aminoacilazele hepatice

Au fost caracterizate și enzimele hepatice ce catalizează deacetilarea mercapturaților, identificându-se o nouă aminoacilază [21]. Aminoacilaza hepatică din șobolan are o masă moleculară de aproximativ 35 000 Da, valoare găsită prin SDS-electroforeză și de aproximativ 145 000 prin cromatografia de gel filtrare, ceea ce indică faptul că enzima este un homotetramer. Specificitatea de substrat a acestei enzime a fost similară cu cea a acilazei III, substraturile preferate fiind N-acetil-S-aril- și N-acetil-S-aralchil-aminoacizii. N-acetil-L-aspartatul și N^ε-acetil-L-lizina nu au fost substraturi pentru această enzimă. Mercurul (II), N-etilmaleilimida și acidul p-cloromercuibenzoic au inhibat aminoacilaza hepatică.

O enzimă cu activitate acilazică specifică pentru N-acetilhistamina a fost purificată de 160 de ori din ficat de șoarece [22]. Procedura de purificare a inclus cromatografie pe DEAE-celuloză, precipitare cu sulfat de amoniu și din nou cromatografiere pe DEAE-celuloză. Greutatea moleculară, estimată prin gel-filtrare a fost de 70 kDa. Enzima a conținut o grupare SH labilă, esențială pentru activitate. Ionii Mn²⁺ și Co²⁺ au mărit activitatea enzimatică. Dintre derivații acetil testați, doar N-acetilhistamina și, mai puțin, N-acetiltiramina au servit ca substraturi. Valoarea K_m a fost de 0,3 mM la pH-ul optim de 8,0. Diperhisramina, un agent antihistaminic, a inhibat remarcabil deacetilarea.

Aceste studii arată că o serie de aminoacilaze, cu specificități de substrat diferite, catalizează deacetilarea N-acil- α -aminoacizilor. Activitățile sunt de obicei mai mari în rinichi decât în alte țesuturi. Deși acilaza I a fost studiată și caracterizată în amănunțime, relația dintre acilaza I renală și acilazele III, hepatică și renală, nu a fost clarificată. Ambele enzime au selectivități de substrat similare dar nu egale. Enzimele responsabile pentru deacetilarea mercapturaților derivați din xenobiotice nu au fost în întregime identificate. Acilaza III renală catalizează deacetilarea unei serii de mercapturați [21], lucru observat și mai devreme. Se pare că nu a fost încă investigat rolul acilazei I în deacetilarea mercapturaților.

Glicin-N-acilaza catalizează reacția inversă, de conjugare a diferiților acil-CoA cu glicina și este implicată în diferite procese de detoxifiere.

Studiile de aliniere secvențială au demonstrat faptul că acilazele fac parte dintr-o superfamilie de Zn-peptidaze. Aspartoacilaza și succinilglutamat desuccinilaza sunt membre

ale familiei ZnCP (Zn-carboxipeptidaze). Locul de legare al zincului ca și miezul structural al proteinei este conservat la ZnCP și este similar cu cel al altei familii mari de hidrolaze care include mai ales aminopeptidaze (ZnAP) ca și aminoacilaza I. Ambele familii includ nu numai proteaze dar și enzime care catalizează N-deacetilarea și N-desuccinilarea aminoacizilor [23]. Conservarea secvențială sugerează că aceste enzime sunt omoloage și prezintă un mecanism catalitic comun.

1.1.6. Aminoacilazele de natură microbială

Au prezentat și ele specificități de substrat diferite și ca atare au fost clasificate în acord cu această specificitate.

De exemplu, Shintani [24] separă dintr-un extract de *Pseudomonas diminuta* două aminoacilaze, I și II. Acestea diferă atât din punct de vedere al specificității de substrat (II prezentând un domeniu mai îngust, hidrolizând lipoacil-N-aminoacizii cu acizi grași de diferite lungimi de catenă, în timp ce I are specificitate aproape absolută pentru N-acilglutamații cu catene cuprinse între 12 și 16 atomi de carbon), cât și al structurii (I este formată din opt lanțuri omoloage și are o masă moleculară de 320 kDa, iar II este un tetradimer cu masa moleculară 220 kDa), al domeniului de pH, de temperatură, al inhibitorilor.

Fruh [25] izolează o acilază periplasmatică din celule de *Pseudomonas aeruginosa*. Această enzimă prezintă activitate maximă față de N-acetil-L-glutamat, având doar 20% acțiune față de N-acetil-L-glutamină, N-acetil-L-metionină și N-acetilglicină. Față de restul acetilaminoacizilor naturali prezintă activitate sub 10%.

O N-acil-L-prolin acilază este separată din *Comamonas testosteroni*, purificată și caracterizată de către Groeger [26]. Aceasta prezintă specificitate înaltă pentru N-acil-L-prolină dar hidrolizează și acizi N-acil-L-tiazolidin-4-carboxilici, formați din formaldehidă și derivați de cisteină.

Hummel [27] separă și purifică o acilază ce deacetează acidul acetamidocinamic din tulpini de *Brevibacterium sp.*, colectate din sol. Se eliberează acid fenilpiruvic ce poate fi folosit ulterior la sinteza de fenilalanină.

În metabolismul argininei apare ca intermediar N-acetilornitina. La procariote gruparea acetil este îndepărtată de către o enzimă hidrolitică, N-acetilornitin deacetilaza pentru a forma ornitina, un intermediar obligatoriu în sinteza argininei și a poliaminelor. Aceasta este o metaloenzimă ce este activată de ioni de cobalt și de fosfatul anorganic. N-acetilornitin deacetilaza este omoloagă, din punct de vedere structural și biochimic cu alte trei enzime cunoscute ca având activitate aminoacilazică: succinil diaminopimelat desuccinilaza din *E.coli*, carboxipeptidaza G2 din *Pseudomonas* și aminoacilaza I porcină. Secvența lor aminoacidică prezintă un grad mare de similaritate, susținând ipoteza că aceste enzime au o origine comună [28].

În sinteza cisteinei la *Pseudomonas sp.*, tulpina BS, ultima etapă este hidroliza N-carbamil-S-cisteinei în prezența unei N-carbamil-L-cistein amidohidrolaze [29].

Bacteriile produc o clasă aparte de acilaze care hidrolizează legătura amidică din antibioticele β -lactamice, eliberând acidul 6-aminopenicilanic (penicilin G acilaza, penicilin V acilaza, cefalosporin acilaza, etc). Sunt, de altfel, utilizate pentru sinteza industrială a penicilinelor semisintetice [30]. O acilază specifică, denumită A933 a fost izolată din *Streptomyces fulvoviridis*, *cattleya*, *cremeus*, *argenteolus*. Această enzimă catalizează depantotenilarea unor carbapeneme (OA-6129), deacetilarea N-acetil-L-aminoacizilor și acetilarea acidului 6-aminopenicilanic cu acil-CoA. De asemenea prezintă activitate peptidazică asupra unor di- și tripeptide. Enzima a fost izolată, purificată și caracterizată [31,32,33,34].

Există și N-acil-L-aminoacilamidaze care eliberează N-acil-L-aminoacidul din amida sa, cum este enzima separată dintr-o cultură de *Pseudomonas putida* [35].

1.2. Rolul biochimic al aminoacilazelor

1.2.1. Rolul în metabolismul proteic

Blocarea N-terminală a proteinelor este un fenomen larg răspândit la eucariote, procariote și viruși. De fapt 50 N 80% din proteinele intracelulare solubile sunt α -N-acilate, cele mai reprezentative grupări acil fiind formil și acetil. Alte grupări N- α -acilante sunt mureil, piroglutamil, α -cetoglutaril, piruvil, glucuronil, metil, ca și resturi de acizi grași. Printre proteinele N- α -acetilate se numără proteine de structură (actine, tropomiozina, keratine, proteine din membrana celulară virală, cristalina, proteine ribozomale, histone, proteine mielinice), enzime din toate clasele, proteine de transfer (citocrom c, hemoglobine), proteine de legare a calciului sau a altor metale (parvalbumine, troponina C, miozina-lanțul L4, calmodulina, proteina intestinală de legare a calciului, feritina, metalotioneine), hormoni (α -MSH, β -endorfina), etc. [36].

Deși rolul biologic al α -N-acilării nu a fost încă elucidat, probabil că prezența restului N-acilat descrește turnover-ul proteinei, inhibând activitatea aminopeptidazică. De asemenea poate activa sau inhiba o serie de proteine. S-a mai sugerat că α -N-acetilarea este o posibilitate de conservare a grupării acetil în celulă.

Informația privind catabolismul intracelular al proteinelor acetilate este destul de redusă. Există două trepte enzimatică la hidroliza proteinelor acilate. O N-acilpeptid hidrolază eliberează acilaminoacidul N-terminal care este apoi hidrolizat de aminoacilaze la acid (ex. acetat) și aminoacid [37,38,39,40,41]. Raportul dintre acilpeptid hidrolază și aminoacilază este caracteristic pentru un anumit tip de celulă. Astfel, în celule pulmonare, celule ovariene de hamster, celule hepatice, limfocite sunt exprimate cantități aproape egale din cele două enzime, având ca rezultat o procesare optimă a resturilor proteice acetilate N-terminale. Patru linii de celule eritroleucemice s-au găsit că exprimă aproape de două ori mai multă acilază decât acilpeptid hidrolază. În liniile tumorale ascitice Ehrlich, unde 80% din peptide rămân acetilate la capătul N-terminal, acilpeptid hidrolaza este aproape inexistentă, dar exprimarea acilazei nu este redusă [42].

Endo [43], studiind activitatea aminoacilazică în rinichii de șoareci, a observat că aceasta crește remarcabil în perioada de înțarcare, când crește aportul de proteine; sugerează astfel că acilazele I și III sunt implicate în mecanismul de utilizare a acil derivaților aminoacizilor endogeni și exogeni, inclusiv cei proveniți din hidroliza proteinelor.

Studiile făcute de Giardina [44] sugerează că acilaza citoplasmatică din enterocite este de asemenea implicată în ultima treaptă a digestiei proteinelor naturale N-acilate și a celor produse prin procesare tehnologică. La perfuzarea unor șobolani cu soluție Krebs-Henseleit N albumină într-un sistem recirculant, fără hemoglobină, Brömme [45] a observat creșterea activității aminoacilazice hepatice în ser o dată cu creșterea timpului de perfuzare.

Faptul că aminoacilazele sunt implicate în catabolizarea proteinelor este demonstrat, indirect, și de studiile lui Budisa [46]. Pentru analiza cu raze X a structurii proteinelor a încercat incorporarea în diverse proteine a metioninei în care sulful a fost înlocuit cu telur. Acesta dă semnale clare în hărțile Patterson și ușurează analiza cristalografică. Prin inginerie genetică a introdus gena producătoare într-o tulpină de E. coli căruia i-a introdus apoi în mediul de cultură acetyl-D,L-Te-metionină. Aceasta a fost incorporată intracelular, hidrolizată de aminoacilaza citosolică iar Te-metionina a fost incorporată în proteinele urmărite, care au fost apoi separate și analizate.

Aminoacilaza I se pare că este în stare să catalizeze și reacția inversă, de acilare (acetilare) a unor aminoacizi. Astfel, se poate sugera că N- α -acetilarea L-metioninei este o posibilitate de a asigura celula cu acetilaminoacid. Mai mult, rezultatele obținute de Biagini [36] sugerează posibilitatea ca sinteza acilaminoacizilor in vivo să fie o modalitate de stocare

a acizilor cu catenă lungă sau scurtă, lucru amintit anterior. Acilaminoacizi ar putea fi, astfel, implicați în mecanismul de toleranță la acizi. Moscarello [47] a demonstrat că proteinele bazice mielinice nu sunt simplu N-acetilate ci conțin acizi grași C4-, C6-, C8-, C10-, dintre care C4- și C8- sunt predominanți. Proteina bazică mielinică umană este prima proteină descrisă care prezintă N-acilare terminală cu diferiți acizi carboxilici alchilici cu catenă scurtă. Aceste rezultate ar putea indica faptul că aminoacilaza este răspunzătoare de acilarea N-terminală a diferitelor proteine. Această enzimă ar putea fi, astfel, implicată în inițierea biosintezei proteice.

Aminoacilaza I umană este localizată în cromozomul 3p21.1 [48,49,50]. Această regiune suferă deleție în unele neoplasme, incluzând cancer al plămânilor, cancer renal, sugerând că acilaza I și gena supresoare tumorală din cancerul de plămâni cu celule mici sunt legate îndeaproape [49,51,52,53,54,55,56,57]. Enzima este probabil implicată în controlul creșterii și diferențierii celulare [58,59].

Tyran [60] a izolat, purificat și caracterizat acilaza umană din miosarcom uterin, adenocarcinom pulmonar și țesuturi adiacente. A găsit că enzima din neoplasmale maligne diferă de cea din țesuturile normale și din tumorile benigne în ceea ce privește valoarea K_m , temperatura optimă și efectul unor ioni. Câteva proprietăți anormale (dependența de pH, activarea de către cobalt și termostabilitatea) au fost comune pentru tumorile benigne și maligne. În țesutul pulmonar adiacent adenocarcinomului s-au observat, de asemenea unele devieri ale proprietăților aminoacilazei, indicând faptul că modificări biochimice pot fi prezente și în țesuturile neafectate de creșterea neoplazică, din punct de vedere histopatologic.

La pacienții cu carcinom renal cu celule clare s-a observat că rinichiul nu exprimă în zona afectată de cancer 4 enzime, și anume enoil-CoA hidrataza, α -glicerol-3-fosfat dehidrogenaza, aldehyd dehidrogenaza și aminoacilaza I [61].

1.2.2. Rolul în modularea semnalelor intercelulare la procariote

Leadbretter [62] și Winans [63] au studiat metabolismul acil-homoserin lactonei la *Variovorax paradoxus*. Acil-homoserin lactonele servesc drept molecule semnal dedicate la transmiterea informației la nivel celulă N celulă la multe specii de proteobacterii (gram-negative). Studiul realizat a relevat faptul că anumite tulpini de *V. paradoxus* degradează și utilizează ca singură sursă de azot și energetică acil-homoserin lactonele. Acestea sunt hidrolizate în prima etapă de către aminoacilază la acid și lactona homoserinei. Aceasta, în prezența lactonazei formează α -cetobutirat și amoniu. Acidul este β -oxidat iar α -cetobutiratul este degradat la propionat și dioxid de carbon.

1.2.3. Rolul în detoxifierea organismelor animale

Glicin-N-acilazele nu sunt propriu-zis hidrolaze, ele catalizând reacția inversă, de conjugare. În acidemia produsă de acumularea de acid izovalerianic, acesta este identificat în urină sub formă conjugată cu glicina. Aceasta este principala formă de detoxifiere a organismului. Dacă este depășită capacitatea de conjugare cu glicina, organismul recurge la conjugare glucuronică. De fapt enzima s-a dovedit a fi activă și față de alte substraturi, cum ar fi izobutiril-, 2-metilbutiril-, izovaleril-, butiril-, hexanoil-, octanoil-, decanoil- și benzoil-CoA [64,65,66,67]. Se știe că și aminoacilaza I catalizează reacția inversă, de acilare, dar studiile s-au realizat, în special în sistem bifazic.

La mamifere, benzoatul este în principal excretat ca acid hipuric (N-benzoilglicină) în urină, deci prin conjugare cu glicina, proces catalizat de sistemul mitocondrial acil-CoA sintaza/acil-CoA: glicin N-aciltransferază. Datele obținute în urma cercetărilor sugerează că acilaza I ar putea fi implicată, de asemenea, în conjugarea benzoatului [68]. Rinichiul și ficatul erbivorelor și omnivorelor prezintă activitatea acilazică I cea mai mare, în timp ce rozătoarele și carnivorele prezintă cele mai mici nivele, cu excepția câinelui. Este bine

cunoscut că erbivorele conjugă, în special, derivații acidul benzoic cu aminoacizi, în timp ce carnivorele formează, mai degrabă, glucuronide. Omnivorele folosesc ambele căi, cu preferință pentru conjugarea cu aminoacizi. Astfel, este curios că acilaza I este abundentă la specii care sunt expuse mult la benzoat și formează predominant sau exclusiv hipurați din benzoați. Mai mult, se știe că, la câine, conjugarea benzoatului cu glicina este limitată la nivelul rinichiului. Detoxificarea alternativă a benzoatului la nivelul rinichiului ar putea fi utilă ca un mecanism de revenire pentru reacția de conjugare mitocondrială. Caracterul lipofilic al acidului benzoic îi permite acestuia să treacă ușor prin membrana celulară. În consecință, ar putea să scape parțial de conjugarea mitocondrială cu glicina și să fie recirculat printre celule, interstițiu, sânge și apoi ultrafiltrat. Sinteza hipuratului, catalizată de acilaza I ar putea constitui un astfel de proces de reluare a detoxifierii. Procesul a fost demonstrat că are loc în tubul proximal, deși nu este exclus că are loc și în partea distală.

Studiind efectele unor intoxicații cu *Amanita phalloides* [69], cel mai sensibil indicator s-a găsit a fi activitatea aminoacilazică I serică. Activitatea acestei enzime a fost semnificativ mai mare la pacienții intoxicați, comparativ cu un grup de control. Creșterea activității a precedat cu câteva ore creșterea activității transaminazelor, care a fost observată la sfârșitul celei de-a doua zile după intoxicare. Acest fapt relevă implicarea aminoacilazei în detoxifiere la nivel hepatic. La administrarea de D-galactozamină (substanță ce provoacă hepatită) unor hamsteri aurii sirieni s-a observat creșterea rapidă dar de scurtă durată a activității acilazei I în plasmă [70]. Același lucru a apărut și după injectarea intraperitoneală a unor doze letale de virus hepatic (murine tip 3) la șoareci. Activitatea aminoacilazică s-a corelat cu manifestarea bolii, fiind un indicator sensibil al hepatitei virale în stadiu incipient [71].

La testarea serului uman a 60 subiecți sănătoși și 260 pacienți cu diferite boli interne, Syewcyuk [72] a observat o activitate mare aminoacilazică I la toți pacienții cu hepatite virale la faza icterică incipientă. Dimpotrivă, doar urme de activitate au fost găsite în serurile pacienților cu diferite afecțiuni hepatobiliare. Nu a apărut de loc activitate aminoacilazică la pacienți cu alte boli sau la subiecții sănătoși.

1.2.4. Bioactivarea xenobioticelor de către aminoacilaze

Studii asupra activității acilazelor renale și hepatice (din iepuri, șobolani, cobai) asupra diferiților mercapturați s-au realizat încă din anii 1950-1960 [73].

Aminoacilazele joacă un rol important în bioactivarea alchenelor polihalogenate la intermediari nefrotoxic. Aceste alchene sunt transformate în glutation-conjugați la nivel hepatic și sunt excretate în bilă. Se crede că glutation-S-conjugații sunt hidrolizați în ductul biliar și în intestin la conjugați S-cisteinici și apoi reabsorbiți, N-acetilați în ficat de către N-acetil transferaze. Mercapturații astfel formați sunt apoi transportați la rinichi și acumulați la acest nivel de către un transportor cu specificitate pentru anioni organici. Enzima ce catalizează formarea metaboliților toxici finali pe această cale, cistein conjugat β -liaza, enzimă piridoxal-fosfat dependentă, necesită substraturi cu grupare aminică liberă. Astfel, mercapturații formați din alchene halogenate necesită deacetilare pentru ca apoi să poată avea loc, în rinichi, formarea intermediarilor activi, în cataliza β -liazei [30]. Toxicitatea renală a unor conjugați cu glutation, cisteină, N-acetilcisteină este localizată în segmentul pars recta al tubilor proximali [74]. Diferite studii relevă rolul important al aminoacilazelor în activarea alchenelor polihalogenate și a S-conjugaților lor.

A. Toxicitatea mercapturaților derivați din haloalchene

Mercapturații (derivați N-acetil-L-cistein-S-substituiți) sunt metaboliți terminali formați prin metabolizarea glutation-dependentă a xenobioticelor, incluzând haloalchenele.

Hexaclorbutadiena este conjugată cu glutationul și formează S-(1,2,3,4,4-pentaclorobutadienil)-glutacion și apoi este transformat în S-(1,2,3,4,4-pentaclorobutadienil)-

L-cisteină (PCBC). Aceasta este N-acetilată la nivelul ficatului. N-acetil-PCBC este acumulată în rinichi. Acilazele renale îl hidolizează la acetat și PCBC, care este substratul pentru cistein-conjugat β -liaza renală. Se formează tiochetena reactivă. Legarea acestui intermediar la macromoleculele renale se pare că este responsabilă de nefrotoxicitatea hexaclorobutadienei. Studiul realizat pe masculi și femele de șobolani a relevat faptul că metabolizarea este funcție de sex, produși mai toxici apărând la mascul [75]. Rezultate asemănătoare s-au obținut și la studiul toxicității tricloroetilenei, S-(1,2-dicloro-vinil)-glutinationului și S-(1,2-diclorovinil)-L-cisteinei [76].

S-a observat lezarea tubulară proximală a rinichilor la șobolani la administrarea de N-acetil-S-(pentaclorobutadienil)-L-cisteină. Leziunile au fost identice cu cele observate după administrarea de hexaclorobutadienă (nefrotoxică), substanță metabolizată la N-acetil-S-(pentaclorobutadienil)-L-cisteină și au avut loc la doze mai mici. Mai mult, N-acetil-S-(1-cloro-1,2,2-trifluoroetil)-L-cisteina, N-acetil-S-(1,1-dibromo-2,2-difluoroetil)-L-cisteina, N-acetil-S-(1,1-dicloro-2,2-difluoroetil)-L-cisteina, N-acetil-S-(1,1,2,2-tetrafluoroetil)-L-cisteina și N-acetil-S-(1,2-diclorovinil)-L-cisteina sunt nefrotoxice pentru șobolani in vivo și pe celule renale, in vitro. Acidul aminooxicetic, un inhibitor al β -liazei, a scăzut toxicitatea acestor mercapturați derivați de haloalchene, indicând o bioactivare β -liaz-dependentă, după ce a avut loc deacetilarea catalizată de aminoacilază.

Studii realizate cu extracte tisulare de ficat și rinichi de șobolan, privind toxicitatea tetrafluoroetilenei, au relevat faptul că activitatea acilazică este de 8 ori mai mare la nivel renal comparativ cu ficatul. De asemenea activitatea acilazică este mai mare decât cea a β -liazei [77].

2-(Fluorometoxi)-1,1,3,3,3-pentafluoro-1-propena (Comp.A) este format pe parcursul anesteziei prin degradarea sevofluranului [78]. Comp.A este nefrotoxic la șobolani și se metabolizează urmând calea acidului mercapturic (la șobolani și la oameni), formând S-[2-(fluorometoxi)-1,1,3,3,3-pentafluoropropil]-N-acetil-L-cisteină (comp.1) și S-[2-(fluorometoxi)-1,3,3,3-tetrafluoro-1-propenil]-N-acetil-L-cisteină (comp.2). Comp.2 dar nu și comp.1 au fost hidrolizați de extracte citosolice renale (umane și de șobolan) și cu acilaze I și III. Nu s-au găsit în urină metaboliți ai comp.1 ci comp.2 și metaboliții lui, acidul 2-(fluorometoxi)-3,3,3-trifluoropropanoic și acidul 2-[1-(fluorometoxi)-2,2,2-trifluoroetil]-4,5-dihidro-1,3-tiazol-4-carboxilic. Comp.2 a prezentat evidențe chimice, clinice și morfopatologice de afectare renală la 2/3 din animalele studiate.

Uttamsingh [79] a identificat o acilază renală la șobolani care catalizează hidroliza mercapturaților derivați de la diferite haloalchene, de exemplu S-(1,2-diclorovinil)-N-acetil-L-cisteina, S-(1,2,3,4,4-pentacloro-1,3-butadienil)-N-acetil-L-cisteina și S-(2,2-dibromo-1,1-difluoroetil)-N-acetil-L-cisteina.

Aparent, nu s-au publicat studii care să investigheze rolul inhibitorilor aminoacilazei asupra toxicității acestor tipuri de mercapturați.

B. Rolul aminoacilazelor în mutagenitatea mercapturaților derivați de haloalchene

Mulți asemenea mercapturați au fost găsiți mutagenici la Salmonella typhimurium. Mutagenitatea lor este inhibată de acidul aminooxicetic și este dependentă, de asemenea, de biotransformările catalizate de aminoacilază. Experimentele au indicat deacetilarea mercapturaților, în cataliza aminoacilazei, la conjugării cisteinici corespunzători și apoi descompunerea la intermediari reactivi și mutagenici de către β -liazele animale sau bacteriene [11].

C. Rolul aminoacilazelor în toxicitatea mercapturaților derivați de haloalchene

S-au realizat studii comparative privind rolul aminoacilazelor în biotransformarea și nefrotoxicitatea mercapturaților, folosind derivați mercapturați ai 1,1-difluor-2,2-dihaloetenei, inclusiv N-acetil-S-(1,1,2,2-tetrafluoretel)-L-cisteina, N-acetil-S-(1-clor-1,2,2-trifluoretel)-L-cisteina, N-acetil-S-(1,1-diclor-2,2-difluoretel)-L-cisteina și N-acetil-S-(1,1-dibrom-2,2-

difluoretii)-L-cisteina. Toți cei patru mercapturați au fost nefrotoxici pentru șobolani in vivo, și au fost citotoxici pentru celulele tubulare renale aflate în suspensie. Pragul pentru inducerea nefrotoxicității, pentru cei patru mercapturați a fost variabil și a fost puternic dependent de tipul halogenului.

În cazul în care cercetările asupra biotransformărilor mercapturaților au fost realizate pe fracțiuni subcelulare renale și hepatice s-a observat că vitezele de deacetilare a mercapturaților mai puțin toxici au fost mult mai scăzute decât pentru cei puternic toxici. Activitatea aminoacilazică mai ridicată, găsită în cazul fracțiilor renale, împreună cu abilitatea rinichiului de a concentra acești mercapturați, pot ajuta la explicarea toxicității selectiv renale a acestor compuși. Aceste rezultate demonstrează rolul important al aminoacilazelor în toxicitatea renală provocată de mercapturații derivați din haloalchene și indică o influență majoră a structurii substratului asupra extinderii deacetilării mercapturaților [11].

D. Contribuția aminoacilazelor la toxicitatea mercapturaților derivați de hidrochinone

Reacțiile aminoacilaz-dependente pot modula toxicitatea mercapturaților derivați de hidrochinone. 2-Bromo-3-(N-acetil-L-cistein-S-il)-hidrochinona, 2-bromo-5-(N-acetil-L-cistein-S-il)-hidrochinona și 2-bromo-6-(N-acetil-L-cistein-S-il)-hidrochinona sunt mai puțin nefrotoxice decât S-conjugații cisteinici corespunzători [74]. Deacetilarea mercapturaților la S-conjugații cisteinici corespunzători poate contribui la nefrotoxicitatea acestor tioeteri, deoarece substituirea hidrochinonelor cu cisteină scade potențialul lor redox și astfel face ca partea hidrochinonică să fie mai ușor oxidabilă la chinone electrofile. Aminoacilaza și echilibrul între acetilare și deacetilare au rol important în nefrotoxicitatea 2,3,5-(triglutation-S-il) hidrochinonei la diferite specii.

E. Activarea aminoacilaz-dependență a erbicidului N-acetilglufosinat

Glutamin sintetaza catalizează conversia glutamatului la glutamină și joacă un rol central în metabolismul azotului. Glutamin sintetaza este o enzimă ubiquitară și este prezentă atât la procariote cât și la eucariote. Enzima este inhibată de L-metionin-S-sulfoximină și de concentrații mici de fosfotricin, care este cunoscut ca erbicid glufosinat. N-acetilglufosinatul este un prodrug al glufosinatului și servește ca alt exemplu pentru rolul aminoacilazei în bioactivări. Deacetilarea N-acetilglufosinatului la erbicidul activ glufosinat poate avea loc înaintea exprimării acțiunii erbicide [11].

1.2.5. D-aminoacilaza

L-aminoacizii sunt componente naturale ale proteinelor. Din punct de vedere al utilizării lor, sunt folosiți în cantități mari ca aditivi alimentari pentru îmbunătățirea gustului, a calității alimentelor, la soluțiile pentru transfuzii, etc., având deci o valoare de utilizare extrem de înaltă.

D-aminoacizii sunt neproteinogenici și nu au prezentat interes practic o lungă perioadă de timp. În natură, existența D-aminoacizilor este limitată la peptide mici ciclice, peptidoglicani din peretele celular bacterian și peptide-antibiotice. Totuși s-a elucidat faptul că D-aminoacizi sunt prezenți în formă legată în componentele constitutive ale unor neuropeptide, smalțul dentar, cristalin, proteine cerebrale. Din acest motiv s-a început studiul elucidării semnificației lor fiziologice, ca și pentru găsirea unor metode enzimatică pentru producerea lor. La ora actuală D-aminoacizi sunt intermediari comerciali importanți pentru producerea de diverse pesticide, piretroide, agenți antimicrobieni și antivirali. De exemplu, D-fenilglicina și D-p-hidroxifenilglicina sunt utilizate la sinteza unor peniciline semisintetice și cefalosporine. Este o cerere tot mai mare de noi D-aminoacizi pentru sinteza unor noi medicamente.

În prezent se testează diferite metode pentru obținerea D-aminoacizilor. Anumite microalge produc direct D-aminoacizi în mediul lor de cultură [162]. Alte microorganisme, de

exemplu *Proteus vulgaris* IAM 12003 [80] degradează, dintr-un amestec racemic, doar L-aminoacizii, datorită acțiunii unei L-aminoacid oxidaze. D-aminoacidul rămas nemetabolizat poate fi separat din mediul de cultură, Takahashi propunând astfel un procedeu pentru obținerea D-metioninei.

Metode mai directe utilizează rezoluția racemicului, folosind fie hidantoinaze, fie aminoacilaze.

Geun-Joong Kim [81] a construit o enzimă artificială prin fuzionarea genei unei D-carbamoilaze din *Agrobacterium radiobacter* NRRL B11291 cu D-hidantoinaza din *Bacillus stearothermophilus* (sau altă specie de *Bacillus*). Gena fuzionată a exprimat-o pe *E. coli* apoi a produs enzima de fuziune. Astfel, derivatul hidantoinic este hidrolizat de către D-hidantoinază iar N-carbamoil-D-aminoacidul rezultat este apoi convertit la D-aminoacidul corespunzător de către N-carbamoilază. Tot o D-carbamoilază din *Agrobacterium tumefaciens* AM-10 este separată, purificată și caracterizată de către Dipti Sareen [82].

D-aminoacilaza a fost pentru prima dată izolată în 1952 din bacterii din sol de către Kameda [163] și anume din specii de *Pseudomonas*. Această enzimă hidroliza derivați N-benzoilici ai D-fenilalaninei, D-tirozinei și D-alaninei. De atunci au fost raportate numeroase surse de D-aminoacilaze, multe tulpini și procedee de producere, purificare și utilizare fiind brevetate. Printre speciile producătoare se pot enumera bacterii și fungi cum sunt *Pseudomonas* sp. 5f-1 [83], *Streptomyces olivaceus* [84], *Alcaligenes denitrificans* DA181 [164], *A. faecalis* DA1 [85,86,87,88,89,90], *A. denitrificans* subspecia *xylosoxydans* [91,92,93,94,95,96,97], *Amycolatopsis orientaris* IFO 12806 [98], *Stenotrophomonas maltophilia* ITV 0595 [99], *Hypomyces mycophilus*, a cărui genă a fost exprimată pe *E. coli* [100], *Ochrobactrum anthropi* SCRC SV3 [101] ce produce o D-aminoacid amidază (hidrolizează amida la aminoacid și amoniac). Tot o D-aminoacilază este separată și din culturi de *Sebekia benihana* [102,103].

1.3. Izolarea, purificarea și caracterizarea aminoacilazei I

Aminoacilaza I a fost identificată la microorganisme, plante și animale.

Cercetările privind aminoacilaza I în plante sunt mai reduse, probabil pentru că plantele nu au fost o sursă viabilă de enzimă pentru scopuri industriale. La analiza prin electroforeză bidimensională a proteinelor din frunze de pepene de apă sălbatic (din deșertul Botswana) s-au găsit șapte noi proteine după ce s-a oprit stropirea cu apă a plantei. Una dintre ele, cu masă moleculară 40 kDa s-a acumulat în cantitate mare. ADNc al acestei proteine a fost analizat și s-a găsit că prezintă similaritate cu cel care codează enzime aparținând familiei ce cuprinde acetilornitin deacetilaza, carboxipeptidaza și aminoacilaza I. Aceasta sugerează că proteina este implicată în eliberarea aminoacizilor prin hidroliza legăturilor peptidice [104]. Așa zisul păr de pe rădăcinile plantelor este de fapt o celulă specializată pentru absorbția apei și a nutrienților. În legume, părul rădăcinilor este, de asemenea, locul primar de recunoaștere și de infectare cu bacteria *Rhizobium* ce fixează azotul. Covitz [105] a studiat din punct de vedere genetic părul rădăcinilor de *Medicago truncatula*, o legumă foarte importantă pentru simbioza cu *Rhizobium*. A caracterizat 899 secvențe tags, găsind și gena ce codează aminoacilaza I.

Surse importante de aminoacilază I sunt cele animale și microbiene.

1.3.1. Izolarea și purificarea aminoacilazei I animale

Deși aminoacilazele sunt distribuite în aproape toate țesuturile animale, studiile realizate au relevat faptul că aminoacilaza I prezintă activitate ridicată în rinichi și ficat. Csaikl [106], utilizând procedura histochimică de identificare a aminoacilazei I prezentată de Quavi [72] a testat prezența enzimei în diferite țesuturi la șoarece, șobolan și cobai. Activitatea cea mai ridicată a apărut în rinichi, urmată de ficat, creier; restul, inimă, mușchi scheletic, testicule, plămân, pancreas, splină au relevat un nivel aproximativ egal de aminoacilază I. Nu a detectat enzima în ser sau eritrocite. De-a lungul timpului au fost elaborate diferite proceduri de purificare a acilazei I din țesuturi animale, în continuare fiind prezentate câteva mai semnificative.

Un studiu amănunțit al prezenței aminoacilazei I (Acy I) la diferite specii de mamifere este prezentat de Lindner [68]. Omogenatele tisulare de rinichi și ficat de cal, oaie, vită, iepure, cobai, șobolan, șoarece, om, porc, pisică și câine au prezentat activitate Acy I clar mai mare în rinichi la toate speciile cercetate (Figura 1.1.)

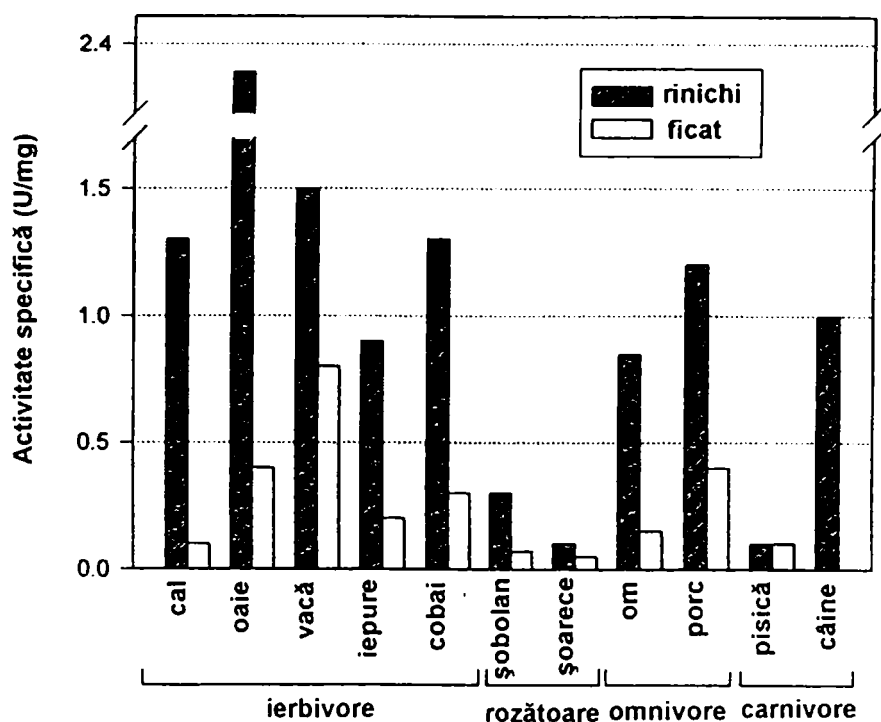


Figura 1.1. Compararea activității Acy I în omogenatele de rinichi (bare pline) și ficat (bare goale) la diferite specii de mamifere. Activitatea specifică s-a măsurat cu N-cloroacetil-L-alanină ca substrat, la 40°C și pH 8.2. [68]

Oomogenatele tisulare au fost purificate urmând aceeași procedură, prezentată anterior de Gilles [107]. Pe scurt, omogenatele tisulare crude au fost supuse la un tratament termic la 74°C, urmat de precipitare cu sulfat de amoniu. Preparatele rezultate au fost apoi purificate prin gel-filtrare pe Fractogel TSK HW 55F (Merck) și cromatografie de interacțiune hidrofobă pe Phenyl-Sepharose CL 4B (Pharmacia), cu eluare în gradient de etilenglicol de la 0 la 70%. Analiza SDS-PAGE în gradient a arătat că toate Acy I separate au o masă moleculară de aproximativ 45 kDa (cea din iepure și cobai puțin mai mică). Procedura de purificare s-a dovedit a fi aplicabilă și la alte specii nu numai la rinichiul de porc. Cele mai multe dintre preparate au fost cel puțin 80% pure, în timp ce enzimele din pisică, oaie și șoarece s-au dovedit a fi mai puțin pure. Preparatele enzimatiche din rinichi au prezentat următoarele activități specifice:

Specie	Câine	Pisică	Cabalină	Bovină	Ovină	Iepure	Cobai	Șobolan	Șoarece	Porcină
Activitate Specifică U/mg	60	5	85	118	255	75	71	26	6	103

(O unitate, U, de activitate este definită drept cantitatea de enzimă care hidrolizează 1 μ mol de N-cloroacetil-L-alanină per minut la 40⁰C; pH 8,2; concentrație substrat 10 mM).

Zamauchi [108] a realizat un studiu oarecum asemănător, fiind interesat de biotransformarea N-acetil-L-cisteinei, pentru a evalua utilitatea acestui compus ca nutritiv la administrarea parenterală. A testat activitatea acilazică la diferite specii (șobolan, iepure, câine, maimuță și om) și în diferite țesuturi. La toate speciile, activitatea cea mai ridicată a fost găsită în rinichi, și doar 10-22% din aceasta în ficat la șobolan, iepure, maimuță și om, și absentă la câine. În celelalte organe activitatea acilazică a fost extrem de scăzută. Distribuția tisulară a acilazei I a fost determinată prin metoda Western blot și imunohistochimic, utilizând anticorpi specifici ai acilazei I porcine. Studiul de imunoblotting a prezentat o bandă proteică de 46 kDa, pentru enzima renală, corespunzătoare acilazei I porcine. În citosolul hepatic a fost observată o bandă de 46 kDa și/sau de 29 kDa la șobolan, iepure, maimuță și om, dar nu și la câine. La studiul histochimic acilaza a apărut clar în tubii proximali renali la maimuță și la om. Aceste studii arată clar că rinichiul și ficatul sunt principalele organe responsabile pentru biotransformarea N-acetil-L-cisteinei la L-cisteină la mamifere, în afară de câine.

Uttamsingh a identificat imunohistochimic prezența acilazei în diferite organe de șobolan, incluzând rinichi, ficat, plămân, creier, stomac, intestin, glande suprarenale, pancreas, testicule [110].

Distribuția subcelulară a Acy I a fost subiect de controversă o perioadă de timp. Hesse [111], Palm [112] și Giardina [44] au propus asocierea la membrană a aminoacilazei în rinichiul și intestinul porcin. Greenhough [113] a dovedit experimental că aminoacilaza nu este atașată covalent la membrană. Într-adevăr, structura primară a enzimei renale nu prezintă motivul secvențial necesar pentru atașarea la o ancoră lipidică [114]. Totuși, aceste rezultate nu au exclus o atașare slabă la membrană. Lindner [68], în studiile făcute, a arătat că modul de comportare al Acy I în timpul centrifugării în gradient de densitate a membranelor microzomale nu este fundamental diferit de cel al lactat dehidrogenazei, enzima citosolică marker, indicând că și aminoacilaza este o enzimă solubilă, citosolică.

De asemenea a fost rezolvată și problema distribuției Acy I în rinichiul mamiferelor [68]. Deși nu există o corelare directă între nivelul de ARN_m și activitatea enzimatică, s-a arătat că transcrierea genei are loc de-a lungul sistemului tubular, inclusiv ductul colector, dar nu are loc în vasele de sânge și celulele interstițiale. Astfel, exprimarea acilazei I nu este restricționată doar la un segment tubular.

Giardina a purificat Acy I din intestin de porc [44]. Intestinul proaspăt recoltat a fost spălat cu tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, conținând ZnCl₂ 5 μ M. Mucoasa a fost răzuită cu o lamă de microscop, apoi s-a agitat 30 minute cu tampon Tris-HCl. Suspensia a fost omogenizată și filtrată pe tifon. După 10 minute centrifugare la 3000g, supernatantul s-a centrifugat din nou la 10000g timp de 20 minute. Supernatantul rezultat a fost din nou centrifugat la 105000g pentru 45 minute. Supernatantul obținut s-a considerat a fi extractul proteic brut, care s-a folosit pentru purificarea Acy I. Extractul brut a fost precipitat fracționat cu sulfat de amoniu, reținându-se fracția 25-60% saturație, ce a prezentat activitatea maximă. Precipitatul obținut la centrifugare (20 minute la 10000g) a fost reluat într-un volum minim de tampon Tris. Soluția s-a dializat peste noapte față de același tampon. Soluția dializată s-a trecut peste o coloană cu DEAE-cellulose, echilibrată în prealabil cu același tampon. Coloana s-a spălat cu tampon apoi a fost eluată cu un gradient liniar de NaCl (500 ml tampon și 500 ml tampon cu 0,7 M NaCl). Frațiile care au prezentat activitate maximă au fost reunite. Soluția obținută s-a amestecat cu o rășină ce avea atașat anticorpi specifici ai acilazei. S-a agitat ușor 2 ore la temperatura camerei (sau 2 ore la 4⁰C). S-a spălat pe coloană cu tampon Tris cu 0,5

mM NaCl. Acyl I legată pe coloană a fost eluată cu tampon glicină-HCl 0,1 M, pH 3,0. Frațiile colectate s-au neutralizat imediat cu tampon Tris 1 M, pH 8,0. Eluentul imunoafin a fost injectat pe o coloană cu Zn-Sepharose, echilibrată cu tampon Tris cu 0,5 M NaCl. Enzima purificată a fost eluată cu tampon Tris cu 0,5 M NaCl și 5 mM EDTA. La analiza SDS-PAGE, fracția după cromatografia de afinitate cu anticorp a prezentat două benzi (una enzima, cealaltă anticorpul), iar după trecerea pe Zn-Sepharose doar o bandă, demonstrând puritate 100% pentru preparatul obținut. Activitățile specifice, randamentul și gradul de purificare de-a lungul procedurii sunt prezentate în Tabelul 1.1.

Tabel 1.1. Purificarea aminoacilazei I din intestin de porc [44]

Treaptă de purificare	Proteine totale (mg)	Activitate totală (unități)	Activitate specifică (U/mg)	Randament de recuperare (%)	Grad de purificare
Omogenat	19000	112500	5,4	100	1
Supernatant la 105000g	4960	111375	22,5	95	4
(NH ₄) ₂ SO ₄	1975	106875	54	90	10
DEAE-cellulose	380	103500	270	87	50
Imunoafinitate	1	45000	45000	38	8300
Zinc afinitate	0,65	38250	58800	25	10888

O unitate enzimatică este definită drept 1 μmol de furilacrilil-L-metionină consumat într-un minut; concentrație substrat 0,6 mM, tampon HEPES 0,1 M, pH 8,0.

Același colectiv a determinat și structura primară a acilazei din intestin porc, comparând-o cu cea renală dată de Mitta [115]. Enzima a fost un dimer, cu masă moleculară/monomer de 45 kDa, cu un pI de 5,2.

Tot Giardina [116] a determinat și distribuția și localizarea subcelulară a acilpeptid hidrolazei și acilazei I de-a lungul tractului gastrointestinal la porc. Nu s-au observat diferențe semnificative ale activităților specifice când intestinul subțire a fost tăiat în 8 segmente (fiecare de 200 cm), ca și la nivelul duodenului, jejunului și ileumului. Aceleași rezultate au fost raportate anterior pentru intestinul subțire de șobolan, pasăre (pui) și maimuță. Aceste rezultate sugerează că ultima treaptă în digestia proteinelor N-α-acilate nu are loc preferențial într-o anumită zonă a tractului digestiv (cel puțin nu a intestinului subțire). După fracționarea subcelulară a enterocitelor s-a observat că acilpeptid hidrolaza este o enzimă solubilă. Acilaza I este, esențial, o enzimă solubilă, doar 5% din activitate fiind asociată cu fracția membranară. Mai târziu s-a sugerat că acest lucru s-a datorat unui artefact de procedură [68]. Când separarea fazelor s-a realizat cu Triton X-114, toate proteinele ancorate de membrana intestinală au fost localizate în faza bogată în detergent, în timp ce acilaza I s-a găsit în faza săracă în detergent. Marcarea imună a celulelor intestinale cu anticorpi specifici a stabilit definitiv localizarea citoplasmatică a aminoacilazei I.

Mitta [115] nu folosește cromatografia de afinitate pentru purificarea acilazei din rinichi de porc. Extractul tisular brut uscat (0,5 g; nu se precizează cum a fost obținut) a fost dizolvat în 30 ml tampon fosfat de sodiu 20 mM, pH 7,6 și aplicat pe o coloană (2x13 cm) cu DEAE-Cellulose echilibrată în prealabil cu același tampon. Coloana a fost eluată tot cu tampon fosfat în gradient de concentrație de la 0,02 la 0,2 M. Frațiile reunite (200 ml) au fost concentrate la 10 ml prin ultrafiltrare și aplicate pe o coloană cu Sephacryl S-200 (3,6x120 cm), echilibrată cu tampon fosfat, pH 7,6 ce conținea 0,2 M NaCl. Acilaza I astfel colectată a fost omogenă atât la analiza HPLC în fază inversă (μBondasphere 5μ C4-300A, 9x150 mm; Waters) cât și la SDS/PAGE (~45 kDa). Activitățile specifice, randamentul și gradul de purificare de-a lungul procedurii sunt prezentate în Tabelul 1.2.

Tabelul 1.2. Purificarea aminoacilazei I din rinichi de porc [115]

Treaptă de purificare	Proteine (mg)	Activitate ^a (x10 ³ U)	Randament de recuperare (%)	Grad de purificare
Extract brut	139	222	100	1
DEAE-cellulose	30,5	151	68	3,1
Sephacryl S-200	13,9	113	51	5,09

^a O unitate de activitate este definită drept cantitatea de enzimă ce hidrolizează 1 μmol N-acetil-L-metionină per oră la pH 7,0 și 25°C.

O aminoacilază I a fost purificată de Giardina din rinichi de șobolan printr-o procedură în cinci trepte, prezentată în Tabelul 1.3.

Tabelul 1.3. Purificarea aminoacilazei I din rinichi de șobolan [117]

Treaptă de purificare	Proteine (mg)	Activitate totală (U)	Activitate specifică (U/mg)	Randament de recuperare (%)	Grad de purificare
Omogenat	320	11100	34	100	1
Supernatant 105000g	100	10000	100	90	3
DEAE-Sepharose	15	7990	535	72	16
Chelating-Sepharose	2,6	5328	2050	48	60
Sephacryl S-200	0,3	2500	8333	23	245

La analiza prin gel filtrare s-a găsit că masa moleculară a fost de 125 kDa pentru enzima din rinichi de șobolan, față de 90 kDa pentru cea din rinichi de porc și care este un dimer. Acest lucru a sugerat faptul că acilaza din șobolan ar putea fi un trimer. La electroforeza pe gel de poli-acrilamidă în condiții nereducătoare și fără denaturare, urmată de o colorare specifică cu acetilmetionină, au apărut clar trei benzi proteice distincte, ceea ce ar putea confirma această supoziție.

De fapt, Birnbaum [12] a fost unul dintre primii cercetători care au purificat acilază I din rinichi de porc, procedura sa fiind apoi utilizată și de alții pentru faza de început a purificării. Rinichiul de porc proaspăt înghețat a fost dezghețat în momentul folosirii și omogenizat într-un Waring blender cu două volume de apă cu gheață. Omogenatul obținut s-a filtrat pe tifon și s-a centrifugat la 2500 rpm timp de 20 minute pentru a îndepărta debriurile celulare. Preparatul s-a adus la pH 4,7 cu HCl 2 N. Suspensia rezultată a fost imediat centrifugată la 4000 rpm timp de 20 minute. Supernatantul s-a adus la pH 6,5 cu NaOH 2 N, apoi s-a tratat cu 266 g sulfat de amoniu per litru de soluție, pH-ul scăzând la 6,0-6,2. Suspensia a fost lăsată peste noapte, apoi centrifugată. Precipitatul a fost reluat cu un volum minim de apă și dializat față de apă de robinet (curgătoare) până la îndepărtarea completă a sulfatului de amoniu. Suspensia din sacul de dializă a fost centrifugată pentru îndepărtarea proteinelor inactivate în timpul dializei. Soluția obținută a fost adusă la pH 5,9-6,0 cu acid acetic diluat și s-a tratat cu acetonă rece (0,4 volume). Suspensia s-a centrifugat și s-a reținut supernatantul care s-a precipitat din nou cu acetonă (0,6 volume). După o nouă centrifugare precipitatul a fost reluat cu apă rece și centrifugat din nou. Supernatantul a fost liofilizat, rezultând preparatul aminoacilazic purificat. Randamentul de recuperare a fost de 50%, la un coeficient de purificare de 36,25.

Hernandez și Pina [118] au purificat aminoacilaza I din rinichi de porc îngrășat, proaspăt tăiat. Fazele inițiale de purificare care au fost cele descrise de Birnbaum [12]. 300 mg din extractul liofilizat au fost suspendate în 7,5 ml tampon fosfat de potasiu 0,2 M pH 7.0 plus 3,75 ml CoCl₂ 20 mM și 3,75 ml H₂O. Amestecul a fost încălzit la 70°C timp de o oră cu agitare continuă. Apoi proba s-a răcit și s-a centrifugat. Supernatantul a fost dializat față de 4

litri CoCl_2 0,2 mM în tampon fosfat 0,1 M, pH 7.0. Această soluție a fost schimbată de 7 ori în 12 ore. Etapele prezentate au realizat o purificare a liofilizatului de 110,2 ori.

Prin încălzirea soluției 60 minute la 70°C nu s-a observat o scădere a activității, dar preparatul obținut a fost mai pur. Enzima obținută a avut o greutate moleculară de 43000 Da/unitate (determinată prin gel cromatografie pe Sephadex G-100 și electroforeză pe gel de poliacrilamidă), fiind un dimer. S-a găsit că fiecare subunitate conține 12 grupări SH și 2 punți disulfidice.

Henseling și Rohn [119] prezintă o altă metodă de extracție și purificare a aminoacilazei din rinichi de porc îngrășat. S-au colectat și ținut pe gheață până la utilizare 5-7 rinichi. S-a detașat cortexul și s-a tăiat în bucăți mici. S-a adăugat o cantitate egală de 70% (v/v) etilenglicol/ H_2O și mixtura a fost omogenizată, întâi cu un cuțit electric, apoi cu un omogenizator Potter. Omogenatul a fost lăsat peste noapte la temperatura camerei apoi a fost centrifugat 30 minute la 10^4 g. Supernatantul a fost dializat față de tampon fosfat 0,2 M (tampon NP7), pH 7.0 de 2 ori cu câte 10 l.

Dializatul s-a adus la 30% saturație cu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solid și s-a păstrat peste noapte. Materialul insolubil a fost îndepărtat. Enzima a fost apoi precipitată prin mărirea saturației în sulfat de amoniu la 50%. Sedimentul a fost dizolvat într-un volum minim de tampon NP7 (50-100 ml). Soluția obținută a fost aplicată pe o coloană cu Sephacryl S-300 (5x70 cm) echilibrată și eluată cu NP7, cu un debit de 200 ml/oră. Frațiile active au fost reunite și aplicate imediat pe o coloană de fenil-Sepharose (3x30 cm), echilibrată cu NP7. Proteinele nelegate s-au îndepărtat prin spălare cu NP7. Aminoacilaza a fost eluată cu 600 ml NP7 în gradient liniar cu un amestec (v/v) de 60% etilenglicol 40% NP7.

Fracția activă a fost dializată față de un tampon fosfat 20 mM, pH 7,6 și aplicată pe o coloană cu DEAE-celuloză (2x20 cm) echilibrată cu același tampon. După spălarea proteinelor nelegate enzima a fost eluată cu un gradient liniar de la 20 la 200 mM tampon fosfat pH 7,6. S-au colectat fracțiile active, s-au dializat față de tampon fosfat 10 mM, pH 7, apoi s-au liofilizat. În afară de omogenizare, toate fazele de purificare s-au desfășurat la temperatură sub 10°C . S-a obținut o purificare de 18,5 ori. Enzima obținută a prezentat o singură bandă electroforetică (SDS-acrilamidă) și o activitate de 340 U/mg (0,1M Mops/NaOH-pH 7,0 la 25°C).

Colectivul condus de Szajani a publicat mai multe articole sau brevete în care prezintă diferite proceduri de purificare, parte din ele pentru a obține o enzimă în vederea imobilizării ei, sau studiului comportamentului în solvenți organici [120,121,122,123]. În principiu, rinichiul de porc este omogenizat cu apă, supernatantul încălzit la $60-80^\circ\text{C}$ apoi centrifugat. Supernatantul este precipitat cu sulfat de amoniu la diferite saturații, centrifugat iar precipitatul colectat se reia cu o cantitate mică de apă, se dializează și apoi se liofilizează [121]. A obținut prin aceste procedee preparate cu activități specifice între 319 și 2735 U/mg (o unitate fiind definită drept micromoli de N-acetil-L-metionină hidrolizați într-o oră). Preparatele astfel obținute au fost purificate prin cromatografie de schimb ionic pe DEAE-Sephadex A-50 (purificare de 1,9 ori). În continuare se folosește o gel filtrare pe Sephadex G-200 urmată de precipitare cu sulfat de amoniu (purificare de 1,9 ori) [122].

1.3.2. Izolarea și purificarea aminoacilazei I microbiene

A fost testat un număr impresionant de microorganisme producătoare de aminoacilază I, bacterii, fungi, alge.

- Bacterii sunt din genurile *Micrococcus glutamicus*, sau *M. agilis* [124]; *Pseudomonas* sp. [29], *P. diminuta* [24,125], *P. putida* [35,126,127,128,129], *P. aeruginosa* [25], *cruciviae*; *Rhizobium* sp. [130]; *Streptovercillium* sp. [131], *S. rimofaciens* [132], *S. olivoreticuli* [133,134,135]; *Bacillus stearothermophilus* [136,137], *B. thermoglucosidius* [138,84], *B. subtilis* [139]; *Brevibacterium* sp. [27]; *Lactococcus lactis* [140]; *Pyrococcus*

horikoshii [38,141], *P. furiosus* [39,142]; *E. coli* [143,144,84]; *Comamonas testosteroni* [26,145], *Alcaligenes denitrificans* [146,147], etc.

- Fungi ca *Streptomyces* sp. [84,148], *S. olivareus*, *S. briseus*, *S. atratus* [149], *S. hachijoensis* [132]; *Aspergillus* sp. [150,106], *A. oryzae* [151,152,153], *A. meleus* [154,155,156, 157], *A. nidulans*, *A. flavus* [158].

- Alge ca *Euglena gracilis* [159].

Din punct de vedere al modului de cultivare a microorganismului în vederea producerii aminoacilazei I, au fost utilizate cele două metode clasice : cultura de suprafață (pe mediu solid) și cultura submersă.

1.3.2.1. Obținerea aminoacilazei I prin culturi de suprafață

În vederea selectării tulpinilor producătoare de aminoacilază I, Yamazaki [160] a cultivat diferitele microorganisme pe un mediu solid cu agar ce conținea N-acetilmetionină și N-acetilfenilalanină. Aminoacizii eliberați în jurul coloniilor producătoare de aminoacilază au fost puși în evidență printr-o procedură cu o-ftalaldehidă.

Pentru cultivarea la scară largă, microorganismele utilizate au fost de fapt fungi, iar mediile de cultură N surse naturale de carbon și azot ca tărâțe de grâu, coji de orez, făină de soia, chiar felii de pâine.

Sursa cea mai utilizată pentru obținerea aminoacilazei a fost, mulți ani, *Aspergillus oryzae*. Sakurai [99] a studiat creșterea unei tulpini locale de *A. oryzae* pe bucăți de pâine, tăiate mărunt (5 mm³) și umezite cu apă. Dezvoltarea tulpinii, evaluată ca și conținut de glucozamină în mediu de cultură, a avut o evoluție logaritmică în faza inițială, cu aplatizare în faza finală. Timpul de atingere al dezvoltării maxime a depins de temperatură, optimul fiind la 30°C (36 de ore) și a coincis și cu atingerea consumului maxim de oxigen.

Chibata și colectivul [165,166] au cultivat *A. oryzae* pe un mediu de deșeuri cerealiere și anume: tărâțe de grâu și coji de orez umezite cu apă. Timpul de incubare a culturii a fost de 5 zile la 30°C. Rețeta prezentată pentru cultivare, urmată de extracția din mediul de cultură și purificarea sumară a aminoacilazei cuprinde următoarele etape:

Tulpina de *Aspergillus oryzae* nr. 9, înalt productivă în aminoacilază, se cultivă pe un mediu compus din: 1000 g tărâțe de grâu, 500 g coji de orez și 750 ml apă. Cultura este incubată 5 zile la 30°C. Apoi este extrasă prin agitare cu 15 litri apă timp de 2 ore și filtrată pe celită. Filtratul este adus la pH 7,0 cu NaOH 1M și fracționat cu sulfat de amoniu. Se colectează fracțiunea proteică precipitată la saturații între 30% și 50%, se dizolvă în apă și se dializează față de apă rece timp de 16 ore. Soluția rezultată se liofilizează. Activitatea preparatului este de 20 μmoli/oră/mg preparat, în condiții standard de testare (0,33 U/mg preparat).

Wang și colaboratorii [152] au preparat o aminoacilază mai puțin purificată în vederea imobilizării pe poli(acrilamide modificate). Tulpina de *Aspergillus oryzae* 3042 a fost cultivată 48 ore la 26-28°C pe un mediu conținând tărâțe de grâu, făină de soia și apă de fântână. Cultura a fost extrasă cu tampon fosfat 0,05 M pH 7,0 urmată de precipitare cu sulfat de amoniu, colectându-se fracția 40 - 60% saturație la pH = 7,0. Precipitatul a fost dializat față de tampon fosfat 0,05 M, pH 7,0. Activitatea enzimei obținute a fost de 17,6 U/mg (1U = 1 μmol L-Metionină eliberată prin hidroliza N-acetil-D,L-metioninei 0,033 M, o oră la pH 7.0 și 37°C).

1.3.2.2. Obținerea aminoacilazei I prin culturi submerse

Cultivarea microorganismelor în mediu submers prezintă o serie de avantaje, comparativ cu mediul solid. Se pot controla și standardiza mediul de cultură (mai ales dacă este sintetic), temperatura, pH-ul se poate menține constant, sau poate fi variat în funcție de necesități. Se pot realiza culturi în cantități mari (biofermentatoare de sute de mii de litri), care

se pot steriliza și menține sterile pe tot parcursul procesului. Dacă enzima este extracelulară, prin filtrare se îndepărtează debriurile solide și se obține direct o soluție a enzimei, care se purifică în continuare. Dacă enzima este intracelulară, atunci se filtrează și se separă celulele, urmând ca acestea să fie lizate printr-o procedură oarecare și enzima este extrasă cu solventul adecvat din lizatul celular. În cazul culturilor solide, după terminarea fazei de creștere a microorganismului urmează, pe lângă lizarea celulelor în cazul enzimelor intracelulare, și o fază obligatorie de extracție. Marele dezavantaj este că se extrag nu numai componentele celulare dorite, dar în suspensie rămân o înfinitate de alte substanțe din mediul de cultură solid, greu de îndepărtat. Din această cauză, dacă procesul o permite, se folosesc culturile submerse.

Yuan și colab. [153] cultivă *A. oryzae* în vederea imobilizării celulelor și nu pentru extragerea enzimei. Pentru aceasta au lăsat la umflat 10 grame de făină de soia cu 100 ml apă distilată timp de 24 de ore la temperatura camerei. Suspensia a fost apoi fiartă 30 minute și filtrată pe tifon. La filtrat s-au adăugat 3 grame de glucoză și agar. Tulpina de *A. oryzae* W19 a fost cultivată pe acest mediu la 29°C timp de 3 zile. Miceliul obținut (celulele) a fost utilizat în continuare pentru inoculare pe mediul cu extract de soia și glucoză prezentat anterior. Cultura submersă s-a realizat în flacoane conice, agitate în plan, timp de 42 ore. Mediul de cultură a fost apoi filtrat și celulele spălate cu tampon fosfat 0,1 M, pH 7,0. În același tampon s-a realizat apoi și imobilizarea pe gelatină cu glutaraldehidă și etilendiamină.

F. Javid-Majd și J.S. Blanchard [28] induc creșterea unor celule de *Escherichia coli* producătoare de aminoacilază cu specificitate pentru N-acetilornitină prin adăugarea în mediul de cultură a izopropil-1-tio-β-D-galactopiranozidului. După dezvoltarea completă a celulelor, acestea au fost separate prin centrifugare la 12000 g, apoi reluate cu tampon fosfat 50mM, pH 7,6, conținând inhibitori de proteaze, lizozim și DNază. Celulele au fost trecute apoi, pentru liză printr-o presă (French Press) la 12000 psi. Debriurile celulare s-au îndepărtat prin centrifugare. Supernatantul s-a purificat prin cromatografie pe Q-Sepharose (eluție în gradient liniar de KCl 0-1 M în tampon fosfat 50mM, pH 7,6). Frațiile cu activitate acilazică s-au reunit și s-au precipitat cu sulfat de amoniu la concentrație finală de 1M. Supernatantul s-a cromatografiat pe phenyl-Sepharose (eluție în gradient liniar de sulfat de amoniu 1,0-0,0M, în același tampon). Frația cu activitatea cea mai ridicată a avut o omogenitate de peste 95% (SDS-PAGE). Enzima a prezentat activitate și față de alți N-acetil-L-aminoacizi (Ala, Asn, Cis, Gln, Gli, Leu, Lis, Met, Ser), afinitatea cea mai mare fiind față de metionină. Nu a prezentat activitate față de N-acetil-D-aminoacizi.

Y.C. Tsai și colab [147] brevetează un procedeu de izolare de tulpini producătoare de aminoacilază I, de cultivare a microorganismului și de purificare a enzimei. Mediul de cultură solid pentru izolarea tulpinilor a cuprins 1% (g/v) N-acetil-D,L-metionină (sau N-acetil-D,L-valină), 0,1% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄·7H₂O și 1,5% agar (pH 7,0). Tulpinile capabile să crească pe un asemenea mediu au fost cultivate pe un mediu lichid, cu agitare continuă, timp de 20 ore. Mediul de cultură a conținut 1% N-acetil-D,L-metionină (sau N-acetil-D,L-valină), 0,5% extract de drojdie, 0,1% K₂HPO₄ și 0,05% MgSO₄·7H₂O (pH 7,0).

În urma determinării activității acilazice în mediul de cultură a fost identificată o tulpină de *Alcaligenes denitrificans*. Activitatea enzimei a fost determinată având ca substrat N-acetil-L-alanina (15mM în tampon Tris/HCl 50 mM, pH 7,8), la 37°C. Sursele de azot preferate au fost extract de drojdie, peptonă, extract de carne, de soia. Sursa de carbon preferată a fost aleasă dintre acizi organici (aminoacizi), iar ca săruri KH₂PO₄, MgSO₄ și NaCl. Enzima este intracelulară. După ruperea celulelor, extractul a fost purificat prin precipitate cu sulfat de amoniu și trei trepte de cromatografie. Rezultatele purificării sunt prezentate în Tabelul 1.4. Comparativ cu aminoacilaza purificată de *Chibata* din *Aspergillus* [166] prin precipitare cu sulfat de amoniu și acetonă, și care a avut o activitate specifică de 0,6 U/mg, enzima din *A. denitrificans*, după precipitare cu sulfat de amoniu și cromatografiere pe Fractogel TSK DEAE-650(s) a prezentat o activitate de 11,1 U/mg, de 18,5 ori mai mare.

Tabel 1.4. Sumar al purificării L-aminoacilazei din celule de *Alcaligenes denitrificans* [147].

Treapta de purificare	Volum total ml	Proteine totale mg	Activitate totală U	Activitate specifică U/mg	Randam. recuper. %	Grad purif.
extract brut	100	2145	565,3	0,26	0,26	1
Precipitare 40% (NH ₄) ₂ SO ₄	120	984	508,8	0,60	90	1,3
Fractogel TSK DEAE-650(s)	500	23	252	11,1	45	42,7
TSK butyl-Toyopearl 650 (M)	20	0,351	172,3	490,8	31	1885
TSK phenyl-Toyopearl 650 (M)	25	0,121	84,3	696,7	15	2679,5

H. Umezawa și colab. [132] brevetează tulpini de actinomicete (*Streptomyces rimofaciens*, *Streptoverticillium*), medii de cultură și condiții de cultivare în vederea obținerii de aminoacilază I. Mediile de cultură au fost agar cu adaus de glucoză-asparagină, glicerol-asparagină, amidon-săruri anorganice, tirozină, drojdie, malț. Ca surse de carbon au mai utilizat D-glucoză, D-fructoză, inozitol, D-manitol, D-arabinoză, D-xiloză, zaharoză, L-ramnoză, rafinoză. Ca surse de azot au utilizat peptonă, extract de carne, extract de porumb, făină de soia sau de arahide, extract de drojdie, cazeină, etc. Temperatura optimă de cultivare a fost 20 - 30°C, timpul de incubare 1 - 10 zile, pH-ul 7,0 - 8,0. Un exemplu de mediu este, pentru 100 ml: 1,0% amidon, 1,0% glucoză, 0,75% extract de carne, 0,75% polipeptonă, 0,3% NaCl, 0,1% MgSO₄, 0,007% CuSO₄, 0,001% FeSO₄, 0,0008% MnCl₂ și 0,0002% ZnSO₄; temperatura 27°C; cultură agitată 4 zile. Fazele de purificare a enzimei au cuprins ultrafiltrare în două trepte, apoi cromatografiere (pe Column-lite, CM Sephadex, DEAE-Sephadex A 50, Sephadex G 100, CM-Toyoperl 650M, sau/și DEAE-Toyopearl 650M. Gradele de purificare au variat funcție de metoda adoptată.

S.V. Story și colab. [142] a obținut o aminoacilază prin cultivarea de *Pyrococcus furiosus* la 95°C pe un mediu conținând ca sursă de carbon maltoza. Nu s-a detectat activitate acilazică în supernatantul mediului de cultură în timpul fazei log de creștere și nici în membranele celulare. Activitate s-a detectat doar în extractul celular, deci această acilază este o proteină citoplasmatică. Purificarea enzimei s-a realizat în condiții anaerobe, la 23°C. Celulele s-au lizat prin înghețare-dezghetare în tampon Tris/HCl (pH 8,0; 50mM) cu DNase I (10μg/ml) și ditionit de sodiu 2mM. Extractul celular s-a centrifugat la 18000g apoi s-a cromatografiat în 5 trepte. Fazele și rezultatele purificării sunt prezentate în Tabelul 1.5.

Tabel 1.5. Purificarea aminoacilazei I din *P. furiosus* [142]

Treaptă de purificare	Activitate ^a U	Proteine mg	Activitate specifică U/mg	Randament recuperare %	Grad de purificare
extract celular	8800	26000	0,3	1	100
OFF Sepharose	5800	1600	3,7	11	65
Phenyl Sepharose	4100	160	25,4	75	46
OHP Sepharose	1050	27	39,0	115	12
Hydroxyapatite	700	7	100	290	8
HiTrap Q	660	3	200	580	7

^a Activitatea a fost măsurată la 100°C, utilizând N-acetil-L-metionina (30mM) ca substrat.

S-a obținut o enzimă pură, ce a prezentat o singură bandă electroforetică (SDS), corespunzând la o masă moleculară de 45 kDa. De fapt enzima este un homotetramer, după cum s-a determinat prin gel-filtrare.

M.W.W. Adams [39] a cultivat tot *Pyrococcus furiosus* pe un mediu submers conținând săruri anorganice, sursă de azot (cazeină, peptonă, extract de drojdie, etc) și au urmărit dezvoltarea celulelor în prezența a diferite surse de carbon prin determinarea în mediul de cultură a numărului de celule și a concentrației de acid fenilacetic (produs de degradare al fenilalaninei). În ordine crescătoare a eficienței lor, aceste surse de carbon sunt: maltoză, maltoză + sulf elementar (S^0), maltoză + peptide, maltoză + peptide + S^0 și peptide + S^0 . Rezultatele obținute au relevat faptul că maltoza nu este o sursă potrivită de carbon, iar prezența sulfului este esențială pentru creștere, chiar și în cazul mediului cu peptide.

K. Ishikawa și colab. [141] au exprimat gena aminoacilazei din *Pyrococcus horikoshii* OT3 (care este hipertermostabilă) pe *E. coli*, apoi au cultivat acest microorganism pe un mediu ce a conținut extract de drojdie, triptonă, cloruri de sodiu, calciu, cobalt, mangan, zinc și ampicilină, la 37°C. Inducerea proteinei recombinante s-a realizat tot cu izopropil- β -D-tiogalactopiranoză. Purificarea enzimei a cuprins ruperea celulelor prin sonicare, extragerea cu tampon fosfat 50mM, pH 6,0 cu 0,6M NaCl; încălzire la 85°C, centrifugare, dializarea supernatantului și cromatografie pe HiTrap Q. Eluția s-a realizat în gradient liniar de NaCl (0 - 1,0M) în tampon Tris/HCl 50mM, pH 8,0. A urmat concentrare pe filtru Centricon 100 și cromatografie pe HiLoad Sephadex 200 cu eluție cu tampon Tris/HCl 100 mM, pH 8,0 cu 1,0M NaCl. Enzima a fost obținută în stare pură (SDS-PAGE), și are o masă moleculară de 43 kDa.

O aminoacilază cu specificitate pentru aminoacizi cu catenă lungă (grași) a fost obținută din culturi de *Pseudomonas diminuta* [125], pe un mediu ce a conținut 2,0% glucoză, 1,0% extract de carne de vită, 1,0% peptonă, 0,1% KH_2PO_4 , 0,3% $(NH_4)_2SO_4$ și 0,2% NaCl, la un pH 7,2; temperatură 28°C; timp de incubare 24 - 48 ore. Purificarea enzimei a constat în extragere din celulele lizate prin ultrasonicare, precipitare cu sulfat de amoniu și trei trepte cromatografice. Rezultatele purificării sunt prezentate în Tabelul 1.6.

Tabel 1.6. Purificarea aminoacilazei I din *P. diminuta* [125]

Treaptă de purificare	Activitate totală U	Proteine mg	Activitate specifică U/mg	Randament recuperare %	Grad de purificare
extract celular	29795	6621	4,5	100	1
$(NH_4)_2SO_4$, fracția 30-60%	23705	2540	9,33	79,6	2,1
DEAE-cellulose	4760	76,1	62,5	16,0	13,9
Hydroxyapatite	3943	2,87	1374	13,2	305,3
Sephadex G-200	2725	0,93	2933	9,1	651,8

S-a obținut o enzimă pură, cu masa moleculară 300 kDa.

A. Bodalo și colab. [126,128,161] cultivă tot specii de *Pseudomonas* în vederea obținerii aminoacilazei I. Pentru a obține un optim a fost necesară prezența în mediul de cultură a N-acetil-D,L-alaninei 10g/l, alături de săruri anorganice; temperatura optimă de creștere a fost 30°C și pH-ul 7,5. De fapt au realizat un studiu, variind concentrația de aminoacid (5 - 10 g/l), temperatura (20 - 30°C) și pH-ul (6 - 8), prezentând și un model matematic, bazat pe cinetica Monod, al vitezei de creștere a microorganismului și a consumului substratului limitativ (N-acetil-D,L-alanina), funcție de condițiile de mediu.

După cum se vede din exemplele prezentate, microorganismele producătoare de aminoacilază I sunt extrem de variate, mai înalt productive și cu o mai bună rezistență

termică, în special, fiind cele microbiene, dar cu dezavantajul că enzima este intracelulară și ca atare trebuie extrasă, ceea ce cuprinde faze suplimentare, adesea laborioase.

Purificarea enzimei cuprinde, aproape întotdeauna, o serie de proceduri cromatografice, de obicei o combinație de gel-filtrare și schimb ionic.

Din păcate nu se poate face o comparație a activității preparatelor obținute, de vreme ce condițiile de determinare au variat de la caz la caz, ca și substratul folosit.

1.4. Structura aminoacilazei I și a centrului activ

Studiile referitoare la structura aminoacilazei I (Acy) s-au realizat atât pe enzima de proveniență animală, în special din rinichi și ficat de porc, cât și de proveniență microbială.

1.4.1. Structura aminoacilazelor I animale

Acy porcine este un homodimer cu masă moleculară 91 kDa ce conține un singur ion de Zn^{2+} per subunitate [167].

Aminoacilazele I, porcine și umane, sunt înrudite îndeaproape, având o identitate secvențială de 85% la nivelul conținutului în aminoacizi. O serie de cercetători au determinat structura primară a acestor acilaze, ca și a celei din rinichi de șobolan [114,115,44,117,111, 168,169,170]. Compoziția în aminoacizi a unor aminoacilaze I (corespunzător analizei de aminoacizi, respectiv din secvența ADN) este prezentată în Tabelul 1.7.

Tabel 1.7. Compoziția în aminoacizi a unor aminoacilaze I

Amino-acizi	Pyrococcus furiosus ^b [142]	Ficat uman ^b [171]	Rinichi șobolan ^b [117]	Intestin porcine ^a [44]	Rinichi porcine ^a		Rinichi porcine ^b	
					[115]	[111]	[114]	[115]
Cys ^c (C)	2	4	7	06,7±0,2	5,2	6,7±0,3	5	5
Asx (D,N)	16(Asp) 11(Asn)	20(Asp) 11(Asn)	32	32,0±1,4	27,8	27,0±1,8	28	28
Thr (T)	12	26	27	24,5±0,5	22,5	18,8±0,4	25	24
Ser (S)	9	25	27	27,9±1,0	24,3	26,5±0,9	25	26
Glx (E,Q)	43(Glu) 7(Gln)	31(Glu) 15(Gln)	51	52,7±1,5	50,5	53,1±2,3	48	48
Pro (P)	18	29	28	25,5±1,0	24,1	19,3±2,5	24	24
Gly (G)	41	24	28	32,0±1,0	29,0	27,9±1,6	29	29
Ala (A)	37	36	36	35,3±0,1	36,0	32	35	36
Val (V)	30	37	30	35,9±0,5	36,3	29,4±1,7	37	37
Met (M)	8	10	7	07,5±0,5	7,5	6,8±1,1	9	9
Ile (I)	33	11	15	14,0±0,3	11,0	13,0±1,4	11	11
Leu (L)	29	32	36	38,7±0,8	35,7	33,5±1,2	36	36
Tyr (Y)	7	10	7	11,0±0,3	9,3	11,4±0,5	9	9
Phe (F)	19	23	21	21,8±1,6	22,9	18,9±1,5	23	24
His (H)	11	15	13	12,0±0,7	14,6	9,7±1,1	15	15
Lys (K)	23	15	19	20,1±0,2	16,5	23,6±1,2	17	17
Trp ^d (W)	3	9	Nedetem	06,9±0,1	8,3	11±1	8	8
Arg (R)	23	25	25	22,9±1,7	22,2	18,4±0,8	22	22
Total nr. rezidii per subunitate	383	408	409	427	407	-	406	407

^aexprimat ca rezidii/M_r; ^bDedus din secvența ADN_c; ^{c,d}Determinat ca S-carboximetilcisteină și respectiv, după hidroliza cu acid metansulfonic

În cazul acilazei renale porcine, a celei umane hepatice și a celei din rinichi de șobolan s-a găsit o identitate a secvenței aminoacidice de 100% în unele regiuni (în special 9-27, 72-97, 116-133, 135-159 și 180-195), ceea ce sugerează că cele trei proteine ar putea să fi rezultat de la o genă ancestrală comună care a suferit apoi evoluție diferită [117].

Secvența nucleotidică și secvența dedusă de aminoacizi pentru aminoacilaza I umană hepatică este prezentată în Figura 1.2. [171]

-58	CGCTGAGAGCGGAGCGTGAGCCCAGCGACAGGAGAGTGAGCTCACCACGCGCAGCGCC	-1
1	ATGACCAGCAAGGGTCCCGAGGAGGAGCACCCATCGGTGACGCTCTTCCGCCAGTACCTGCGTATCCGCACT	72
1	M T S K G P E E E H P S V T L F R Q Y L R I R T	24
73	GTCCAGCCCAAGCCTGACTATGGAGCTGCTGTGGCTTTCTTTGAGGAGACAGCCCAGCTGGGCCTGGGC	144
25	V Q P K P D Y G A A V A F F E E T A R Q L G L G	48
145	TGTCAGAAAGTAGAGGTGGCACTGGCTATGTGGTGACCGTGTGACCTGGCCAGGCACCAACCCCTACACTC	216
49	C Q K V E V A P G Y V V T V L T W P G T N P T L	72
217	TCCTCCATCTTGCTCAACTCCACACGGATGTGGTGCCTGTCTTCAAGGAACATTGGAGTCACGACCCCTTT	288
73	S S I L L N S H T D V V P V F K E H W S H D P F	96
289	GAGGCCCTCAAGGATTCTGAGGGCTACATCTATGCCAGGGGTGCCAGGACATGAAGTGCCTCAGCATCCAG	360
97	E A F K D S E G Y I Y A R G A Q D M K C V S I Q	120
361	TACCTGGAAGCTGTGAGGAGGCTGAAGGTGGAGGGCCACCGGTTCCCCAGAACCATCCACATGACCTTTGTG	432
121	Y L E A V R R L K V E G H R F P R T I H M T F V	144
433	CCTGATGAGGAGGTGGGGGTACCAAGGCATGGAGCTGTTCGTGCAGCGGCTGAGTCCACGCCCTGAGG	504
145	P D E E V G G H Q G M E L F V Q R P E F H A L R	168
505	GCAGGCTTTGCCCTGGATGAGGGCATAGCCAATCCCACTGATGCCTTCACTGTCTTTTATAGTGAGCGGAGT	576
169	A G F A L D E G I A N P T D A F T V F Y S E R S	192
577	CCCTGGTGGGTGGGGTTACCAGCACTGGGAGGCCAGGCCATGCCTCAGCTTCATGGAGGACACAGCAGCA	648
193	P W W V R V T S T G R P G H A S R F M E D T A A	216
649	GAGAAGCTGCACAAGGTGTAAACTCCATCCTGGCATTCCGGGAGAAGGAATGGCAGAGGCTGCAGTCAAAC	720
217	E K L H K V V N S I L A F R E K E W Q R L Q S N	240
721	CCCCACCTGAAAGAGGGGTCCGTGACCTCCGTGAACCTGACTAAGCTAGAGGGTGGCGTGGCCTATAACGTG	792
241	P H L K E G S V T S V N L T K L E G G V A Y N V	264
793	ATACCTGCCACCATGAGCGCCAGCTTTGACTTCCGTGTGGCACCGGATGTGGACTTCAAGGCTTTTGAGGAG	864
265	I P A T M S A S F D F R V A P D V D F K A F E E	288
865	CAGCTGCAGAGCTGGTGCCAGGCAGCTGGCGAGGGGGTACCCTAGAGTTTGCTCAGAAGTGGATGCACCCC	936
289	Q L Q S W C Q A A G E G V T L E F A Q K W M H P	312
937	CAAGTGACACCTACTGATGACTCAAACCCCTGGTGGGCAGCTTTTAGCCGGGTCTGCAAGGATATGAACCTC	1008
313	Q V T P T D D S N P W W A A F S R V C K D M N L	336
1009	ACTCTGGAGCCTGAGATCATGCCTGCCTGCCACTGACAACCGCTATATCCGCGGGTGGGGTCCCAGCTCTA	1080
337	T L E P E I M P A A T D N R Y I R A V G V P A L	360
1081	GGCTTCTCACCCATGAACCGCACACCTGTGCTGCTGCACGACCACGATGAACGGCTGCATGAGGCTGTGTT	1152
361	G F S P M N R T P V L L H D H D E R L H E A V F	384
1153	CTCCGTGGGGTGGACATATATACACGCTGCTGCCTGCCCTTGCCAGTGTGCCTGCCCTGCCAGTGACAGC	1224
385	L R G V D I Y T R L L P A L A S V P A L P S D S	408
1225	TGAGCCCTGGAACCTCCTAAACCTTTTGCCCTGGGGCTTCCATCCCAACCAGTGCCAAGGACCTCCTCTTCC	1296
409	*	
1297	CCCTTCCAAATAATAAAGTCTATGGACAGGGCTG	1330

Figura 1.2 Secvența ADNc (clonată) și secvența dedusă de aminoacizi a aminoacilazei I umane hepatice [171].

După ce secvența aminoacidică a devenit cunoscută, a reieșit că aminoacilazele din mamifere prezintă patru resturi de triptofan care sunt localizate în două motive (secvențe) particulare, așa numitele PWW. Fiecare din aceste secvențe este formată din triada PWW (P₁₉₂W₁₉₃W₁₉₄ și respectiv P₃₂₁W₃₂₂W₃₂₃ la acilaza umană), precedată de patru aminoacizi puternic polari. Aceste secvențe, care nu se găsesc la nici una din enzimele procariote din clasa M20, sunt probabil localizate la interfața celor două domenii care constituie monomerul Acy I [112]. La început s-a propus că această secvență PWW ar putea fi responsabilă pentru tendința Acy I de a se atașa la membrana microzomială, deoarece secvențe similare apar

adesea la proteine membranare [158,18]. Mai recent s-a arătat că Acy I porcine este citosolică [44,68]. Lindner [172] a încercat să stabilească rolul acestei secvențe prin diferite mutații genetice punctiforme, la nivelul acestei secvențe. Concluzia a fost că sunt componente esențiale ale enzimei, ce stabilizează conformația proteinei native. Mutații realizați au prezentat denaturare mult mai rapidă la temperatură sau diferiți agenți denaturanți, stabilitate mai scăzută, constante cinetice diferite, ca și comportament la gel filtrare.

Structura secundară a aminoacilazei native (holo) și fără zinc (apo) a fost examinată prin tehnici spectroscopice (CD și FT-Raman) [173]. Analiza cantitativă a benzii I a amidei conformațional sensibilă a indicat că holo și apo-enzima conțin 19,3% și respectiv 17,2% structură helicoidală. Spectrele UV îndepărtat-CD a holo și apo-enzimei au indicat un conținut de 20,1%, respectiv 17,6% alfa-helix. Metoda de predicție a structurii secundare a indicat 20,9% structură alfa-helix, incluzând 10 segmente alfa-helix. Rezultatele au arătat că după îndepărtarea ionului Zn^{2+} din aminoacilază, extinderea structurii ordonate a scăzut remarcabil. Conformația centrului activ sau a vecinătății acestuia ar putea conține o structură mai ordonată iar prezența zincului ar putea ajuta la menținerea conformației active catalitice a centrului activ.

Structura tridimensională a fost determinată de Palm și Rohm [112]. Rezultatele obținute în urma secvențializării catenei enzimei native cu tripsină, combinată cu analiza computerizată a structurii secundare și a hidrofilicității, au sugerat un model pentru împachetarea monomerului aminoacilazei. (Figura 1.3).

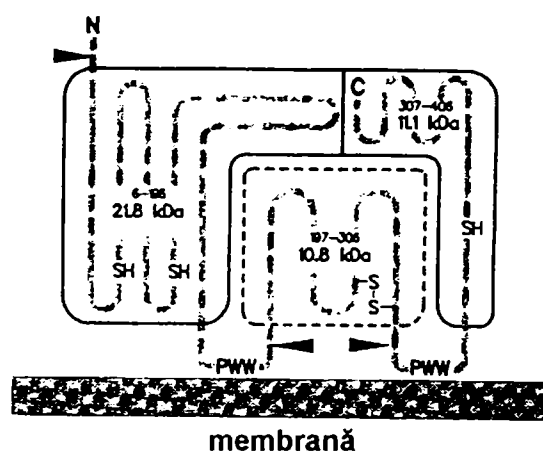


Figura 1.3. Model de împachetare a monomerului aminoacilazei I porcine [112]

În primul rând, datele au arătat că aproximativ trei părți ale subunității aminoacilazei (resturile 6-196 și 307-406) sunt rezistente la tripsină, în timp ce secvența de mijloc (197-306) este digerată eficient de tripsină. Inaccesibilitatea locurilor potențial sensibile la tripsină indică faptul că mare parte a aminoacilazei este încolăcită în două domenii stabile, cuprinzând jumătate din secvența N-terminală și un sfert din cea C-terminală. Cele două domenii sunt asociate puternic, dar nu prin legături covalente. La pH neutru și la temperatura camerei nici chiar SDS nu a putut produce disociere. Singura modalitate de a separa eficient cele două domenii a fost prin HPLC-fază inversă, la pH scăzut sau prin încălzirea complexului cu SDS. Compararea celor două segmente obținute în urma hidrolizei cu tripsină a relevat o similaritate de structură interesantă. Amândouă segmentele conțin motivul secvențial PWW (L,A) (tratat și anterior în textul de față), precedat de patru resturi puternic polare (SERS și respectiv (DDSD)). Predicția structurii secundare prin metoda COMBINE a arătat, cu probabilitate mai mare de 75% că regiunile situate pe ambele părți ale motivelor PWW adoptă o conformație în foaie pliată. Această predicție, remarcabila hidrofilicitate a lanțurilor adiacente motivului și faptul că ele conțin locuri accesibile la tăierea cu tripsină, toate indică faptul că în enzima nativă amândouă secvențele formează bucle la suprafața proteinei. Căutarea în biblioteca de date Swiss-Prot a arătat că un număr

considerabil de proteine conțin acest motiv structural. Multe dintre acestea sunt legate sau asociate cu membrane. Inițial s-a sugerat că în aminoacilază motivul PWW(L,A) mediază asocierea enzimei la membrane. Tendința aminoacilazei de legare la microzomi este atât de izbitoare încât a fost, eronat, propus că poartă o ancoră de legare la membrana lipidică [111]. Interesant este faptul că ambele bucle PWW ale acilazei porcine sunt prezente și la enzima umană [169] dar nu sunt conservate la acilazele bacteriene omoloage. Acest lucru sugerează că buclele PWW au o funcție specială la enzimele animale. În condiții de denaturare, în enzima nativă ca și în fragmentul rezistent la tripsină sunt detectabile trei resturi tiolice, în timp ce în condiții reducătoare, numărul total de cisteine detectabile este de cinci. Din conținutul în cisteină al fragmentelor (rezultate în urma clivării cu tripsină și purificării), este clar că două dintre cisteinele libere (C28 și C115) sunt localizate în domeniul mare N-terminal, în timp ce C341 este inclusă în domeniul mai mic C-terminal. Astfel, reiese că singura punte disulfidică a aminoacilazei I leagă C270 și C292. Amândouă sunt situate în partea de structură sensibilă la tripsină. O comparație a secvenței acilazei porcine cu cea umană arată că doar C48, C115 și C292 sunt conservate la ambele enzime. C270 lipsește la enzima umană, în timp ce C341 este deplasată cu 11 poziții spre capătul N-terminal.

Compararea secvențelor diferitelor enzime a arătat că cele separate de la mamifere sunt omologi distincți ai unui număr de enzime microbiene cu specificitate asemănătoare. Toate aceste enzime (metal-dependente și similare ca mărime), au fost grupate în „familia aminoacilazelor” [112]. Existența unor analogii biochimice, similitudini funcționale și de secvență ale centrului activ la mai multe enzime din clase diferite au sugerat că ele aparțin la o familie nouă de metaloexopeptidaze ce conțin trei secvențe aminoacidice similare, dar diferite de cele stabilite pentru metaloexopeptidaze și/sau metaloendopeptidaze [174,175]. Makarova și Grishin [176] au descris două familii de enzime, numite carboxipeptidaze Zn-dependente și aminopeptidaze-Zn dependente, care sunt vag înrudite dar au dezvoltat independent (în paralel) specificitate de substrat distinctă și plecând de la un strămoș comun.

Îndepărtarea zincului prin dializă în prezență de 1,10-fenantrolină a dus la pierderea totală a activității catalitice [177], aceasta fiind proporțională cu cantitatea de zinc îndepărtată. Cercetătorii chinezi au efectuat și studii privind efectul zincului asupra stabilității structurale a proteinei. Spectrele CD au relevat faptul că au loc modificări de conformație considerabile, cu o scădere de aproximativ 7% în α -helix la apoenzimă, comparativ cu enzima nativă. La adăugarea de ioni de zinc, activitatea s-a restabilit complet, acest lucru sugerând că zincul este implicat în activitatea catalitică. Studiile RMN realizate de Hesse [178], cu înlocuirea Zn^{2+} cu Mn^{2+} , au sugerat că, de fapt, centrul de legare al metalului este la distanță prea mare de centrul de legare a substratului pentru a permite metalului să participe direct la legarea substratului în timpul actului catalitic, fapt confirmat și de studiul cinetic. De aceea a sugerat că ionul metalic joacă doar un rol pur structural. Metalul este coordonat de liganzi imidazol (His) și carboxilat (Asp sau Glu). Zhang [179] a găsit că după îndepărtarea zincului, conținutul în structura secundară ordonată a scăzut, având loc modificarea structurii terțiare, cu dezâncolăcirea catenei la apoenzimă. Stabilitatea față de detergenți a apoenzimei a scăzut substanțial. Concluzia a fost, de asemenea, că zincul ajută la menținerea centrului activ într-o conformație specifică, stabilă. Studiile de denaturare a Acy cu clorură de guanidiniu [180,181] au arătat că sunt necesare concentrații mult mai mici de clorură de guanidiniu pentru inactivarea enzimei decât cele necesare pentru a produce modificări semnificative ale conformației acesteia. Ionul Zn^{2+} are un rol important în menținerea conformației centrului activ [182]. Deși activitatea catalitică a enzimei se menține când zincul este înlocuit cu mangan, în acest caz enzima este mai puțin stabilă decât cea nativă [183]. Totuși, această stabilizare a centrului activ este foarte limitată. Astfel că s-a sugerat că centrul activ al Acy este situat într-o regiune restrânsă, care are flexibilitate conformațională mai mare decât molecula enzimei luată ca întreg. De asemenea, legarea substratului duce la creșterea stabilității conformaționale a centrului activ. Aceste rezultate au fost confirmate și prin studiul denaturării enzimei cu dodecilsulfat de litiu [184]. Procesul de inactivare este independent de

concentrația enzimei, indicând că disocierea dimerului nu are efect asupra vitezei de inactivare, deci nu este limitantă de viteză. La SDS-PAGE s-a observat doar o mică disociere a dimerului, sugerând că la concentrații mici de SDS enzima este încă în formă dimerică. Rezultate similare s-au obținut la inactivarea cu uree, papaină și temperatură.

S-au obținut, în urma studiilor realizate, informații privind resturile de aminoacizi implicate în centrul activ. Conform acestor cercetări în centrul activ sau în apropiere se află un rest de lizină și cisteină [112,185] ca și resturi de aspartat și glutamat [119,186]. Hesse [187] afirmă că Acy conține 6 resturi de cisteină per subunitate. Trei dintre ele sunt accesibile la modificare cu 4-hidroximercuribenzoat. Cinetica reacției a sugerat că numai unul dintre aceste resturi afectează activitatea acilazică. Modificarea apoenzimei cu N-etilmaleimidă reduce total activitatea, fără să afecteze legarea zincului, astfel că s-a putut afirma că sulfhidrilul ce reacționează cu acest reactiv nu este direct coordonat la metal. Alte trei grupări sulfhidril au reacționat cu 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoat), fără ca activitatea enzimatică să fie afectată, deci nu sunt implicate în centrul activ. Bruch [188] și Chen [189] au găsit aproximativ 8 resturi de triptofan per subunitate, dintre care 5-6 sunt accesibile, în timp ce 2-3 sunt îngropate în proteină și probabil implicate în centrul activ sau la menținerea conformației active. Studiile asupra fluorescenței resturilor de triptofan realizate de Reshetzack [190] au confirmat prezența a 8 resturi per subunitate. O inactivare completă a enzimei s-a observat după fotooxidarea a 4 resturi de histidină, sau la modificarea chimică a acestora cu dietilpirocarbonat. Ionul de zinc se pare că protejează resturile de histidină, sugerând că acest aminoacid este implicat în legarea ionului de Zn^{2+} [191].

Informațiile obținute până la acea dată nu au permis să se specifice care dintre resturile de histidină și cisteină sunt implicate în centrul activ. Probabil că un număr din cele 12 histidine și 3 cisteine care sunt conservate la om și porc apar în centrul activ.

Din păcate, poziția exactă a centrului activ nu a fost stabilită pentru nici una dintre enzimele din familia M20. La fel este cazul și pentru carboxipeptidaza G2, singura enzimă M20 pentru care este disponibilă structura cristalină [19].

1.4.2. Structura aminoacilazelor I microbiene

Enzimele de origine bacteriană au prezentat de multe ori o specificitate de substrat diferită de cele de origine animală, având de fapt și o structură diferită. De exemplu enzima termofilă din *Bacillus stearothermophilus*, descrisă de Sakanyan [136] are o secvență doar vag asemănătoare cu cea a altor aminoacilaze, dar un număr de proprietăți tipice acestora: specificitate largă de substrat, masa moleculară a subunității de aproximativ 42 kDa și dependență absolută de prezența unui ion metalic. Alte proprietăți sunt diferite: structura este tetramerică, iar după inactivarea enzimei cu EDTA, activitatea poate fi restabilită cu Co^{2+} , într-o oarecare măsură cu Mn^{2+} , dar nu cu Zn^{2+} . Acest lucru diferă de alți membri ai familiei aminoacilazei, care toți conțin Zn^{2+} ca metal esențial.

O altă aminoacilază termostabilă, tot din *Bacillus stearothermophilus* a fost separată, exprimată pe *E.coli* și caracterizată de către Weiß și colab.[137]. Enzima este dimerică și conține un ion de Zn^{2+} per subunitate, ce poate fi înlocuit cu Co^{2+} , Mn^{2+} și Cd^{2+} . Metalul se pare că joacă un rol predominant în menținerea unei conformații active catalitice. Observațiile lui Sakanyan și colab.[136] cum că numai Co^{2+} , și, în egală măsură Mn^{2+} , au fost în stare să reconstituie activitatea aminoacilazică după dializa față de EDTA nu corespund celor găsite de Weiß și colab.[137]. Constantele aparente de disociere ale metalului date de Sakanyan (sub 1 μM pentru Co^{2+} și 6 μM pentru Mn^{2+}) sunt în același domeniu cu cele obținute de Weiß. Enzima din *B. stearothermophilus* are un comportament neobișnuit în ceea ce privește activitatea la substituirea zincului cu Cd^{2+} . Observațiile făcute întăresc încă o dată ideea unei strânse corelații între enzima microbială și cea animală. Astfel, formele conținând Mn^{2+} și Cd^{2+} ale aminoacilazei porcine sunt mult mai active decât forma nativă cu Zn^{2+} [178]. Ca atare, Weiß consideră că metalul aminoacilazelor nu are un rol catalitic. Acest lucru este

confirmat și de faptul că enzimele cu Zn^{2+} implicat în cataliză au activități scăzute în cazul înlocuirii zincului cu Cd^{2+} . Pe de altă parte s-au observat activități similare la enzimele la care s-a substituit ionul metalic cu un altul, în cazul în care acest metal are doar un rol structural. O altă discrepanță a rezultatelor lui Weiß și Sakanyan se referă la structura cuaternară. Dacă Sakanyan a raportat o structură tetrameră, Weiß a găsit că atât enzima nativă cât și cea fără metal se comportă ca dimeri la gel filtrarea analitică. Este comportamentul și al altor enzime din familia aminoacilazelor (Tabelul 1.8.). Este posibil, totuși ca, în anumite condiții, enzima din *B. stearotherophilus* să se agrege ca tetramer sau chiar în complecși mai mari. Prezența ionului metalic, așa cum rezultă și din spectrele CD, este esențială pentru menținerea unei conformații active. Pierderea ionului metalic duce la o conformație cu o proporție de α -helix mult mai mare.

Tabelul 1.8. prezintă câteva exemple de aminoacilaze microbiene, majoritatea fiind dimere, dar și tetra sau octamere pentru cele produse de *Pyrococcus*, respectiv *Comamonas*. Masa moleculară a monomerului este în jur de 35 N 50 kDa

Tabel 1.8.. Caracterizarea unor aminoacilaze I microbiene

Microorganism	Nr. catene	Masă molec. per catenă kDa	Ion Metal	pH optim	Temperatură optimă	Substrat	Bibliografie
<i>Pseudomonas</i> sp. NS 671	2	45	Mn^{2+}	7,5	40	N-carbamil-L-aminoacid	29, 144
<i>Pyrococcus furiosus</i>	4	42,06	Zn^{2+}	6,5	100	N-acil-L-aminoacid	142
<i>Comamonas testosteroni</i>	8	45	Zn^{2+} (Co^{2+})	6,8	65	N-acil-L-prolină	26
<i>Brevibacterium</i> Sp.	2	50	x	7,5	< 50	Ac. acetamidocinamic	27
<i>Escherichia coli</i>	2	42,345	Zn^{2+}	7	x	N-acil-L-ornitină	28
<i>Variovorax paradoxus</i>	x	x	x	x	x	N-acetil-homo Serin lactonă	62
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	44	Zn^{2+} (Co^{2+})	x	x	Ac.N-acetil-L-glutamic	25
<i>Bacillus stearotherophilus</i>	2	42	Zn^{2+}	7	50	N-acil-L-Alanină	137
<i>Aspergillus oryzae</i>	2	36,6	Zn^{2+}	8,5	x	N-cloroacetil L-aminoacid	150
<i>Bacillus thermoglucosidus</i> DSM 2542	4	43	Zn^{2+}	x	↑	N-acetil-L-Metionină	138
<i>Alcaligenes denitrificans</i> DA 181	2	40	Zn^{2+}	8	65	N-acetil-L-Aminoacid	146, 147
<i>Streptovercillium hachijoensis</i>	x	50-60	x	7,5-8,5	50	N-acil-L-Aminoacid	132
<i>Streptovercillium rimofaciens</i>	x	50-60	x	8-9	60	N-acil-L-Aminoacid	132

x - nespecificat

Din punct de vedere al structurii primare, aminoacilaza microbială din *Pyrococcus*, comparativ cu cele animale, așa după cum se observă din Tabelul 1.7, are un număr ceva mai mic de aminoacizi per monomer, resturile de Cys, Glu, Gln, Ser, Thr și Trp sunt mult mai puține iar cele de Gly și Ile mai multe la cea microbială, comparativ cu cea animală.

1.5. Specificitatea de reacție și de substrat a aminoacilazei I

1.5.1. Specificitatea de reacție

a. Hidroliza N-acetil-aminoacizilor

Marea majoritate a studiilor privind aminoacilaza I s-au realizat urmărind reacția de hidroliză enantioselectivă a N-acil-aminoacizilor. Și studiul de față urmărește, de fapt aceeași proprietate a enzimei, din acest motiv este studiat mai pe larg.

Dar, așa cum pentru alte enzime, cum ar fi lipazele, s-au testat atât reacția directă de hidroliză cât și cea de sinteză, pe trigliceride dar și pe alte tipuri de substraturi; proteazele au fost utilizate pentru sinteza unor dipeptide în solvenți organici, în ultimii ani s-au realizat o serie de studii privind capacitatea aminoacilazei I de a cataliza și alte tipuri de reacție, în alte condiții, nu numai cea care are loc în organismele vii și care este implicată în metabolismul proteinelor și aminoacizilor.

b. Hidroliza dipeptidelor

Având în vedere că dipeptidele pot fi considerate tot amide substituie, ca și N-acil-aminoacizii, s-au realizat o serie de teste privind hidroliza dipeptidelor, deși studiile inițiale cu enzimă microbiană sau porcină nu au relevat această capacitate a aminoacilazei I.

Shou-Cheng și colab. [192] au testat dipeptide ale alaninei cu glicină, alanină, butirină și norvalină (ca aminoacizi N-terminali) în reacția de hidroliză în prezența aminoacilazei I renale porcine. Viteza de reacție a crescut o dată cu creșterea catenei laterale a aminoacidului N-terminal.

Kordel și Schneider [193] au găsit că acilaza porcină este o peptidază la pH 8,5. Dependența de pH și valorile K_m au relevat faptul că numai dipeptidele cu aminoacid N-terminal neionizat sunt substraturi pentru enzimă. Aminoacizii hidrofobi, deprotonați, sunt inhibitori competitivi ai enzimei, triptofanul și norleucina fiind cei mai puternici.

c. Sinteza enantioselectivă a N-acil-aminoacizilor

Dacă hidroliza N-acil-aminoacizilor are loc în mediu apos, sinteza acestora a fost testată în solvenți organici.

Yokoigawa și colab. [194] au studiat sinteza de N-acetil-L-metionină cu aminoacilază (din rinichi de porc) imobilizată pe celită (Hyflosupet-cel), în mediu de acetat de etil și la concentrații diferite de tampon fosfat, între 0 și 5,6%. N-acetil-L-metionina a fost sintetizată cu randamentul cel mai ridicat (aproximativ 90%), la un conținut de apă de 3,2%. Sub această valoare randamentele au scăzut puțin dar, la peste 3,2% apă, randamentul a scăzut drastic. Condițiile optime de reacție au fost pentru un amestec de reacție compus din 100 mM acetat de sodiu, 20 mM D,L-metionină, 1000 unități aminoacilază imobilizată pe celită în 1 ml acetat de etil saturat cu 32 μ l tampon fosfat de sodiu 40 mM (pH 7,0), conținând 0,1 mM CoCl_2 . Temperatura a fost de 30°C iar timpul de incubare 24 ore. N-acetil-L-metionina izolată din mediul de reacție a avut o puritate optică de 100%. S-a izolat și D-metionina cu un randament de 95%, și o puritate optică de 90%. Sistemul a fost testat și pentru sinteza altor N-acetil-L-aminoacizi (alanina, leucina, serina, valina), obținându-se randamente de 80 N 90% și purități optice de 100%. A fost realizată și sinteza α -N-acetil-L-lizinei, dar cu aminoacilază din *A. oryzae*, iar acetatul de etil s-a înlocuit cu dimetilsulfoxid 50%. Randamentul reacției a fost mai mic, de numai 30%.

Acilarea aminoacizilor este specifică grupării α -aminice, față de cea chimică unde se acilează ambele grupări aminice ale lizinei.

Biagini și colab. [195] au testat, de asemenea, obținerea de N-acil-L-metionină din săruri ale acizilor și L-metionină, în prezența aminoacilazei I din rinichi de porc. pH-ul optim a fost de 6,0, sub această valoare enzima se denaturează iar peste valoarea de pH = 6,0 predomină procesul invers de hidroliză. Randamentul reacției a crescut cu creșterea raportului

molar metionină/acetat, atingând un maxim la raportul 10 și a fost de 18%. Dacă s-a trecut de la sistem apos la sistem bifazic (60% tampon fosfat 0,2 M, pH 6,0 și 40% solvent organic hidrofob: cloroform, acetat de etil, etanol, dimetilsulfoxid) s-a obținut un randament de maxim 20-25%, spre deosebire de Yokoigawa [194] care, după cum s-a arătat anterior, a atins randamente de 90%, la o concentrație de 3,2% tampon fosfat 0,04 M, pH 7,0 în acetat de etil. Este drept că cercetătorii japonezi au folosit enzimă imobilizată și la o concentrație de 100 de ori mai mare față de Biagini. În mediu apos nu au detectat sinteză dacă s-au folosit esteri etilici ai acizilor butiric, propionic, caproic ca donori de acil. Acest lucru sugerează că sinteza implică mai degrabă condensare decât transesterificare. Randamentele de reacție au crescut cu lungimea catenei hidrofobe a acidului utilizat la acilare, de la 4% pentru acidul formic la 34% pentru acidul butiric și a scăzut la 20% pentru acidul caproic. N-a avut loc reacția în cazul utilizării α -cetoacizilor ca donori de acil; de asemenea pentru alți aminoacizi în afara metioninei.

Röhm și van Etten [156] au sintetizat N-acetil-L-alanină, viteza de reacție fiind maximă la pH 8,0 N 8,5, în timp ce la pH 6,0 nu a avut loc reacția, lucru confirmat și de Giardina.

Galaev și Svedas [196] au raportat sinteza de N-acetil-glicină și N-acetil-L-alanină la 25⁰C în tampon fosfat 0,1 M, pH 7,5.

Sakota și colab. [176] au sintetizat N-acetil-L-triptofan din D,L-triptofan prin acetilare cu acetat în prezență de aminoacilază (6×10^5 Unități per milimol de triptofan), obținând un randament de 45%.

Astfel, se pare că atât specia de aminoacizi cât și pH-ul tamponului pot afecta reacția de sinteză. În timpul sintezei, centrul activ al enzimei trebuie să se acomodeze atât la gruparea carboxil a acetatului cât și la gruparea aminică a aminoacidului, ori pH-ul mediului influențează ionizarea acestor grupări. Mai mult, tăria ionică se pare că afectează pH-ul optim al sintezei [156].

Studii amănunțite au fost realizate de colectivul Kosarz, Szajani, Boross, Sisak [197,198,199,200] privind comportamentul acilazei porcine în amestecuri bifazice tampon N solvent organic. În tampon apos, enzima se prezintă ca un dimer stabil. La adăugarea de solvent organic enzima disociază, iar monomerul este mai puțin activ. Dimetilformamida (DMF) și dioxanul reduc activitatea acilazei, procesul fiind accentuat la concentrații mici de enzimă [197]. Creșterea concentrației de solvent, ca și timpul de contact solvent-enzimă, duce la inactivarea acesteia [200]. În prezența a 5% DMF procesul de inactivare a avut loc cu viteză măsurabilă ($t_{1/2} = 39$ min), în timp ce la un conținut de 20% DMF enzima și-a pierdut practic activitatea în 50 min. ($t_{1/2} = 13$ min). Valoarea K_m a enzimei a crescut aproximativ de 3 ori cu creșterea concentrației DMF până la 2,6 M, în timp ce V_{max} practic a scăzut la zero [199].

În cazul imobilizării acilazei porcine prin legare covalentă pe Acrylex C 100, stabilitatea la inactivare în solvenți organici a crescut, comparativ cu enzima nativă. Dacă în prezența enzimei native, în mediu de dioxan sau DMF nu a avut loc sinteza de acetil-L-metionină din acetat și L-metionină, în schimb, cu enzima imobilizată, s-au obținut conversii de 55% (în DMF) și 25% (în dioxan), la concentrații de apă de 1%, aceste conversii scăzând până la zero la un conținut în apă de peste 4%. Procesul a depins și de temperatură, conversia crescând la 60% la 50⁰C pentru DMF și mai puțin influențată în dioxan [198].

Manjon și colab [201] au studiat comportamentul acilazei porcine și microbiene (*A. oryzae*) în prezența solvenților organici. Activitatea enzimei în procesul de hidroliză scade cu creșterea hidrofobicității solventului și cu creșterea concentrației acestuia. Enzima microbială se pare că este mai stabilă în prezența solvenților organici decât cea porcine.

d. Transesterificarea și transacilarea stereoselectivă

Cercetători de la Institutul de Chimie Organică Generală din Madrid [202,203,204,205] au testat aminoacilaza din *A. oryzae* pentru catalizarea altor reacții, nu

numai a celei de hidroliză a N-acetil-aminoacizilor, respectiv de sinteză a lor. A rezultat că acilaza acceptă vinilacetatul ca substrat și poate fi folosită pentru acetilarea stereoselectivă și ireversibilă a unor alcooli și amine în diferiți solvenți organici (acetat de vinil, cloroform, acetonitril, tetrahidrofuran, hexan, toluen, clorură de metilen). Printre alcoolii esterificați au fost 1,3-propandiolul ($\eta = 75\%$ pentru compusul monoacetilat, în cloroform), butan-1,3,4-triolul, pentan-1,3,5-triolul. Acilaza a prezentat o selectivitate ridicată pentru gruparea hidroxi primară și mai puțin pentru cea secundară. Dacă s-a utilizat vinilacetat ca solvent, reacția nu a putut fi oprită la stadiul de monoacilare, mai ales dacă s-a utilizat și enzimă în cantitate mare. Acilaza a fost relativ stabilă în acetonitril, solvent înalt polar și hidrofilic, lucru rar la enzime. În acest caz enzima nu a mai prezentat selectivitate pentru alcoolul primar.

Monozaharide nesaturate au fost și ele acetilate în prezența acilazei, dar fără selectivitate pentru o anumită grupare hidroxil. De asemenea, derivați de 3-hidroximetilpiperidină (intermediar în sinteza de inhibitori de trombină) au fost acetilați, ca și N-benzoil-aminoalcooli (în toluen).

Alcooli secundari (derivați ciclohexil și fenil) au fost transesterificați stereoselectiv, în special în toluen cu vinilacetat sau butirat.

Bakker și colab. [206,207] au studiat reacția de transesterificare a unor fenilalcooli secundari (la C_1) cu acetat de vinil, obținând o stereoselectivitate absolută a acilazei pentru izomerul (R), fără să observe inhibiție din partea izomerului (S). De asemenea, au studiat efectul donorului acil asupra vitezei de reacție și stereoselectivității. Vinilbutiratul (fapt confirmat și de Herradon [204]) a prezentat o viteză de reacție dublă, comparativ cu vinilacetatul, dar creșterea catenei radicalului acil a dus la scăderea vitezei de reacție. Vinil acrilatul și crotonatul au reacționat mai slab ca acetatul, fapt atribuit împiedicării sterice datorită inflexibilității esterului α,β -alchenic. Înlocuirea restului vinil cu izopropenil sau metil a dus la scăderea drastică a vitezei de reacție.

Dacă gruparea hidroxil a fost mutată la C_2 față de fenil, sau dacă fenilul a fost înlocuit cu naftil, enzima a devenit mult mai puțin activă [206].

Comparând aminoacilaze de origini diferite, cea din *A. melleus* s-a dovedit mai activă în procesul de transesterificare față de cea din *A. oryzae*. Ambele enzime au prezentat activitate optimă față de vinilbutirat, dar cea din *A. melleus* a fost de două ori mai activă, indiferent de gruparea acil testată [207].

e. Acilarea stereoselectivă a arilalchilaminelor primare

M. Youshko și colab. [208] au acilat diverse arilalchilamine primare cu esteri în mediu de solvenți organici (acetonitril, hexan, dimetoxietan, i-propilmetileter, t-butilmetileter) în prezența aminoacilazei din *A. melleus*, obținând o enantioselectivitate redusă până la moderată. Pentru acest sistem de reactanți, viteza inițială de reacție a crescut cu hidrofobicitatea solventului. În ceea ce privește donorul acil, raportul cat/necat a crescut cu descreșterea activității donorului. Compușii care au avut doar o grupare aminică în structură au fost acilați cu enantioselectivitate moderată. La introducerea unei grupări hidroxil primare, aminoacilarea a fost absolută (nu s-a esterificat și gruparea alcoolică) dar enantioselectivitatea a fost foarte scăzută.

Toate aceste testări de utilizare a enantioselectivității aminoacilazei au ca scop obținerea unor intermediari chirali care să fie folosiți apoi în sinteza unor compuși cu utilizare terapeutică.

f. Hidroliza esterilor

Determinarea fluorimetrică a hidrolazelor este general acceptată ca metodă de analiză datorită vitezei și sensibilității. Wolfbeis și Koller [209] au testat o serie de esteri (acetil, butiril, capriolil și oleil) ai acidului 1-hidroxipiren-3,6,8-trisulfonic (sare trisodică), care se cunoaște că este un compus fluorescent excelent. Acilaza I renală porcine a prezentat activitate de hidroliză față de toți cei patru esteri, maximul înregistrându-se pentru esterul

acetil. Ca atare au propus acest ester pentru determinarea activității acilazei, în special pentru urmărirea fazelor de purificare.

1.5.2. Specificitatea de substrat pentru reacția de hidroliză a N-acetil-aminoacizilor

Aminoacilaza I catalizează hidroliza unui număr mare de N-acil-L-aminoacizi, atât naturali cât și sintetici. Pot diferi atât radicalul aminoacidului cât și tipul de substituent N-acil.

Studiile realizate de-a lungul timpului au relevat faptul că specificitatea de substrat diferă foarte mult de la o aminoacilază la alta, iar clasele de aminoacilaze au fost deja prezentate într-un capitol separat. În acest capitol referirea se face numai la aminoacilaza I. Dar și în acest caz, surse diferite de enzimă, microorganisme sau animale, cât și țesuturi animale diferite, produc izoenzime cu activitate aminoacilazică I, dar cu specificitate de substrat ce poate fi foarte diferită. După cum s-a arătat anterior, și structura acestor enzime este uneori foarte diferită.

Studiile de început, realizate cu aminoacilază I din rinichi de porc de către Birnbaum și colab. [210], au relevat o serie de generalități privind susceptibilitatea N-acil-aminoacizilor de a fi hidrolizați în prezența aminoacilazei I:

- a. Viteza de hidroliză variază cu natura aminoacidului.
- b. Pentru același tip de aminoacid, vitezele de hidroliză cele mai mari sunt obținute pentru N-cloroacetil-aminoacizi.
- c. Pentru aminoacizii cu catenă liniară, viteza de hidroliză crește de la glicină la valină, și apoi descrește o dată cu lungirea catenei. [211]
- d. Aminoacizii ramificați sunt hidrolizați mai încet decât cei cu catenă liniară.
- e. N-acil-D-aminoacizii sunt rezistenți la hidroliză.
- f. Vitezele de hidroliză ale allostereoizomerilor treoninei și izoleucinei sunt diferite.

În Tabelul 1.9 sunt prezentate câteva din rezultatele obținute pe parcursul testelor realizate cu aminoacilaze I din diferite surse, având ca substraturi aminoacizi naturali, sub formă N-acetilată sau cloroacetilată.

Enzima renală porcină prezintă o afinitate mai mare pentru N-acil- α -aminoacizii neutrii, alifatici ca N-acil-alanina, acidul 2-aminobutanoic, valina, leucina, norleucina, acidul 2-aminoheptanoic și metionina [210,214].

Acilaza intestinală porcină prezintă activitate față de metionină, mult mai scăzută față de Ala și Val și, surprinzător, față de Cys. La nivel renal există acilază specializată pentru acest aminoacid. Acilazele (atât renale cât și intestinale porcine) nu prezintă activitate față de Arg, Lys, His N aminoacizi bazici N și față de Asp N aminoacid acid N deci față de aminoacizii mai hidrofilii. Acilaza I intestinală are față de Ala, Val, Asn și Gln activitate mult mai scăzută decât cea renală. Deosebire și mai mare este pentru Glu, acilaza intestinală neprezentând activitate, spre deosebire de cea renală. Se poate afirma că acilaza intestinală are o specificitate de substrat mult mai îngustă decât cea renală [44,213].

Acilaza I renală umană, comparativ cu cea porcină, are activitate relativă mai mare pentru toți aminoacizii testați [168].

N-acetil-L-histidina este hidrolizată *in vitro* de extracte de țesut renal de șoarece, iar la șoarecii cărora li s-a administrat N-acetil-L-histidină, atât acilaminoacidul cât și histidina se acumulează în rinichi [19].

Într-o serie de N-cloroacetilaminoacizi, N-cloroacetil-D,L-valina prezintă viteza cea mai ridicată de hidroliză, iar pe măsură ce se mărește catena laterală, viteza scade. [215]

Pentru acilaza renală, se pare că prezența grupării α -carboxilice este esențială pentru activitatea enzimei. Fu și Birnbaum [216] au testat N-cloroacetil-izopropilamina, N-cloroacetil-D,L-alanilamida și esterul etilic al acesteia, și pentru nici unul din aceste substraturi acilaza I nu a prezentat activitate. În schimb, introducerea unei grupări α -metil la

acidul α -aminoizobutiric, n-butiric, izovalerianic duce la substraturi susceptibile la hidroliză în prezența acestei acilaze.

Tabel 1.9. Specificitatea de substrat a aminoacilazelor I din diferite surse

L-amino-acid	N-derivat	Sursă animală*				Sursă microbiană*				
		a	b	c	d	e	f	g	h	i
Met	acetil	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Ala	acetil	13,2	24,8	70,7	26,9	7,0	260,0	7,0	36,0	118,2
Val	acetil	6,8	12,9	70,7	19,3	42,0	316,0	x	77,0	230
NorVal	acetil	40,5	83,1	x	x	x	x	x	x	x
Leu	acetil	22,3	42,3	71,9	x	76,0	33,0	24,9	9,0	71,9
NorLeu	acetil	59,5	73,7	122,0	x	x	x	x	6,0	x
Ile	acetil	1,5	3,9	x	x	x	x	x	x	x
Allole	acetil	1,0	x	x	x	x	x	x	x	x
Phe	acetil	x	x	7,5	x	197	113	x	x	143,2
Trp	acetil	x	x	ND	ND	80,0	36,6	x	x	92,4
Gly	acetil	x	x	45,1	x	2,0	x	x		49,2
Lys	acetil	x	x	ND	ND	x	x	21,7	x	x
Cys	acetil	x	x	54,8	92,5	x	x	5,9	15	x
Arg	acetil	1,7	4,3	ND	ND	85	0,13	5,4	x	x
Asp	acetil	x	0,01	x	ND	x	3,3	x	x	3,78
Asn	acetil	x	x	51,2	26,9	x	10,0	x	33,0	x
Glu	acetil	12,7	14,1	73,2	ND	19,0	0,33	x	13,0	3,78
Gln	acetil	x	x	63,4	32,2	x	x	15,3	x	x
Tyr	acetil	x	x	x	x	x	120	x	x	x
His	acetil	0,6	2,9	13,4	ND	41,0	0,26	x	x	x
Ser	acetil	x	x	x	x	x	x	4,7	15,0	26,5
Thr	acetil	x	x	33,6	x	x	x	x	x	x
Pro	acetil	x	x	x	ND	x	x	x	x	ND
Ornitină	acetil	x	0,06	x	x	x	x	64,7	x	x
Met	Cl-acetil		x	x	x	x	x	x	x	x
Ser	Cl-acetil	47,9	x	x	x	x	x	x	x	x
Val	Cl-acetil	x	x	x	x	x	333,0	x	155,0	x
Gly	Cl-acetil	x	x	x	x	x	x	7,6	233,0	x
Leu	Cl-acetil	x	x	x	x	x	x	x	287,0	x
Tyr	Cl-acetil	x	x	x	x	x	x	x	75,0	x
Phe	Cl-acetil	x	x	x	x	x	x	x	15,0	x
Trp	Cl-acetil	x	x	x	x	x	x	x	5,0	x
Met	formil	x	x	x	x	4,0	x	105,9	155	x

* Toate activitățile au fost recalulate ca activitate relativă, luând drept etalon (activitate 100) N-acetil-L-metionina

x - nu sunt prezentate datele

ND - activitate nedetectabilă în condițiile specificate de reacție

a. acilază renală porcină, concentrație substrat 16 mM, pH 7,0, temperatură 38⁰C [212]

b. acilază renală porcină, concentrație substrat 17 mM, pH 7,0, temperatură 37⁰C [213]

c. acilază renală umană, concentrație substrat 20 mM, pH 7,0, temperatură neprecizată [168]

d. acilază intestinală porcină, concentrație substrat 0,4 mM, pH 8,0, temperatură 37⁰C [44]

- e. acilază *Streptovericillium rimofaciens*, date neprecizate [132]
- f. acilază *Alcaligenes denitrificans*, date neprecizate [147]
- g. acilază *E. coli*, concentrație substrat 50mM, pH7,5, temperatură 25⁰C [28]
- h. acilază *Pyrococcus furiosus*, concentrație substrat 30mM, pH 6,5, temperatură 100⁰C [142]
- i. acilază *A. oryzae*, concentrație substrat 33 mM, pH 7,5, temperatură 37⁰C [226]

Pentru același aminoacid, creșterea catenei celui de-al doilea substituent alchil la azotul α -aminic (celălalt substituent fiind acetil) duce la scăderea activității acilazei [145].

Fukuda și colab. [24,125] au separat o acilază I din *Pseudomonas diminuta* cu specificitate pentru Glu și substituenți N-acil cu catenă lungă. Enzima a fost activă pentru resturi acil C₁₁ N C₁₈, maximul înregistrându-se pentru acidul pentadecanoil-L-glutamic. Față de alți aminoacizi (Ile, Trp, Thr, Ala) această enzimă nu a prezentat activitate în cazul substituirii cu acil C₈, C₁₀, C₁₂. Activitate mult mai scăzută a manifestat față de lauroil-L-Asp și lauroil-glicină.

Pentru același aminoacid (Phe), Kang și colab. [217] au testat influența lungimii catenei substituentului N-acil, găsind că ordinea susceptibilității la hidroliză (pentru acilaza microbiană) este formil > cloroacetil > propionil > butiril > pentanoil > hexanoil, deci scade cu creșterea numărului de atomi de carbon. Pentru acilaza renală porcină testată susceptibilitatea a fost foarte diferită, comparativ cu cea microbiană, și anume butiril > cloroacetil > propanoil > pentanoil > acetil > hexanoil. Rezultate asemănătoare au obținut și Biagini și colab. [195].

Electronegativitatea grupării acil are un efect predominant asupra reacției de dezacilare catalizată de aminoacilază; vitezele de hidroliză ale N-haloacetil-D,L-aminoacizilor descresc în ordinea: trifluoracetil > fluoracetil > cloracetil > acetil, iar N-tricloracetil-D,L-alanina nu a fost hidrolizată. [214]

În plus, și unele dipeptide, ca glicil-L-alanina, glicil-L-norvalina, L-alanil-L-norvalina și L-norvalil-L-norvalina sunt hidrolizate [218].

N-[3-(2-furil)acriloil]-, N-(tienil-acriloil)- și N-(cinamoil)-aminoacizii sunt substraturi folosite pentru studiul aminoacilazei I deoarece hidroliza lor eliberează produși care absorb intens la 310 - 340 nm, astfel că permit o metodă facilă de determinare a activității acilazei I [219].

Acilaze din eritrocite umane și bovine hidrolizează N-(metoxicarbonil)-L-alanina, N-(etoxicarbonil)-alanina și carbamații corespunzători ai valinei, dar nu și pe cei ai lizinei [220]. A fost determinat și pH-ul optim (7,5) și valoarea K_m (8,2 mM) pentru acilaza renală porcină, pentru substratul N-(metoxicarbonil)-L-alanina.

La nivel renal (șoarece), pe lângă acilaza I, există și o acilază cu specificitate pentru aminoacizii ciclici (Trp, Tyr, Phe, Hys) [221].

Tot din rinichi de șoarece Uttamsingh și colab [222] au separat o acilază I cu activitate față de N-acetil-L-metionină, dar și față de N-acetil-L-cisteină. De asemenea S-alchil-N-acetil-L-cisteine cu substituenți S-alchil scurți (C₀ N C₃) și neramificați s-au dovedit a fi substraturi bune pentru această acilază. Catene alchil mai lungi (> C₃) și ramificate, în schimb, au făcut substraturile nehidrolizabile în prezența acilazei. Analogul cu seleniu al N-acetil-metioninei a fost, de asemenea substrat pentru acilază, dar nu și analogi cu C sau O ai S-metil-N-acetil-cisteinelor.

Cormier și Strehler [223], pentru a obține izomerul L al hidroxilizinei, hidrolizează racemicul de α -cloroacetamino- ϵ -carbобенzoxiamino- δ -caprolactama cu acilază I porcină, obținând un randament de 90%, demonstrând astfel că enzima este activă și față de lactone.

Acilaza serică umană s-a dovedit a fi activă și față de acidul N-cloroacetil- γ -L-glutamil-p-aminobenzoic, substrat utilizat de Szewczuk și Wellman-Bednawska [224] pentru

determinarea activității enzimei în cazul unor bolnavi de hepatită virală, caz în care activitatea enzimei crește, chiar înaintea transaminazelor, fiind un bun indicator al afecțiunilor hepatice.

Telegdi și colab [225] au studiat efectul unor substituenți la catena laterală a N-acil-aminoacizilor asupra activității acilazei renale porcine. Înlocuirea unei grupări metil la capătul lanțului lateral cu o grupare carboxil sau amino cauzează o creștere a valorii K_m (scade afinitatea acilazei pentru aceste substraturi, ca și activitatea catalitică). Esterificarea sau amidificarea grupărilor carboxil introduse duce la creșterea afinității pentru aceste substraturi. Descreșterea capacității de legare se datorează, probabil, împiedicării sterice a grupării ionizate hidratate, sau unei legări neadecvate în complexul E-S, care duce la modificarea conformației enzimei.

Aminoacizii nenaturali optic activi sunt extrem de folositori ca precursori pentru diferite medicamente, chimicale utilizate în agricultură, ca ingrediente alimentare. Yamanaka și colaboratorii [154] au testat aminoacizi ce conțin atomi de siliciu și anume au preparat 3-trimetilsililalanina (TMS-Ala) optic activă utilizând acilaza I. Acest compus poate fi util ca aminoacid hidrofob, mai ales ca un analog al leucinei, datorită similarității dintre structurile lor. Luând ca referință N-acetil-D,L-metionina (activitate relativă 100), au găsit o activitate relativă de 3,0 (cu acilaza renală porcină), respectiv de 1,4 (cu acilaza din *A. melleus*) pentru N-acetil-D,L-TMS-Ala, de 16 ori (respectiv de 26 ori) mai mică comparativ cu N-acetil-D,L-leucina și de 1,96 ori (respectiv 1,36 ori) mai mică, comparativ cu N-acetil-D,L-(4-metilleucina). Condițiile optime de reacție au fost 40°C, pH 7,5; Co^{2+} 0,5 mM, concentrație substrat 200 mM.

Fenilglicina, p-hidroxifenilglicina și 3,5-dihidroxifenilglicina sunt intermediari în obținerea unor antibiotice, dar activ este doar unul dintre izomerii optici. N-acetil-L-fenilglicina este hidrolizată de aminoacilază I din *A. oryzae* [226], iar pentru 3,5-dihidroxifenilglicina a fost testată, cu succes, hidroliza stereoselectivă a N-cloroacetil-derivatului, obținând un randament de separare bun și o puritate optică de peste 99% [227]. Acest compus (izomerul S fiind de 10 ori mai activ) este și un agonist înalt selectiv pentru receptorii glutamatului (fosfoinozitolici).

Derivați de acid 4-fluoroglutamic au un potențial de utilizare ridicat ca substraturi sau inhibitori enzimatici, agoniști sau antagoniști ai receptorilor pentru glutamat. În special acidul L-erythro-4-fluoroglutamic a fost utilizat pentru modificarea agentului antitumoral methotrexate, obținându-se un compus mai puțin toxic. Izomerul L- a fost separat din racemic de către Kokuryo și colab. [228] prin hidroliza stereoselectivă a racemicului de cloroacetil derivat. Protejarea grupării γ -carboxil prin metil-esterificare a fost esențială pentru activitatea acilazei porcine utilizate (fapt ce confirmă rezultatele obținute de Telegdi [225]). pH-ul optim a fost de 6,6. Utilizarea unor esteri etilici sau propilici a dus la scăderea masivă a activității enzimei.

Chenault și colab. [157] au testat hidroliza în cataliza acilazei I a peste 40 de compuși (aminoacizi nenaturali), la care au variat atât structura aminoacidică cât și substituentul acil, obținând rezultate bune pentru majoritatea .

Există un interes considerabil pentru bioincorporarea analogilor de metionină în proteine, La utilizarea selenometioninei (SeMet) se ușurează studiul structurii proteinei, sau elucidarea mecanismului biosintezei proteice. Budisa și colab.[46] au încercat inserarea în structurile proteice a telurometioninei, fapt ce oferă posibilitatea analizei cu raze X a structurii proteinei. Deoarece acetyl-D,L-telurometionina este mai stabilă decât L-telurometionina, în mediul de cultură al bacteriilor a fost adăugat acest amestec racemic. Bacteria a hidrolizat stereospecific doar izomerul L datorită prezenței aminoacilazei, iar L-telurometionina a fost apoi incorporată în proteina a cărei genă a fost transferată pe respectivul microorganism.

Hidroliza mercapturaților (proces important la nivel renal) a fost prezentată separat, la capitolul 1.2.4 ce tratează rolul acilazelor în organismele vii.

1.6. Influența factorilor asupra activității aminoacilazei I, cinetica și mecanismul de reacție

1.6.1. Influența pH-ului asupra activității aminoacilazei I

Având în vedere că enzimele au o structură proteică iar unii dintre aminoacizii componenți prezintă pe catena laterală grupări funcționale ce pot ioniza funcție de pH-ul mediului, este de înțeles de ce concentrația protonilor influențează activitatea enzimatică. În primul rând, ionizarea resturilor de aminoacizi influențează conformația enzimei, deci și a centrului activ, ca și ionizarea grupărilor componente ale acestuia. Dacă substratul este ionizabil, numai o anumită formă a acestuia se va lega în poziția optimă la centrul activ, expunând corect legăturile ce vor fi atacate. În general, enzimele prezintă o curbă a dependenței activității de pH în formă de clopot, și pentru majoritatea enzimelor pH-urile extreme duc la inactivarea totală a enzimei.

Pentru aminoacilaza I, chiar provenind din surse diferite, pH-ul optim este în domeniul neutru (6,5 N 7,5), sugerând că, deși au structuri relativ diferite, ionizarea enzimei, ca și mecanismul de reacție sunt asemănătoare. Câteva exemple sunt prezentate în Tabelul 1.10.

Tabel 1.10. pH-ul și temperatura optimă pentru aminoacilaze I din diferite surse

Nr. Crt	Sursa de enzimă	pH optim	Temperatură optimă	Sursă bibliografică
1	Pyrococcus furiosus	6,5	100	142
2	Escherichia coli	7	x	28
3	Streptomyces sp.	8,3 - 8,5	50	132
4	Alcaligenes denitrifians	7,5 N 8,0	65	147
5	Aspergillus oryzae	7,5	55	232
6	Aspergillus oryzae	7,5	60	233
7	Rinichi de porc	7,5	x	196

Huang și Zhou [229] au studiat modificările conformaționale și activitatea aminoacilazei la pH-uri alcaline. Comparând inactivarea cu modificările de conformație, a rezultat că, la pH-uri sub 12, sunt necesare valori alcaline de pH mult mai mici pentru a inactiva enzima decât pentru a-i modifica conformația. La pH-uri peste 12, deși enzima a fost inactivată și aparent complet denaturată (unfolded), totuși s-a mai păstrat ceva din structura secundară ordonată. La pH 12, prin adăugare de KCl, starea relativ destinsă a enzimei denaturate se modifică într-o stare conformațională compactă prin colapsare hidrofobă, dar nu se formează structuri secundare noi. Scăzând pH-ul de la 12 la aproximativ neutru, enzima destinsă suferă o tranziție conformațională similară. Cei doi cercetători au presupus că intermediarul hidrofob colapsat ar putea fi starea conformațională intermediară între starea nativă și cea destinsă, denaturată.

Fraenkel-Conrat și Harris [192] au studiat influența tipului de substrat asupra stabilității acilazei porcine la pH acid (4,7), în timp. Pentru cloroacilaminoacizi, enzima este mai rezistentă (pierde 50% din activitate după 90 minute la pH 4,7) decât în cazul aminoacilaminoacizilor (pierde 50% din activitate după 60 minute).

Pentru a stabili domeniul de pH în care să poată fi efectuate studiile cinetice, fără riscul inactivării sau denaturării, Henseling și Röhm [119] au studiat stabilitatea și conținutul în Zn^{2+} al aminoacilazei I renale porcine la pH-uri extreme. Sub pH 5,5 enzima devine crescător instabilă. La pH 5,0 a fost suficientă o incubare de 20 minute pentru a-i reduce

activitatea cu mai mult de două treimi (față de activitatea măsurată la pH 7,0). Acest efect de inactivare nu a putut fi înlăturat prin reajustarea pH-ului la neutru, nici prin adăugarea de Zn^{2+} . În urma dializei față de tamponare Mes/NaOH de pH-uri 5,0; 5,5 și 6,0 a rezultat că la pH 6 și 5,5 inactivarea în timp a fost înceată, iar pierderea ionului metalic a urmat inactivarea. La pH 5,0 inactivarea a fost mult mai rapidă decât pierderea zincului. La pH-uri înalte, proprietățile enzimei variază considerabil cu sistemul de tampon utilizat. Tamponare „bune” ca Bicine, favorizează enzima, care are stabilitate bună și turnover mare până la pH 9,5. De asemenea, la dializă față de tamponare la pH 8,5; 9,0 și 9,5 nu s-a observat o pierdere semnificativă de Zn^{2+} după 40 de ore, în timp ce activitățile specifice au scăzut cu mai puțin de 30%.

Parametrii cinetici sunt și ei influențați de pH. În intervalul de pH 6 N 9, valoarea K_m a crescut mai puțin de două ori pentru acetyl-L-alanină și acetyl-L-metionină, dar a fost de 7 ori mai mare pentru acetyl-L-fenilalanină. În cazul acidului acetyl-L-glutamic, valoarea K_m a crescut excesiv, așa încât nu s-au putut obține valori la pH-uri peste 8,0. Forma curbei de dependență K_m/pH sugerează în toate cazurile o singură ionizare cu un pK_a de aproximativ 8,3. Dependența k_{cat}/pH a fost similară pentru toate substraturile cercetate. În domeniul de pH 6,2 N 9, variația valorilor k_{cat} nu a depășit 30%. Pentru acetyl-L-alanină a fost observată o descreștere ușoară la pH peste 7,0, în timp ce valorile pentru acetyl-L-fenilalanină au crescut ușor în acest domeniu.

1.6.2. Efectul anionilor asupra activității aminoacilazei I

În anii dinainte de 1985, toate studiile cinetice privind aminoacilaza au fost realizate în tampon fosfat. Henseling și Röhlm [119] au observat că există o diferență considerabilă a activității acilazei și a comportamentului cinetic când tamponul fosfat a fost înlocuit cu diferite sisteme tampon organice. Pe lângă tampon fosfat, cei doi au studiat aminoacilaza în tamponare ca: 3,3'-dimetilglutarat/NaOH; Mes; Mops și Bicine. În tampon fosfat cu pH < 7,5 s-a observat o creștere puternică a valorii K_m , în timp ce la pH > 7,5 vitezele maxime au descrescut considerabil în fosfat/borat. În Bicine s-au observat valori aproape constante până la pH 9. De asemenea nu s-au observat diferențe semnificative între activitățile măsurate în Mes, Mops și Bicine la nici unul din pH-urile testate. Anioni alții decât fosfat au avut efecte similare. Adăugarea de anioni ca fosfat, clorură, azotat la tamponarele organice („bune”) a dus la obținerea unor profile tip U a dependenței K_m de pH. Comparativ cu valorile în absența anionilor, valorile K_m au fost mai înalte la pH scăzut, dar mai mici la pH 7,5 N 8.

De fapt, fosfatul stabilizează remarcabil enzima. Totuși, din rezultatele obținute de cei doi cercetători, s-a tras concluzia că fosfatul modulează legarea substratului și afectează turnoverul acestuia la pH-uri mai mari de 7,5. Se pare că datele publicate anterior [156,196], ce au prezentat o dependență activitate-pH în formă de clopot, cu maximum între 7 și 8 reflectă, în special, acest efect al fosfatului. Galaev și Svedas [196], care au studiat hidroliza acetyl-D,L-metioninei în tamponare fosfat/borat, au raportat curbe tip clopot pentru dependența V N pH, cu K_m independent de pH între 6 și 9,5, date care sunt opuse celor prezentate de Henseling și Röhlm [119]. Tamponarele „bune” nu interferă cu procesele biologice și prezintă o abilitate de chelare redusă. În aceste tamponare enzima a fost suficient de stabilă la pH-uri între 5,5 și 9.

1.6.3. Efectul temperaturii asupra activității aminoacilazei I

Ca pentru orice reacție chimică, creșterea temperaturii duce la creșterea vitezei de reacție și în cazul celor catalizate enzimatic. Doar că, enzimele fiind proteine, peste o anumită valoare a temperaturii începe denaturarea proteinei și totodată pierderea activității acesteia.

Pentru o perioadă limitată de timp, aminoacilaza I, fie că este microbiană fie că este animală, prezintă un maximum de activitate în intervalul 55 N 65°C (Tabelul 1.10). Excepție face

enzima produsă de *Pyrococcus furiosus*, un microorganism hipertermofil, și care nu prezintă activitate la temperaturi sub 40°C, activitatea maximă înregistrându-se la 100°C. Și acilaza produsă de *Bacillus stearotherophilus* este termofilă, dar în mai mică măsură. Aceasta are o temperatură optimă de cataliză la 70°C, dar timpul necesar pentru pierderea a 50% din activitate este mai mic de 1 minut la 80°C [137].

Stabilitatea la temperatură este, de asemenea diferită, funcție de organismul producător. Acilaza din *P. furiosus* [142] are $t_{1/2} = 25$ minute la 100°C. Cea din *Streptomyces* [132] își păstrează activitatea integrală după o oră la 50°C, dar o pierde aproape complet după o oră la 60°C. Cea din *Alcaligenes denitrificans* este mai stabilă, după o oră la 60°C mai păstrează 80% din activitate. Aminoacilaza I din *A. oryzae* are o activitate remanentă de doar 62,5% după 10 minute la 60°C și de 12,5% după 10 minute la 70°C [165].

Enzima de origine animală este și mai puțin stabilă la temperatură. Acilaza extrasă din rinichi de porc pierde 35 - 40% din activitate după 10 minute la 35°C și devine complet inactivă după 10 minute la 55°C. Se pare că la încălzire enzima dimerică disociază în subunități, mai puțin stabile și active [230].

Chenault și colab. [157] realizează și un studiu comparativ pentru aminoacilazele din rinichi de porc și *Aspergillus oryzae*. La 25°C, în tampon fosfat 0,1 M și pH 7,5 enzima renală își pierde liniar activitatea, ajungând la zero după aproximativ 110 ore. Cea fungică pierde 10% din activitate după 40 de ore și își menține această activitate și după 160 de ore la 25°C.

Tot enzima din *A. oryzae*, în soluție și în prezență de 10% borax și 0,5 mM ZnSO₄, își păstrează activitatea intactă după 3 luni la 25°C [231], demonstrând, încă o dată, rolul stabilizator al boraxului.

Ca atare, pentru utilizarea industrială a acilazei I, se recomandă cea de origine microbiană.

1.6.4. Influența ionilor metalici asupra activității aminoacilazei I

Aminoacilazele I sunt Zn N enzime, dar necesită prezența unui cation divalent (tipic Zn²⁺, dar și Co²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺ sunt efectori în unele cazuri) pentru a atinge o activitate maximă [138,146,150], dar nu întotdeauna [44]. Totuși, în toate cazurile, incubarea în prezență de EDTA duce la pierderea completă a activității, dar aceasta poate fi restabilită prin adăugarea de Zn²⁺. Așa cum s-a prezentat în Cap. 1.4, situsul zincului în aceste enzime nu este cunoscut exact. Atât enzimele reconstituite din *P. furiosus* [142] cât și din *A. oryzae* [146] conțin trei ioni de zinc per subunitate (față de unul la enzima porcină [44]), sugerând că acest grup de enzime reprezintă o nouă clasă de Zn N proteine, care este distinctă de membrii familiei metalohidrolazelor ce conțin 2 atomi metalici per subunitate [109].

Ionul Zn²⁺ poate fi îndepărtat din structura enzimei prin dializă față de agenții chelanți cum ar fi EDTA, 1,10-fenantrolină [167], cu pierderea concomitentă a activității enzimatice. Restaurarea activității este posibilă prin adăugarea de Zn²⁺, dar și de Co²⁺ [191,234]. În urma studiilor de modificare chimică cu dietilpirocarbonat și fotooxidare s-a presupus că resturi de histidină sunt liganzi pentru chelarea ionilor metalici [191]. Alți agenți complexanți ca dietilditiocarbamatul și nitrilotriacetatul sunt mult mai puțin eficienți în acest caz [230]. S-a presupus că acești complexanți, la concentrațiile folosite (1 mM), nu inactivează enzima prin interacțiune directă cu ionul metalic ci prin captarea rapidă a Zn²⁺ disociat de enzimă, prevenind astfel reacția inversă.

Studiile realizate pe acilaza renală porcină [230] au demonstrat că îndepărtarea Zn²⁺ nu alterează proprietățile imunologice ale enzimei. Testul Ouchterlony de imunodifuzie nu a prezentat diferențe semnificative între Zn²⁺-enzimă și apoenzimă. Diferențe semnificative au apărut în ceea ce privește stabilitatea la temperatură, pH și reactivitatea grupărilor SH. Apoenzima are stabilitate la pH mai mică, mai ales pe intervalul 7 N 8, comparativ cu holoenzima. Peste 45°C apoenzima este mai puțin sensibilă la denaturare, față de holoenzima

activă. Reactivitatea grupărilor SH cu reactiv Ellman este afectată considerabil de prezența ionului metalic, apoenzima fiind de aproximativ două ori mai reactivă decât holoenzima.

Reactivitatea enzimei cu Co^{2+} (ion ce a înlocuit Zn^{2+}) a dus la o holoenzimă mai puțin stabilă decât cea cu Zn^{2+} și a fost necesară prezența unei concentrații de ion metalic liber mai mare decât cea stoichiometrică necesară pentru înlocuire și pentru a atinge o activitate maximă [230]. Enzima cu Co^{2+} a prezentat și o specificitate de substrat mai redusă, comparativ cu cea cu Zn^{2+} [183]. Dializa Co^{2+} -acilazei față de tampon fără Co^{2+} a dus la o pierdere de 85% din activitatea inițială după o oră, față de Zn^{2+} -acilază, care a fost stabilă în aceste condiții. Tot Kumpe și colab. [230] au demonstrat că aminoacizii fenilalanina și histidina nu numai că protejează Co^{2+} -enzima la inactivarea cu agenți chelanți, dar produc o activare de trei ori.

Parametrii cinetici (V_{\max} și K_m) pentru Co^{2+} - enzimă sunt similari cu cei ai Zn^{2+} -enzimei native [107], dar cinetica, atât pentru inactivarea cu 1,10-fenantrolină cât și reconstituirea apoenzimei cu cei doi ioni diferă considerabil. Cinetica reacției substratului (cloroacetil-L-alanina) la diferite concentrații ale acestuia și ale inhibitorului au sugerat un mecanism complex de inactivare [182], cu o competiție a substratului și inhibitorului (1,10-fenantrolină) pentru centrul activ. Cinetica de inactivare este monofazică, arătând că formarea inițială a complexului Zn^{2+} -enzimă N1,10-fenantrolină este o reacție relativ rapidă, urmată de o treaptă de inactivare lentă care, probabil, implică o modificare conformațională a enzimei. Prezența Zn^{2+} stabilizează conformația centrului activ, necesară pentru activitatea enzimei.

Pentru Co^{2+} , atât inactivarea cu 1,10-fenantrolină cât și reconstituirea prezintă o cinetică simplă [235], deci s-a presupus că are un singur loc de legare. Wu și Tsou [235] au arătat, de asemenea, că atât acilaza nativă cât și cea reconstituită cu Co^{2+} , sunt inhibate de Zn^{2+} în exces. Și inhibarea și reconstituirea apoenzimei cu Zn^{2+} sunt procese cooperative. Inhibiția cu Zn^{2+} și efectele acestuia asupra fluorescenței acidului 1-anilinaftalin-8-sulfonic legat de enzima nativă indică multiple locuri de legare a Zn^{2+} .

Zhang și Zhou [236] au studiat cinetica reactivării acilazei în timpul reconstituirii apo-aminoacilazei I cu Mn^{2+} și Zn^{2+} . Parametrii cinetici pentru enzimele reconstituite, cât și constantele vitezelor de reactivare au sugerat prezența unui al doilea loc de legare și pentru enzima reconstituită cu Mn^{2+} .

S-au realizat o serie de studii privind efectul diferiților ioni metalici asupra activității aminoacilazelor I, în special a celor microbiene. Din păcate, ca și în cazul efectelor pH-ului și temperaturii, studiile nu sunt uniforme în ceea ce privește substratul folosit, concentrația ionului și condițiile de determinare a activității (pH și temperatură). În Tabelul 1.11 sunt prezentate câteva din studiile realizate, fără a preciza aceste condiții.

Ionul Co^{2+} este un activator în toate cazurile prezentate, indiferent de originea enzimei, microbiană sau animală. Ionul de Zn^{2+} este un activator mai slab decât Co^{2+} . În cazurile în care este inhibitor nu este sigur că nu s-a mers la concentrații mai mari la care într-adevăr apare inhibiția. Ionul Ni^{2+} este activator pentru acilazele din *P.furiosus* și *E.coli*, dar inhibitor pentru celelalte, și nu are efect asupra celei animale. Pentru cazurile testate, Ca^{2+} nu afectează activitatea enzimei. Fe^{2+} este inhibitor puternic pentru acilazele din *Streptomyces* și *A.denitrificans*, dar nu are efect pentru cele din *P.furiosus* și *A.oryzae* [232]. Pentru o altă tulpină de *A.oryzae* [121], cea cu care s-a lucrat în studiul de față, fierul, și bi- și trivalent este inhibitor. Manganul, mercurul, cadmiul, plumbul, staniul, toate bivalente, sunt, în toate cazurile, inhibitori, la fel ca și Al^{3+} . EDTA chelează zincul din enzimă, fiind, fără dubiu, inhibitor.

După cum s-a văzut anterior, ionul Co^{2+} este considerat ca activator al aminoacilazei I, indiferent de proveniența enzimei. Din studiile cinetice realizate, Ianskov și colab. [237], au găsit că, la un raport molar N-acetil-L-metionină / Co^{2+} de 100 / 1, viteza de reacție a crescut de aproximativ 2,25 ori, comparativ cu reacția în absența cobaltului, iar valoarea K_m a descrescut de la 1×10^{-1} M (fără cobalt) la 2×10^{-2} M, ionul Co^{2+} măbind astfel afinitatea pentru substrat.

Tabel 1.11 Influența ionilor metalici asupra activității aminoacilazelor din diferite surse

Ion	P.furiosus [142]	Streptomyces [132]	A.denitrificans [147]	A.oryzae [232]	A.oryzae [233]	E.coli [28]	Intestin porc [44]
-	100	100	100	100	100	100	100
Co ²⁺	140	162	120	147	153	163	128
Zn ²⁺	130	102	61	80	108	77	66
Mg ²⁺	112	107	98	105	147	96	x
Ni ²⁺	175	7	95	42	51	163	100
Ca ²⁺	100	x	x	x	x	x	100
Fe ²⁺	100	17	15	101	72	x	x
Fe ³⁺	x	x	x	45	59	x	x
Cu ²⁺	100	14	5	0	24	x	x
Ca ²⁺	x	72	94	96	x	x	x
Mn ²⁺	x	61	86	25	116	x	x
Hg ²⁺	x	2	0	77	x	x	54
Ba ²⁺	x	x	92	105	x	x	x
Sr ²⁺	x	x	80	105	x	x	x
Cd ²⁺	x	x	16	9	53	46	x
Pb ²⁺	x	x	50	42	x	x	x
Sn ²⁺	x	x	x	58	61	x	x
Al ³⁺	x	x	x	42	x	x	x
Na ⁺	100	x	x	x	x	x	x
K ⁺	100	x	x	x	x	x	x
EDTA	x	x	55	19	27	x	x

x N nu s-a realizat testarea

Ionii metalici au fost sub formă de cloruri. Concentrațiile de ioni au fost variabile, la diferitele surse bibliografice prezentate. Activitatea aminoacilazică este relativă, s-a recalculat, acolo unde nu a fost dată direct, luând drept comparație activitatea în absența ionilor (exceptând cei din tampoanele folosite). Substraturile, deși nu aceleași pentru toate determinările, au fost, în general, N-acetil-aminoacizi.

Giardina și colab. [44] au determinat efectul unor cationi bivalenți asupra activității acilazei I intestinale porcine la diferite concentrații, folosind ca substrat N-furilacrilol-L-metionina. Rezultatele acestora sunt prezentate în Tabelul 1.12.

Tabel 1.12. Activitatea relativă a aminoacilazei intestinale porcine în prezența unor cationi bivalenți [44]

Ion M	Activitate relativă				
	CoCl ₂	ZnCl ₂	NiCl ₂	CaCl ₂	HgCl ₂
-	100	100	100	100	100
10 ⁻³	110	0	100	100	x
10 ⁻⁴	128	66	100	x	x
10 ⁻⁵	120	105	100	x	x
5x10 ⁻⁶	100	126	100	100	x
2x10 ⁻⁶	100	100	x	x	x
10 ⁻⁶	x	x	x	x	54
10 ⁻⁷	x	x	x	x	96

x N nedeterminat

S-a considerat activitatea în absența ionilor ca fiind 100%.

După cum se observă din tabel, Co^{2+} prezintă activare maximă la o concentrație de 10^{-4}M , concentrații mai mici de 10^{-5}M ne mai având efect. Ionul Zn^{2+} , care până la concentrația de 10^{-4}M este inhibitor, chiar total la 10^{-3}M , la concentrații mici (10^{-5} N 5×10^{-6} Molar) este activator. Ionii Ni^{2+} și Ca^{2+} , la concentrațiile testate, nu afectează aminoacilaza, dar Hg^{2+} , chiar la 10^{-6}M , inhibă cu 50% enzima, pe când la concentrații mai mici (10^{-7}M) o lasă neafectată.

1.6.5. Inhibiția aminoacilazei I

Studiile de inhibiție în prezența diferiților compuși au drept scop, în general, identificarea resturilor de aminoacizi implicați în centrul activ al enzimei, ca și lămurirea mecanismului de reacție.

Până în 1997 nu s-au publicat date privind inhibarea de către L-metionină a reacției de hidroliză a unor substraturi sintetice, în cataliza aminoacilazei I. Rezultatele obținute de Giardina și colab. [44], ce au folosit ca substrat N-furilacriloil-L-metionina, au demonstrat că L-metionina, produsul de reacție, acționează ca inhibitor competitiv în acest caz. Reacțiile catalizate enzimatic sunt adesea inhibitate de produșii lor, din cel puțin două motive. În primul rând, produșii au o structură asemănătoare cu unul sau mai multe substraturi și vor concura la legarea la centrul activ. În al doilea rând, disocierea complexului enzimă-produs este un proces reversibil, care, în cazul acilazei, a putut fi demonstrat prin adăugarea la mediul de reacție a L-metioninei și acetatului. Acest ultim argument este în concordanță cu rezultatele obținute la acetilarea metioninei cu acetat (reacția inversă hidrolizei) [196,238], în prezența acilazei renale porcine. Giardina a găsit o constantă de inhibiție $K_i = 3,4 \pm 0,2 \text{ mM}$. Constanta de echilibru obținută de Shviadas și colab. [238] a fost de $3,6 \pm 0,4$ (pentru echilibrul hidroliză - sinteză).

Teoria cinetică a reacției substratului în timpul modificării activității enzimei, descrisă de Tsou [239] a fost aplicată pentru a studia cinetica de inactivare a aminoacilazei cu diverși inhibitori. Wang și colab. [240] au realizat un asemenea studiu în prezența 2-cloromercuri-4-nitrofenolului (MNF). Rezultatele au indicat faptul că acest nou tip de inhibitor produce o inhibiție ireversibilă; cinetica reacției inhibitorului cu enzima este un proces singular exponențial; inhibitorul este de tip complexant noncompetitiv; primul complex EI prezintă încă o activitate catalitică slabă. Astfel s-a presupus că gruparea tiol din centrul activ al enzimei ar putea avea un efect semnificativ în procesul catalitic, dar nu este implicată în legarea substratului.

Se știe că acilaza renală porcine nu conține legături disulfidice. Wang și Zhou [241] au studiat cinetica de inactivare a acilazei cu ditiotreit (DTT) și 2-mercaptoetanol (MET) N compuși utilizați de obicei pentru reducerea punților disulfidice. Rezultatele au arătat că inactivarea acilazei cu DTT și MET este o inhibiție competitivă reversibilă. Îndepărtarea inhibitorului prin dializă a dus la recuperarea completă a activității enzimatice. Rezultatele au arătat, de asemenea, că prezența unei concentrații echimolare Zn^{2+} - DTT oferă o protecție completă a enzimei împotriva inactivării cu DTT. Mai mult, adăugarea unei cantități echimolare de Zn^{2+} cu cea a DTT poate induce recuperarea integrală a activității acilazei, inhibitată de DTT. S-a demonstrat astfel că inactivarea acilazei cu DTT și MET nu se datorează reducerii unor punți disulfidice ci este o inhibiție competitivă reversibilă.

Acilaza renală porcine nu este inhibată nici de fluorura de fenilmetilsulfonil, nici de agenți alchilanți (iodoacetat sau iodoacetamidă). Astfel, un mecanism de reacție, care să includă formarea de acilenzimă prin intermediul unui rest seril sau cisteinil, este exclus [234]. Cele două grupări SH per subunitate acilazică au prezentat reactivitate diferită față de p-hidroximercubenzoat. Modificarea grupării SH mai puțin reactive a inactivat reversibil enzima, sugerând încă o dată situarea unui rest cisteinil în vecinătatea sau în centrul activ al aminoacilazei renale.

Inactivarea produsă de 1,10-fenantrolină (OP) [182,235] a fost prezentată în subcapitolul precedent (1.6.4). Acțiunea OP asupra Zn-enzimelor a fost intens studiată, stabilindu-se că OP inactivează prin chelarea zincului, sau îndepărtarea acestuia și că activitatea enzimei poate fi restabilită prin adăugare de ioni de Zn^{2+} [172,107,119]. OP se leagă la enzimă ocupând coordinața realizată de substrat cu Zn^{2+} din enzimă [60], fiind astfel un inhibitor competitiv. Se produce, ca atare, o modificare conformațională ce distruge starea entactică. Prelungirea contactului cu OP are ca rezultat îndepărtarea Zn^{2+} din enzimă, probabil în forma $Zn^{2+}(OP)_3$. Este posibil ca legarea OP, ca și cea a substratului, să ducă la modificarea conformației propice catalizei. Alți cercetători afirmă că OP este un inhibitor noncompetitiv [167,183].

Acilaza I renală porcină este inactivată și de 2-etoxi-1-(etoxicarbonil)-1,2-dihidrochinolina (EEDQ), un reactiv specific pentru gruparea carboxil. Löffler și Schneider [156] au demonstrat că inactivarea este dependentă de pH, un maxim fiind la $pH\ 6,0 \pm 0,2$. Protecția împotriva inactivării enzimei cu EEDQ a fost realizată cu inhibitori competitivi, cel mai eficient fiind tosil-L-fenilalanina. Aceste rezultate au sugerat că o grupare carboxil este localizată în centrul activ sau în apropiere.

Zhang și colab. [242] au studiat și efectul trifluoroetanolului (TFF) asupra activității și conformației acilazei. S-a observat o descreștere remarcabilă a activității acilazei la concentrații mici de TFF. Reacția de inactivare a fost de ordin întâi și monofazică. Viteza de inactivare a fost mult mai mare (de cel puțin 5 ori) decât cea de modificare a conformației (denaturarea) în special la o concentrație de 10% TFF. Comparând valorile k_E și k_{ES} (constantele de inactivare ale enzimei și ale complexului enzimă-substrat) s-a găsit că valoarea k_E este mult mai mare decât k_{ES} , indicând un efect protector marcant al substratului față de inactivarea acilazei cu TFF. Rezultate similare au fost obținute și la inactivarea cu clorură de guanidiniu (GdmCl) [181]. Deci legarea substratului la enzimă mărește stabilitatea conformațională a centrului activ.

Bai și colab. [180] au găsit că la concentrații de GdmCl mai mari de 2 M, structurile secundară, terțiară și cuaternară sunt complet denaturate. Studiul pe apo-enzimă (fără Zn^{2+}) a dus la rezultate similare. Rezultate anterioare [180] au arătat că îndepărtarea Zn^{2+} din acilază scade extinderea structurii ordonate. Mai mult, compararea modificării conformaționale a holo- și apo-enzimei în timpul denaturării cu GdmCl la concentrații mici (sub 1,0 M) au arătat că apo-enzima este mult mai sensibilă decât holo-enzima, indicând faptul că ionul Zn^{2+} stabilizează structural acilaza. Se pare că intermediarul de pe parcursul denaturării este un dimer inactiv.

Concluzii asemănătoare au fost trase de către He și colab. [243, 184] în urma studiului denaturării cu dodecilsulfat de sodiu, respectiv de litiu.

Au fost înregistrate numeroase cazuri de infecții cu fungi la unele persoane cu imunitate scăzută. Se știe că aceste fungi produc aminoacilază I, deci inhibitori specifici pentru enzima fungică ar putea avea un rol potențial farmaceutic. Pornind de la faptul că în culturi de *Streptomyces* au fost identificați L-lactat și L-β-fenillactat ca inhibitori necompetitivi reversibili ai aminoacilazei I din *A. oryzae* și din rinichi porcin, Tamura și colab. [244] au testat o serie de α-hidroxiacizi (D,L-R-CH(OH)COOH unde R este etil, n-propil, butil, pentil, hexil) care au inhibat cele două enzime cu o cinetică noncompetitivă reversibilă. Potența inhibitoare ($-\log K_i$) a crescut cu creșterea hidrofobicității grupării R. Cele două enzime eucariote au prezentat preferință distinctă pentru gruparea ligand α-alchil. Enzima fungică a fost inhibată de L-β-fenillactat de o mie de ori mai puternic decât enzima animală. Dintre L- și D-izomerii α-fluoro-β-fenilpropionatului, configurația L a substituentului α a fost importantă pentru inhibiția ambelor enzime. Pentru acilaza fungică afinitatea pentru α-fluoro- și α-hidroxi-n-caproat a scăzut brusc dacă pH-ul a crescut de la 7 la 11, în timp ce enzima porcină și-a menținut afinitatea pentru acest ligand în mediu bazic. Aceste rezultate au sugerat că acilaza I din *A. oryzae* prezintă un rest acid ce interacționează cu gruparea hidroxil sau fluorul, în timp ce enzima animală ar avea un rest bazic care

recunoaște substituției α -. Dar nu s-a putut preciza locul în care ligandul (inhibitorul) se leagă la enzimă.

1.6.6. Cinetica și mecanismul reacției de hidroliză/sinteză a N-acetil-aminoacizilor în cataliza aminoacilazei I

Bibliografia privind mecanismul cinetic al rezoluției amestecurilor racemice de N-acetil-D,L-aminoacizi în cataliza L-aminoacilazei este vastă. Aceste mecanisme sunt foarte complexe, chiar reversibile și pot include diferite forme de inhibiție prin substrat sau produși [196,245,246]. Discuția privind datele cinetice în corelație cu specificitatea de substrat a fost prezentată în capitolul precedent (cap.1.5.).

Pentru a testa reversibilitatea reacției, Bódalo și colab. [247] au folosit ca substraturi D,L-fenilalanina, respectiv valina și acetat de sodiu, în prezența acilazei I renale porcine, detectând după 6 ore N-acetil-L-fenilalanina (respectiv N-acetil-L-valina) în amestecul de reacție. Au studiat și conversia N-acetil-L-fenilalaninei (respectiv N-acetil-L-valinei), la diferite concentrații și în prezența ionului Co^{2+} . Rezultatele obținute, în acord cu cele prezentate în literatură, au dus la concluzia că rezoluția optică al N-acetil-D,L-aminoacizilor urmează o cinetică Michaelis-Menten reversibilă, inhibată non-competitiv de substrat și competitiv de ambii produși. Expresia vitezei de reacție ce descrie un asemenea proces este următoarea (1):

$$v = \frac{dC_p}{dt} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{C_{SL} + C_{SDO}}{K_{IS}}} \times \frac{C_{SL} - \frac{C_p^2}{K_{eq}}}{K_M \left(1 + \frac{C_{AA}}{K_{IAA}} + \frac{C_{Ac}}{K_{IAC}}\right) + C_{SL}} \quad (1)$$

Produsul nu a fost adăugat la începutul reacției în nici unul din experimente, astfel încât concentrația celor doi produși a rămas identică de-a lungul reacției. Deoarece atât aminoacidul cât și acetatul sunt inhibitori competitivi, constantele lor de inhibiție pot fi grupate conform expresiei (2):

$$\frac{1}{K_{IP}} = \frac{1}{K_{IAA}} + \frac{1}{K_{IAC}} \quad (2)$$

iar expresia vitezei de reacție, prin înlocuire devine (3):

$$v = \frac{dC_p}{dt} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{C_{SL} + C_{SDO}}{K_{IS}}} \times \frac{C_{SL} - \frac{C_p^2}{K_{eq}}}{K_M \left(1 + \frac{C_p}{K_{IP}}\right) + C_{SL}} \quad (3)$$

Datele experimentale au fost prelucrate în sensul că un set presupus de constante cinetice s-au înlocuit în expresia (3). Utilizând metoda Runge-Kutta de ordinul trei s-a integrat numeric ecuația vitezei. Deoarece concentrațiile inițiale ale produsului și substratului sunt cunoscute, poate fi folosită o metodă de integrare numerică bazată pe valorile inițiale. După ce s-au realizat calculele pentru toate curbele experimentale, s-au comparat concentrațiile produșilor, experimentale și calculate. S-au obținut diferite seturi de constante prin metoda simplex, iar setul care a minimalizat valoarea lui σ a fost considerat ca fiind soluția. Deoarece s-au utilizat diferite concentrații de enzimă pentru rezoluția ambilor aminoacizi, s-a minimalizat k_2 în locul lui V_{\max} . Cele două constante sunt proporționale; $V_{\max} = k_2 \cdot [\text{Enz}]$. Calculele au fost făcute cu un program Fortran 77.

În timpul procesului de minimalizare K_{IP} a fost crescut până când termenul inhibiției de produs nu a mai avut efect asupra valorii vitezei. Cu alte cuvinte, efectul inhibiției de produs a fost automat eliminat din setul de constante; astfel, expresia vitezei ce descrie rezoluția N-acetil-D,L-aminoacizilor pentru cele două experimente realizate a devenit:

$$v = \frac{dC_p}{dt} = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{C_{SL} + C_{SDO}}{K_{IS}}} \times \frac{C_{SL} - \frac{C_p^2}{K_{eq}}}{K_M + C_{SL}} \quad (4)$$

Constantele calculate pentru cele două sisteme sunt prezentate în Tabelul 1.13.

Tabel 1.13. Valorile constantelor cinetice pentru cele două sistemele experimentale [247]

Constantă	N-acetil-D,L-fenilalanină	N-acetil-D,L-valină
k_2	2,3 mmol.min ⁻¹ (mgE) ⁻¹	21,35 mmol.min ⁻¹ (mgE) ⁻¹
K_M	2,38 mM	11,12 mM
K_{eq}	241 mM	681 mM
K_{IS}	463 mM	3831 mM

Au fost obținute curbe de conversii teoretice și experimentale concordante. Erorile relative medii au fost de 5,0 și respectiv 2,9%. Modelul cinetic descris a fost astfel adecvat pentru a descrie rezoluția optică a N-acetil-D,L-aminoacizilor în cataliza aminoacilazei I în cazul fenilalaninei și valinei, dar s-a presupus că același model poate fi aplicat și altor α -aminoacizi, utilizând alte valori pentru constantele cinetice.

Tot Bódalo și colab. [248] au determinat constantele cinetice și ecuația vitezei de reacție pentru sistemul N-acetil-D,L-butirină / aminoacilază I renală porcină.

În urma studiilor realizate, și Ötvös și colab. [249] au concluzionat că viteza reacției de hidroliză a N-acil-D,L-aminoacizilor în cataliza acilazei I urmează o cinetică Michaelis-Menten. Mecanismul se crede că are loc printr-un atac nucleofil asupra carbonului carbonilic din gruparea acilamino, într-un mod asemănător cu hidroliza chimică. În ciuda unui număr mare de date cinetice cunoscute, totuși nu s-au tras prea multe concluzii privind relația dintre structura substratului și eficiența catalitică. Acest lucru se datorează, probabil, dificultății de a aplica metodologia din chimia fizică organică la sisteme în care interacțiunile sunt complicate de natura eterogenă și topologică a bioreceptorilor. Astfel, Ötvös a arătat că, pentru o serie de derivați ai N-acil-L-norvalinei, constantele de specificitate pot fi prevăzute dacă se ia în considerare orientarea spațială a substituentului acil [250].

De un și mai mare interes este observația lui Birnbaum [216] că vitezele de hidroliză ale N-acetil-aminoacizilor, în cataliza acilazei I renale porcine, se corelează cu un parametru ce măsoară efectul polar al restului aminoacidului. Relația bifazică observată este atribuită dependenței reacției de hidroliză atât de efecte electronice cât și sterice. Totuși, nu este clar de ce viteza de hidroliză a fost prezentată ca fiind crescătoare pe măsură ce abilitatea de a ceda electroni a catenei laterale crește, contrar cu mecanismul acceptat [249]. Mai mult, în timp ce derivații cu hidrogen în poziția α și cu un rest aminoacidic voluminos prezintă o corelare bună cu influențele sterice, derivații α -metilici prezintă o împrăștiere semnificativă.

Denton [251] a revizuit datele prezentate de Birnbaum [216]. Din parametri fizico-chimici și vitezele de hidroliză a unui număr mare de acetilaminoderivați [216,249,252], folosind analiza de regresie multiparametrică, au stabilit o expresie pentru viteza de reacție. În acord cu alte date prezentate [218], au propus că specificitatea aminoacilazei este, în principal de natură cinetică, cu câteva excepții. Corelația constantelor catalitice cu parametrul steric Taft a fost în acord cu mecanismul stabilit [249].

Birnbaum a sugerat că interacțiile dintre regiunile polare ale substratului și enzimei sunt importante pentru stabilirea complexului Michaelis [216]. În acord cu aceasta, s-a sugerat că substratul se leagă la enzimă prin legături de hidrogen la nivelul grupării aminice [218]. A fost propus un model al centrului activ în care donorul pentru legătura de hidrogen este o grupare tiol a unui rest de cisteină [234]. Această legătură este întărită de interacțiunea electrostatică dintre gruparea carbonil amidică și ionul de Zn^{2+} situat în apropiere, care crește susceptibilitatea grupării C=O la atacul nucleofil [234]. Identitatea nucleofilului rămâne neclară, deși s-a sugerat participarea unui HO^- sau a unei ape [253]. Denton [251], în urma studiului cu aminoacizi α -substituiți, crede că topologia centrului activ este de așa natură încât poate să susțină grupări α - CH_2CH- într-o conformație fixă, înaintea hidrolizei. Acești derivați pot prezenta un profil steric minimal a doi β -atomi de hidrogen în centrul activ al enzimei. Aceasta se adaugă la o interacțiune sterică dintre atomul de hidrogen γ și centrul de legare, lucru necesar completării închiderii conformaționale. Această imobilitate a substratului reduce interacțiunile sterice dintre restul aminoacidic și nucleofil. Înlocuirea unui atom de hidrogen cu unul de clor (în cloroacetyl-aminoacizi) crește electrofilicitatea carbonului carbonilic, crescând susceptibilitatea la atacul nucleofil, în acord cu mecanismul stabilit. Contrar analizei lui Birnbaum [216], totuși, efectul electronic al grupărilor din α și a celor acil nu par să influențeze semnificativ activitatea substratului. Acești substituenți au un efect electronic limitat, fiind în primul rând grupări alchil și sunt la distanță de locul reacției. S-a sugerat, astfel, că enzima își modifică structura pentru a se acomoda la substraturi α -metil substituite și astfel restul aminoacidic să adopte o conformație asemănătoare cu derivatul α -hidrogen substituit. Gruparea α -metil este astfel efectiv îngropată în centrul activ și oferă o rezistență sterică minimă la apropierea nucleofilului. De asemenea, centrul activ este localizat într-o zonă a enzimei care se poate acomoda bine la catene laterale cu până la 5 atomi de carbon, contrar supozițiilor anterioare [211,216].

2. Imobilizarea aminoacilazei I

2.1. Metode generale de imobilizare a enzimelor și celulelor

Multe procese utilizate de oameni mimează natura, și imobilizarea enzimelor nu este o excepție. Toate enzimele native intracelulare par să fie legate de membrana celulară sau localizate în vecinătatea tip gel a organitelor.

Sistemele enzimatice celulare variază mult de la două sau mai multe enzime independente ce acționează secvențial până la complexe multienzimatice ce constau din agregate enzimatice strâns legate sau subunități reglatoare, și care își pierd activitatea după separare [166].

În condiții naturale, microorganismele tind să crească în agregate atașate la suprafețe solide sau să formeze filme microbiale (biofilme) pe diverse materiale.

Utilizarea unei enzime singulare purificate poate fi de dorit pentru modelarea unor reacții sau pentru procese biotehnologice, dar în foarte multe cazuri acest lucru este asociat cu dificultăți practice (stabilitatea enzimei în primul rând, costurile de purificare). De aceea, utilizarea întregii celule sau a unei părți din aceasta ce conține enzima dorită poate fi avantajoasă, în special când sunt implicate procese complexe. Mai mult, se pune problema biomasei și a apelor reziduale implicate în procese la scară mare, ca și costul izolării și purificării enzimei. Toate acestea pot fi prohibitive. Activitatea specifică redusă a celulelor întregi și un potențial selectiv redus sunt adesea balansate de costurile mai reduse și de simplitatea procesului.

Prin imobilizare se urmărește legarea enzimelor de anumite suporturi (polimeri organici sau anorganici) în scopul recuperării și refolosirii lor. Imobilizarea enzimelor prezintă o serie de avantaje:

- utilizarea repetată a enzimei;
- desfășurarea procesului în instalații semicontinue și continue;
- evită impurificarea produsului de reacție cu enzima sau produșii ei de descompunere;
- mărește stabilitatea în timp a enzimei;
- permite folosirea de soluții diluate de substrat etc.

2.1.1. Clasificarea metodelor de imobilizare

Termenul de enzime imobilizate include:

- enzime modificate într-o formă insolubilă în apă
- enzime solubile utilizate în reactoare echipate cu membrane ultrafiltrante, care rețin enzima în interiorul reactorului
- enzime a căror mobilitate a fost restrânsă prin atașarea la o altă macromoleculă, compusul rezultat fiind insolubil în apă.

Chibata și colab. [254] prezintă o modalitate de clasificare bazată pe interacțiunea dintre enzimă și suportul utilizat pentru imobilizare.

Johnson clasifică, de asemenea, metodele de imobilizare a enzimelor în funcție de tipul de legătură ce se stabilește între suportul insolubil și enzimă [255].

Klein [256] prezintă metodele de imobilizare a celulelor în funcție de tipul de legare celulă-suport.

Kennedy și Cabral [257] încearcă să combine natura interacției responsabilă pentru imobilizare și natura suportului (Figura 2.1)

2.1.2. Suporturi pentru imobilizarea enzimelor

Suportul este un component extrem de important pentru performanțele pe care le va dovedi enzima imobilizată. Un suport bine ales poate să crească stabilitatea operațională a enzimei.

Deși este recunoscut că nu există un suport universal, există totuși o serie de caracteristici pe care trebuie să le îndeplinească orice suport ales pentru imobilizare: suprafața specifică mare, permeabilitate, caracter hidrofil, insolubilitate, stabilitate mecanică, fizică și chimică, rigiditate mare, formă și dimensiune potrivită a particulelor, rezistența la atac microbial, să poată fi regenerat [9].

Înainte de selectarea pentru testare cu o anumită enzimă trebuie cercetate cu grijă proprietăți ale suportului, cum sunt: suprafața, morfologia, configurația, compoziția, modificările suferite de-a lungul tehnicilor de imobilizare și apoi a celor de utilizare a complexului.

Pentru clasificarea suporturilor trebuie ținut cont atât de natura lor chimică (organică sau anorganică) cât și de morfologia lor (poroși sau neporoși).

În general suporturile neporoase prezintă dezavantajul major că au suprafața specifică foarte mică și astfel aria disponibilă pentru cuplarea enzimei este limitată. Pentru a crește încărcarea cu enzimă pot fi folosite particule foarte fine sau fibre. Dar în acest caz intervin alte probleme: particulele foarte fine sunt greu de îndepărtat din mediul de reacție; în coloane împachetate apar căderi de presiune mari; în pat fluidizat debitele sunt limitate. Dar prezintă unele avantaje: problemele de difuziune ale compușilor solubili pot fi înlăturate sau reduse.

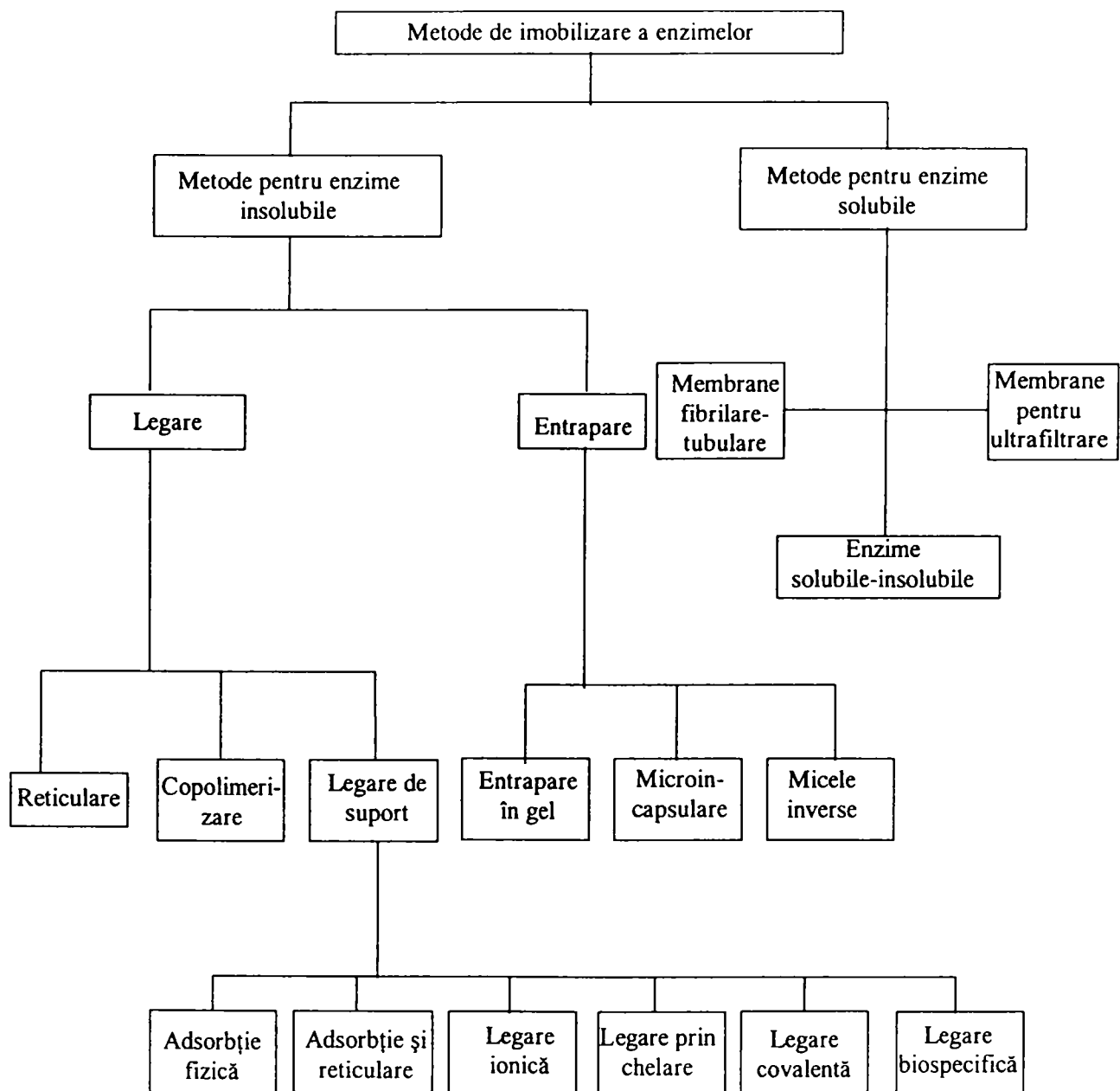


Figura 2.1. Metode de imobilizare a enzimelor [257]

Suporturile poroase (organice sau anorganice) au suprafața specifică per unitate de greutate foarte mare, ceea ce permite o încărcare mare cu enzimă și astfel le face ideale pentru imobilizarea enzimelor. Un mare dezavantaj al acestor suporturi constă însă în faptul că cea mai mare parte din suprafața disponibilă pentru enzimă este internă, ceea ce implică probleme de difuziune substraturi N produși.

O clasificare a suporturilor în funcție de natura lor chimică este prezentată în Tabelul 2.1.[9]

Tabel 2.1. Clasificarea chimică a suporturilor utilizate pentru imobilizarea enzimelor [9]

Suporturi organice	Suporturi anorganice
<u>Polimeri naturali</u> Polizaharide - celuloză - amidon - dextran - agar și agaroză - alginat - carrageenan - chitină și chitosan Proteine - collagen - gelatină - albumină - mătase Materiale tip carbon (cărbune activ)	<u>Minerale</u> - cleiuri attapulгите - bentonită - kieselghur - piatră ponce
<u>Polimeri sintetici</u> - polistiren - poliacrilați și polimetacrilați - poliacrilamidă - hidroxialchil metacrilați - glicidil metacrilați - pe bază de anhidridă maleică - polivinil și polialil - poliamide	<u>Materiale sintetice</u> - sticlă neporoasă - sticlă cu pori controlați - oxizi metalici cu pori controlați - metale

2.1.3. Metode de imobilizare a enzimelor

Imobilizarea unei enzime, adică atașarea ei la un suport insolubil în apă, presupune stabilirea unor interacții între grupările funcționale ale materialului suportului și grupările funcționale externe (adică cele localizate la suprafața moleculei proteice) ale enzimei. Prin aceste interacții, indiferent de natura lor, sunt afectate, în fapt, legăturile intramoleculare ale enzimei și prin aceasta și centrul de legare a substratului, respectiv centrul catalitic activ [258]. Alegerea suportului, respectiv a metodei de imobilizare trebuie făcută cu foarte mare grijă pentru a nu afecta centrul activ al enzimei. Ar fi indicat să se cunoască grupările funcționale care participă la centrul activ al enzimei, legăturile pe care le pot da, respectiv compușii care le pot bloca.

Legarea enzimei la suport poate să nu afecteze centrul catalitic activ, dar prin atașarea la suport, accesul substratului la acest centru să fie îngreunat sau împiedicat total.

De aceea alegerea metodei de imobilizare și a tipului de suport nu este simplă. Metoda se poate stabili doar experimental și întotdeauna rămâne un spațiu foarte mare pentru mai bine. Din acest motiv și metodele de imobilizare, ca și suporturile sunt foarte variate [254,255].

S-au pus la punct patru tehnici generale de fixare a enzimelor pe suporturi solide:

- a) Fixare prin adsorbție pe suporturi inerte sau schimbători de ioni
- b) Fixare prin incluziune, care se realizează prin închiderea enzimei în gel sau microcapsule
- c) Fixare chimică prin legături covalente
- d) Fixare prin legare ionică

2.1.3.1. Fixare prin adsorbție

Este prima metodă utilizată pentru imobilizarea enzimelor. Nellson și Griffin în 1916 au imobilizat invertaza (beta-D-fructofuranozidaza) prin adsorbție pe oxid de aluminiu. Adsorbția se bazează pe forțele van der Waals care se stabilesc între enzimă și suprafața materialului solid, acest material nefiind funcționalizat specific pentru legare covalentă.

Procedeul constă în amestecarea enzimei cu suportul solid, în anumite condiții, urmată de o perioadă de contact apoi de separarea preparatului enzimatic insolubil prin centrifugare sau filtrare.

Conformația enzimei în urma insolubilizării rămâne aproape complet neafectată, deoarece nu sunt implicate în adsorbție grupări reactive.

Adsorbția enzimei este dependentă de o serie de factori ca: pH-ul, natura solventului, tăria ionică, concentrația enzimei și a suportului solid, temperatura.

O influență majoră a cantității de enzimă adsorbită pe suportul solid o are concentrația de enzimă expusă pe unitatea de suprafață a suportului în timpul imobilizării. Activitatea crește cu creșterea concentrației enzimei. Se atinge, asimptotic, o valoare de saturație, după care, la concentrații mai mari de enzimă, activitatea specifică scade.

Atât timpul cât și temperatura sunt factori importanți în adsorbția enzimelor, mai ales în cazul suporturilor poroase, când difuzia devine un factor important. Imobilizarea poate fi realizată într-un timp scurt dacă temperatura este mai ridicată. Totuși, temperaturile ridicate sunt contraindicate deoarece duc la denaturarea proteinei.

Dezavantajul major al acestei metode este că forțele de legare dintre enzimă și suport sunt în general slabe, astfel încât enzima este ușor desorbită în timpul utilizării. Schimbări ale pH-ului, tăriei ionice, temperaturii, tipului de solvent în timpul utilizării produsului insolubilizat, pot cauza desorbția parțială sau totală a enzimei de pe suport. Acest fapt face ca unele enzime imobilizate să fie active doar o perioadă scurtă de timp, metoda imobilizării prin adsorbție nefiind adecvată pentru cazul în care se dorește o exploatare îndelungată a produsului.

Adsorbanți utilizați sunt: alumină, cărbune activ, cleiuri, collagen, sticlă, kieselghur, hidroxiapatită.

2.1.3.2. Fixare prin legare ionică

Legarea ionică este o metodă veche și simplă de imobilizare a enzimelor. Se bazează mai ales pe legăturile ionice dintre proteina enzimă și suporturile solide care conțin grupări schimbătoare de ioni. În practică, atât legăturile ionice cât și cele van der Waals se formează în același timp. Principala diferență între adsorbția fizică și legarea ionică este tăria legăturii dintre enzimă și suportul solid. Forțele de legare rezultate (interacțiuni ion-ion) sunt mai puternice decât cele stabilite prin adsorbție fizică.

Datorită caracterului ionic al legăturii enzimă-suport și a condițiilor blânde de imobilizare, apar puține schimbări conformaționale, obținându-se astfel preparate cu retenție mare a activității enzimatică.

Cel mai frecvent, schimbătorii de ioni utilizați sunt de natură organică, având grefate grupări schimbătoare de ioni. De asemenea, se utilizează și suporturi anorganice, mai ales silica, grefată cu aceleași grupări schimbătoare de ioni sau altele similare.

Polimerii organici cei mai utilizați sunt derivați de polizaharide, mai ales celuloză și

dextran și polimeri sintetici, bazați pe polistiren.

În funcție de grupările schimbătoare de ioni, pot fi clasificați în anioniți sau cationiți, adică pot schimba anioni Cl^- , HO^- etc, cu resturi anionice ale enzimei aflată în soluție, sau cationi H^+ , Na^+ , etc, cu cationi din soluție (grupări cationice ale enzimei).

Pentru prepararea anioniților, se pot grea pe suport grupări amino, guanidino, amine cuaternare (DEAE, TEAE, ECTEOLA- etc.), iar în cazul cationiților, grupări fosfat, sulfat și carboxil (PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , $-\text{COO}^-$).

În Tabelul 2.2 sunt prezentați câțiva dintre cei mai uzuali schimbători de ioni.

Tabel 2.2. Schimbători de ioni utilizați pentru imobilizarea enzimelor

Anioniți	Cationiți
DEAE-celuloză	CM-celuloză
AE-celuloză	Celuloză fosfat
TEAE- celuloză	CM-Sephadex
DEAE-Sephadex	SP-Sephadex
QAE-Sephadex	Dextran-sulfat
DEAE-Bio-Gel A	Amberlite IRC-50
Amberlite IRA 93	Amberlite IRC-200
Amberlite IRA 94	
Amberlite IRA 910	
Amberlite IRA 938	

2.1.3.3. Fixarea prin incluziune - entraparea enzimei în gel sau microcapsule

Metoda entrapării se bazează pe includerea enzimei în rețeaua unui polimer sau în membrane semipermeabile, suficient de strâns pentru a preveni desprinderea proteinei, dar să fie permisă difuzia substratului (lor) și a produșilor.

Această metodă diferă de metodele de cuplare chimică prin aceea că enzima nu se leagă de rețeaua gelului sau membrană. De aceea poate fi aplicată la entraparea oricăror enzime, sau alți biocatalizatori, celule și organite cu diferite mărimi și proprietăți. Se obține o dezactivare mică a produsului biologic, comparativ cu metodele chimice de cuplare.

Metoda se poate subdiviza în entrapare în gel sau fibre și microincapsulare.

Entraparea în gel

Metoda implică entraparea enzimei în interiorul spațiilor interstițiale ale unor geluri polimerice reticulate, insolubile în apă. Rețeaua polimerică se poate obține din monomeri, precursori oligo sau polimerici, prin schimbarea factorilor ce influențează solubilitatea ca: solventul, temperatura, tăria ionică și pH-ul, avându-se în vedere reacția de reticulare.

Cel mai de utilizat este gelul de poliacrilamidă. Procedul pentru formarea poliacrilamidei se bazează pe polimerizarea radicalică a acrilamidei, realizată în soluție apoasă care conține enzima și un agent de reticulare, de obicei N,N-metilen-bis-acrilamidă (BIS). Polimerizarea este condusă, de obicei, în absența oxigenului, la temperatură joasă (între 10-25°C) pentru a preveni denaturarea termică a enzimei în timpul operațiunii. Polimerizarea este inițiată cu persulfat de potasiu ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) sau riboflavină și este catalizată de beta-dimetilamino-propionitril (DMAPN) sau N,N,N,N-tetrametilendiamină (TEMED). Blocul de gel rezultat poate fi tăiat mecanic în particule cu anumite dimensiuni. Totuși, aceste geluri sunt puțin rezistente mecanic și au o rețea deschisă cu o distribuție largă a dimensiunii porilor. Aceste dezavantaje pot fi depășite prin optimizarea gradului de reticulare.

Microincapsularea

Enzimele pot fi imobilizate în interiorul unor microcapsule, preparate din polimeri organici. Membranele ce includ enzimele sunt semipermeabile pentru substrat și produs.

Avantajele acestei metode includ suprafața foarte mare de contact dintre substrat și enzimă într-un volum relativ mic și posibilitatea reală de a imobiliza câteva enzime diferite într-o singură treaptă, fie că enzimele sunt solubile sau au fost imobilizate anterior printr-o altă metodă.

Dezavantajul principal este că metoda nu poate fi aplicată în cazul substraturilor cu greutate moleculară mare, iar câteodată are loc inactivarea enzimei în timpul procesului de imobilizare, sau enzima poate fi incorporată în membrana capsulei.

2.1.3.4. Fixare chimică prin legături covalente

Acest tip de imobilizare se bazează pe formarea unor legături covalente între enzimă și suport. Selectarea condițiilor pentru imobilizare este mai dificilă ca în cazul celorlalte metode. Condițiile de reacție necesare sunt relativ complicate și de obicei nu sunt blânde.

Ca și în cazul reticulării, legarea covalentă este puternică astfel încât se obțin preparate enzimatiche stabile, care nu pierd enzima în soluție, chiar în prezența substratului sau în soluții cu tărie ionică ridicată.

Este important ca aminoacizii esențiali pentru actul catalitic să nu fie implicați în legătura covalentă cu suportul. Acest lucru nu este prea ușor de realizat și enzimele imobilizate prin această tehnică, în general, își pierd activitatea. Această problemă poate fi evitată dacă enzima este imobilizată în prezența unui inhibitor competitiv sau a substratului.

Marea varietate a reacțiilor de legare și a matricelor cu grupări funcționale, capabile de cuplare covalentă, sau susceptibile la activare pentru a da asemenea grupări, face ca această metodă să aibă o aplicabilitate generală la imobilizarea enzimelor.

La alegerea unei metode pentru imobilizarea covalentă a unei enzime trebuie ținut cont de trei factori principali:

- grupările funcționale ale proteinei - să fie adecvate pentru legarea covalentă în condiții blânde;
- reacțiile de cuplare între enzimă și suport;
- suporturile funcționale - să fie potrivite pentru imobilizare;

2.1.4. Metode de imobilizare a celulelor [256,259]

Enzimele se clasifică în două mari categorii:

- extracelulare, dacă sunt eliberate din celule în mediul de creștere
- intracelulare, dacă sunt reținute în celule pe parcursul cultivării acestora.

Pentru a imobiliza enzimele intracelulare, acestea trebuie să fie extrase și izolate din celule. Adesea asemenea enzime sunt instabile și în multe cazuri nu sunt potrivite pentru uz practic. În plus, operațiunile de extracție și purificare sunt scumpe. Astfel, pentru a evita costul, durata și complicațiile implicate la o extracție și purificare a enzimei, cu rezultat adesea nesatisfăcător din punct de vedere al randamentului și mai ales pentru a evita instabilitatea enzimei active, se procedează la imobilizarea întregii celule și utilizarea ei ca atare pe post de catalizator, având toate avantajele enzimei imobilizate. Ca și în cazul enzimei imobilizate și utilizarea celulelor imobilizate la scară industrială a fost aplicată la începutul anilor 1970 de către Chibata și colaboratorii [254].

Avantajele utilizării întregii celule imobilizate sunt multiple. Sunt eliminate procedurile lungi, complicate și costisitoare pentru extracția și purificarea enzimelor. Enzimele celulare sunt gata organizate în ordinea cerută de fluxul metabolic. De asemenea pot fi evitate problemele legate de instabilitatea enzimelor.

Pentru reacțiile enzimatiche care necesită utilizarea cofactorilor sau coenzimelor, acestea sunt deja prezente în celule și astfel se evită necesitatea coimobilizării acestora și regenerării lor.

Astfel, este de preferat utilizarea celulelor imobilizate, mai ales pentru reacții degradative sau de sinteză care necesită energie și cofactori scumpi.

O clasificare generală a metodelor de imobilizare utilizate în cazul celulelor este prezentată în Figura 2.2 [260].

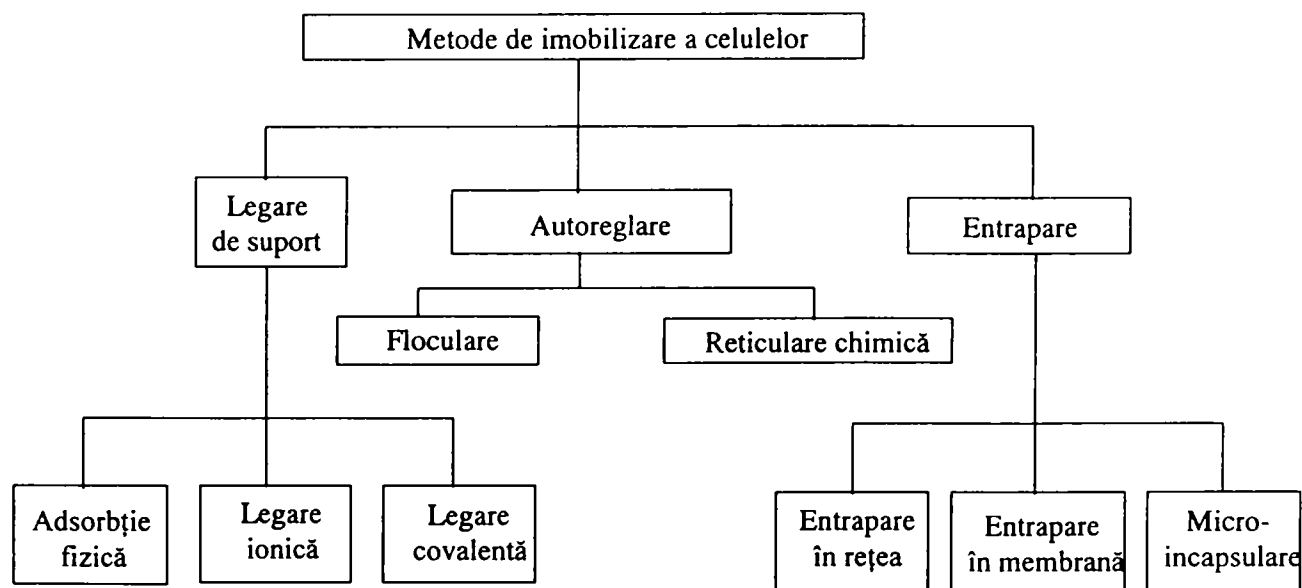


Figura 2.2 Clasificarea metodelor de imobilizare a celulelor [260]

2.2. Metode de imobilizare a aminoacilazei I

În anii 1950 N 1970 Chibata și colab. [261] au utilizat aminoacilaza fungică pentru producerea industrială a unor L-aminoacizi. Această metodă a fost una dintre cele mai avantajoase procedee pentru producerea industrială a aminoacizilor. Totuși, reacția enzimatică a fost realizată prin procedeul în baie, prin incubarea unui amestec ce conținea substratul și enzima solubilă. Astfel, procedura a prezentat unele dezavantaje la aplicarea industrială. De exemplu, pentru a izola L-aminoacidul din amestecul de reacție a fost necesar să se îndepărteze enzima prin modificare de pH sau temperatură, chiar dacă mai rămânea enzimă activă, pentru că nu exista o procedură potrivită pentru a o izola din amestec, în vederea recirculării. În plus, a fost necesară o procedură complicată de purificare pentru a îndepărta enzima rămasă și pigmentii coloranți care contaminau preparatul enzimatic. Rezultatul a fost o reducere a randamentului de obținere a L-aminoacidului.

Pentru a depăși aceste dezavantaje și a îmbunătăți metoda enzimatică, Chibata și colab. au pornit un studiu intens pentru găsirea unei metode optime de imobilizare a aminoacilazei I și apoi de utilizare a imobilizatului într-o coloană, cu exploatare în flux continuu. Au utilizat o serie de metode de imobilizare (prezentate în Cap. 2.1) ca adsorbția fizică [166,262,263,264], legarea ionică [265], legarea covalentă [266], reticularea și entraparea. Rezultatele acestor imobilizări sunt prezentate în Tabelul 2.3 [261]

Tabel 2.3. Randamente de imobilizare ale aminoacilazei prin diferite metode [261]

Metodă de imobilizare și suport	Aminoacilază nativă (unități) ¹	Aminoacilază imobilizată	
		Activitate (unități) ¹	Randament imobilizare (%)
Adsorbție fizică			
oxid de aluminiu acid	1210	13	1,0
oxid de aluminiu neutru	1210	10	0,8
Legare ionică			
DEAE-celuloză	1210	668	55,2
ECTEOLA-celuloză	1210	293	24,2
TEAE-celuloză	1210	623	51,5
DEAE-Sephadex A-25	1210	713	58,9
DEAE-Sephadex A-50	1210	680	56,2
Legare covalentă			
PAB-celuloză diazotată	1210	64	5,3
Enzacryl AA diazotat	1210	44	3,6
Sticlă arilamino diazotată	1210	525	43,4
Celuloză CNBr-activată	1210	12	1,0
Sephadex CNBr-activat	1210	15	1,2
Cloroacetil-celuloză	1210	137	11,3
Bromoacetil-celuloză	1210	339	28,0
Iodoacetil-celuloză	1210	472	39,0
Reticularea suportului			
Glutaraldehydă	1440	8	0,6
Hexametilendiizocianat	1440	23	1,6
Reticularea enzimei			
Glutaraldehydă	1440	211	14,7
Toluen diizocianat	1440	18	1,3
Entrapare în rețea			
Gel de poliacrilamidă	1000	526	52,6
HPMCP-DEAE ²	1000	190	19,0
Microincapsulare			
Nylon	1000	360	36,0
Poliuree	1000	150	15,0
Etilceluloză	1000	104	10,4

¹ O unitate enzimatică este definită drept cantitatea de enzimă care eliberează 1 μmol de L-metionină per oră la 37°C.

² Derivat dietilaminoetil de ftalat de hidroxipropiometil-celuloză.

Au găsit astfel că trei tipuri de preparate imobilizate, obținute prin legare ionică pe DEAE-Sephadex, legare covalentă pe iodoacetilceluloză și entraparea în gel de poliacrilamidă au fost relativ favorabile din punct de vedere al randamentului de imobilizare, al activității și stabilității. Metodele de imobilizare sunt prezentate succint în referința bibliografică [166]. Totuși, pentru operarea industrială într-un proces enzimatic continuu, a fost necesară satisfacerea mai multor condiții. Astfel, au fost comparate caracteristicile celor trei aminoacilaze imobilizate (prezentate în continuare în Cap. 2.3) și s-a ales preparatul imobilizat pe DEAE-Sephadex ca fiind cel mai avantajos pentru producția industrială a L-aminoacizilor deoarece: a) prepararea este ușoară; b) activitatea este ridicată; c) stabilitatea

este ridicată și d) este posibilă regenerarea enzimei imobilizate deteriorate. Comparând costurile de producție a L-aminoacizilor prin procedeele în baie cu enzimă nativă și prin procedeul continuu cu aminoacilază imobilizată pe DEAE-Sephadex, s-a găsit că procedeul continuu are un cost cu mai mult de 40% mai scăzut [267].

2.3. Caracterizarea aminoacilazei I imobilizată

Pentru cele trei preparate aminoacilazice imobilizate alese pentru studiu, s-a determinat în primul rând activitatea (prezentată în Tabelul 2.3) dar și activitatea relativă, luând ca etalon activitatea aminoacilazei native, datele fiind prezentate în Tabelul 2.4 [261].

Tabel 2.4. Activitatea relativă a aminoacilazei imobilizată pe diferite suporturi

Metodă de imobilizare	Activitate relativă*
<u>Legare ionică</u> DEAE-Sephadex	42-74
<u>Legare covalentă</u> Bromoacetilceluloză Iodoacetilceluloză	35 40-50
<u>Entrapare</u> Gel de poliacrilamidă	50-60

* Activitatea aminoacilazei native este considerată ca fiind 100

Comparând aceste activități, enzima entrapată prezintă valoarea cea mai ridicată, dar studiul ulterior, ca și randamentul de imobilizare ceva mai scăzut, au făcut ca, totuși, enzima legată ionic pe DEAE-Sephadex să fie preferată pentru procedeul industrial.

Informații asupra schimbărilor proprietăților enzimatică cauzate de imobilizare sunt utile nu numai în aplicarea sistemelor imobilizate, dar și pentru elucidarea relațiilor structură-funcție și a mecanismelor reacției enzimatică.

Din aceste motive au fost studiați o serie de factori care influențează activitatea aminoacilazei imobilizate.

2.3.1. Influența pH-ului

Deoarece enzimele sunt de natură proteică, activitatea lor catalitică este puternic afectată de pH-ul mediului apos. Unele enzime prezintă o deplasare a pH-ului optim comparativ cu enzima nativă, altele nu. În Tabelul 2.5 este prezentat pH-ul optim al aminoacilazei imobilizate pe diferite suporturi [261], iar în Figura 2.3 dependența vitezei inițiale de reacție de pH pentru enzima nativă și imobilizată pe DEAE-Sephadex A-25 [232]:

Tabel 2.5. pH-ul optim al aminoacilazei imobilizate [261]

Metoda de imobilizare	pH optim	
	enzima nativă	enzima imobilizată
<u>Legare ionică</u>		
DEAE-celuloză	7,5	7,0
DEAE-Sephadex	7,5	7,0
<u>Alchilare (covalentă)</u>		
iodoacetyl-celuloză	7,5	8,0
<u>Entrapare</u>		
Poliacrilamidă-gel	7,5	7,0
<u>Legare diazo (covalentă)</u>		
Enzacryl AA	7,0	7,5-8,0

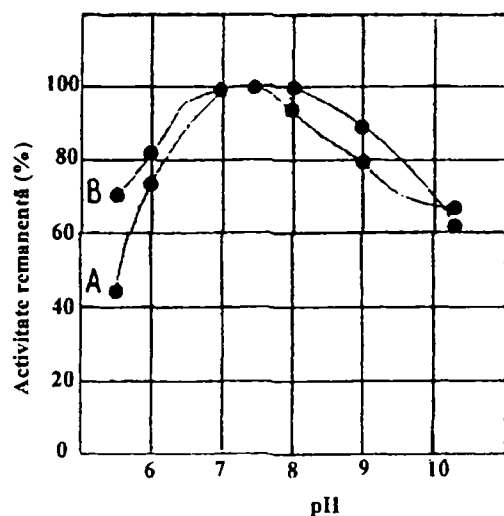


Figura 2.3. Dependența de pH a vitezei inițiale de reacție pentru sistemul N-acetil-L-metionină / aminoacilază [232]

A - enzimă nativă

B - enzimă imobilizată

În cazul legării ionice și al entrapării în gel de poliacrilamidă, pH-ul optim se deplasează cu 0,5 unități spre domeniul acid, la legarea covalentă spre domeniul bazic.

2.3.2. Dependența de temperatură

Activitatea catalitică a enzimelor este dependentă de temperatură ca și în cazul catalizatorilor chimici ordinari, dar activitatea este pierdută peste anumite limite ale temperaturii datorită denaturării enzimelor proteice.

A. Temperatura optimă [261]

Cercetătorii raportează că temperatura optimă crește la imobilizarea aminoacilazei prin legare ionică pe DEAE-celuloză și DEAE-Sephadex și includere în gel de poliacrilamidă și scade la imobilizarea prin alchilare pe iodoacetylceluloză, comparativ cu temperatura optimă a aminoacilazei native, fapt ce se observă în Figura 2.4.

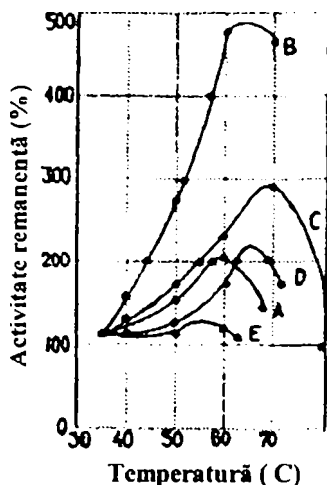


Figura 2.4. Efectul temperaturii asupra vitezei de reacție [261]

Substrat: N-acetil-D,L-metionină,
timp de reacție - 30 minute

- A - aminoacilază nativă
- B - DEAE-celuloză-aminoacilază
- C - DEAE-Sephadex-aminoacilază
- D - poliacrilamidă-aminoacilază
- E - iodoacetilceluloză-aminoacilază

B. Stabilitatea la încălzire [261]

Activitatea catalitică a enzimelor crește cu ridicarea temperaturii. Totuși, enzimele sunt structuri proteice și sunt, în general, instabile la temperatură. De aceea reacțiile enzimatică nu pot fi conduse practic la temperaturi înalte. Dacă stabilitatea enzimei este crescută prin imobilizare, potențialul de utilizare al acestor enzime va fi mai mare.

După cum se vede din Tabelul 2.6 și Figura 2.5 stabilitatea la temperatură a aminoacilazei imobilizate crește considerabil comparativ cu enzima nativă.

Tabel 2.6. Stabilitate la încălzire a aminoacilazei imobilizate [261]

Metodă de imobilizare	Tratament		Activitate remanentă (%)	
	Temp (°C)	Timp (min)	E. nativă	E. imob.
<u>Legare ionică</u>				
DEAE-celuloză	70	10	5	80
DEAE-Sephadex	70	10	5	90
<u>Alchilare</u>				
iodoacetil-celuloză	70	10	5	50
<u>Entrapare</u>				
Gel-poliacrilamidă	70	10	5	30

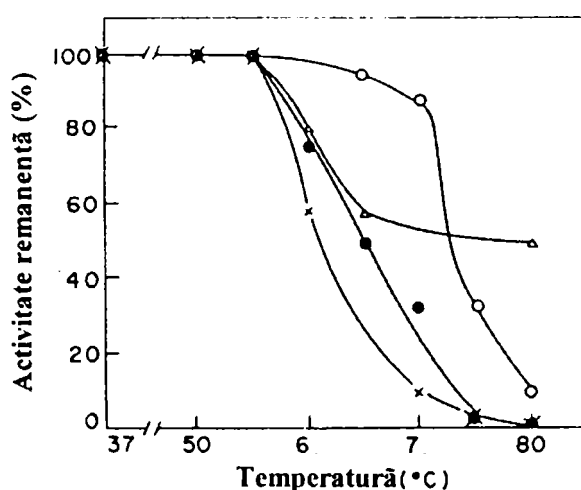


Figura 2.5. Stabilitatea la încălzire a aminoacilazei (timp 10 min) [261]

- x - aminoacilază nativă
- - DEAE-Sephadex-aminoacilază
- ♦ N iodoacetilceluloză-aminoacilază
- - poliacrilamidă-aminoacilază

Din nou, stabilitatea cea mai mare la temperatură o prezintă DEAE-Sephadex A-25-aminoacilaza.

C. Stabilitatea la stocare [261]

Stabilitatea la stocare este un factor important de care trebuie ținut seama în aplicarea enzimelor imobilizate.

S-a testat stabilitatea la stocare a aminoacilazei prin legare ionică pe DEAE-Sephadex în soluție de acetyl-D,L-metionină 0,2 M și în apă distilată la diferite temperaturi. S-a găsit că 60% din activitatea inițială a fost menținută după o stocare de 150 de zile la o temperatură de 4°C în ambele soluții, în timp ce activitatea remanentă după stocare 150 zile la 25°C a fost de 50% în soluție de acetyl-D,L-metionină și 10 % în apă distilată.

D. Stabilitatea la utilizare [261]

Stabilitatea la utilizare a aminoacilazei imobilizate este unul dintre cei mai importanți factori ai succesului sistemului imobilizat.

În Tabelul 2.7 se prezintă stabilitatea la utilizare a aminoacilazei imobilizate.

Tabel 2.7. Stabilitatea la utilizare a aminoacilazei imobilizate pe diferite suporturi [261]

Metodă de imobilizare	Condiții de utilizare		Activitate remanentă (%)
	Temp (°C)	Timp (zile)	
<u>Legare ionică</u> DEAE-Sephadex	50	30	60-70
<u>Reticulare</u> Sticlă poroasă+glutaraldehydă	37	78	50
<u>Entrapare</u> gel-poliacrilamidă	37	20	90

Este mai greu de tras o concluzie, de vreme ce testarea nu s-a făcut în aceleași condiții, totuși, având în vedere stabilitatea bună a imobilizatului prin legare ionică și mai ales faptul că suportul se poate reutiliza prin încărcare din nou cu enzimă, face ca acest schimbător de ioni să fie preferat.

2.3.3. Energia de activare a aminoacilazei imobilizate [261]

Cercetătorii au preparat aminoacilază imobilizată prin diferite metode și au determinat energia de activare. După cum se vede în Tabelul 2.8, energia de activare a aminoacilazei imobilizate prin legare ionică pe DEAE-celuloză și DEAE-Sephadex crește comparativ cu enzima nativă, în timp ce la imobilizarea aminoacilazei prin alchilare cu iodoacetylceluloză și prin includere în gel de poliacrilamidă s-a observat descreșterea energiei de activare.

Tabel 2.8. Energia de activare a aminoacilazei imobilizată pe diferite suporturi [261]

Preparat enzimatic	Energie de activare kcal/mol
Aminoacilază nativă	6.700
Aminoacilază imobilizată	
<u>Legare ionică</u>	
DEAE-Celuloză	11.100
DEAE-Sephadex	7.640
<u>Alchilare (legare covalentă)</u>	
iodoacetilceluloză	3.900
<u>Entrapare</u>	
gel-poliacrilamidă	5.700

2.3.4. Constante cinetice [261]

Deoarece la imobilizare pot avea loc schimbări în conformația enzimei și se poate schimba afinitatea dintre enzimă și substrat, investigarea constantelor cinetice pentru enzimele imobilizate este foarte importantă.

A. Constanta Michaelis [261]

În Tabelul 2.9 sunt prezentate constantele Michaelis ale aminoacilazei imobilizată pe diferite suporturi, comparativ cu cea a aminoacilazei native:

Tabel 2.9. Constantele Michaelis ale aminoacilazei imobilizate [261]

Metodă de imobilizare	Km (mM)	
	Enzima nativă	Enzima imobilizată
<u>Legare ionică</u>		
DEAE-Celuloză	5,7	3,5
DEAE-Sephadex	5,7	8,7
<u>Alchilare (legare covalentă)</u>		
iodoacetilceluloză	5,7	6,7
<u>Entrapare</u>		
gel-poliacrilamidă	5,7	5.0

În cazul imobilizării prin legare ionică valorile Km obținute diferă. Imobilizatul pe DEAE-celuloză a prezentat o afinitate mai mare pentru substrat comparativ cu enzima nativă, pe când cel pe DEAE-Sephadex a avut o afinitate mai mică. Același lucru s-a întâmplat și la legarea covalentă pe iodoacetilceluloză (afinitatea a scăzut). Includerea în gel de poli-acrilamidă modifică cel mai puțin valoarea Km (scade, deci afinitatea crește).

Oricum, în nici unul dintre cazurile de imobilizare prezentate, valorile Km nu se modifică semnificativ, deci imobilizarea nu a afectat prea mult afinitatea enzimei pentru substratul său.

B) Viteza maximă de reacție [261]

A fost măsurată, de asemenea, viteza maximă de reacție pentru aminoacilaza imobilizată. După cum se vede din Tabelul 2.10, valorile obținute au fost apropiate de cele ale enzimei native, deci imobilizarea nu a afectat semnificativ proprietățile cinetice ale enzimei.

Tabel 2.10. Viteza maximă de reacție a aminoacilazei imobilizate [261]

Metodă de imobilizare	V_{\max} $\mu\text{mol/h}$
Aminoacilază nativă	1,52
Aminoacilază imobilizată <u>Legare ionică</u> DEAE-Sephadex	3,33
<u>Alchilare (legare covalentă)</u> iodoacetilceluloză	4,65
<u>Entrapare</u> gel-poliacrilamidă	2,33

2.3.5. Stabilitatea față de reactivi [261]

Imobilizarea enzimelor produce, de asemenea, schimbări în stabilitatea lor față de reactivi. Câteva exemple sunt prezentate în Tabelul 2.11.

Se observă că aminoacilaza imobilizată nu este inhibată de uree, ci activată. De asemenea este activată de guanidină și n-propanol. Mecanismul de activare nu este clar, dar poate fi datorat schimbării conformației proteinei, de exemplu conversia structurii rigide a aminoacilazei imobilizate într-o structură mai flexibilă, potrivită pentru acțiunea catalitică.

Tabel 2.11. Stabilitatea aminoacilazei imobilizate prin legare ionică pe DEAE-Sephadex față de diferiți reactivi [261]

Reactiv	Activitate remanentă (%)	
	Enz. nativă	Enz. imobiliz.
6 M-uree	9	146
2 M-guaminidă	49	110
1% SDS	0	25
24% n-propanol	55	110

În reacțiile enzimaticе, la utilizarea unui preparat enzimatic brut, inactivarea enzimei este adesea accelerată de contaminarea cu enzime proteolitice.

Totuși, după cum se vede din Tabelul 2.12, la aminoacilaza imobilizată prin legarea ionică, rezistența la enzime proteolitice, comparativ cu enzima nativă, este crescută.

Tabel 2.12. Stabilitatea aminoacilazei imobilizate prin legare ionică față de enzime proteolitice [261]

Suport	Enzimă proteolitică	Activitate remanentă (%)	
		Enz. nativă	Enz. imobil.
DEAE-celuloză	tripsină	23	33
	Pronază P	68	53
DEAE-Sephadex	tripsină	23	87
	Pronază P	68	88

2.3.6. Influența ionilor asupra activității aminoacilazei

Activitatea enzimei poate fi influențată (activare sau inhibiție) de prezența în mediul de reacție a unor ioni metalici sau substanțe organice. Efectul acestora a fost studiat în condițiile standard de desfășurare a reacției de hidroliză cu diferența că s-au adăugat diferiți ioni metalici în locul ionului de Co^{2+} . Pentru comparație, s-a luat activitatea enzimei în absența ionilor metalici. În Tabelul 2.13 sunt prezentate efectele ionilor metalici și altor inhibitori asupra reacției enzimatică [232].

Tabel 2.13. Efectul ionilor metalici și a altor efectori asupra activității aminoacilazei nativă și imobilizată [232]

Efactor	Activitate relativă	
	Aminoacilaza nativă	Aminoacilaza - DEAE-Sephadex-A25
-	100	100
Ag^+	82	62
Ba^{2+}	105	100
Ca^{2+}	96	101
Cd^{2+}	9	27
Co^{2+}	146	143
Cu^{2+}	0	0
Fe^{2+}	101	102
Hg^{2+}	77	51
Mg^{2+}	105	100
Mn^{2+}	25	54
Ni^{2+}	42	39
Pb^{2+}	42	14
Sn^{2+}	58	98
Sr^{2+}	105	101
Zn^{2+}	80	64
Al^{3+}	42	102
Fe^{3+}	45	101
monoiodacetat	88	50
paracloromercuri benzoat	98	85
cloroacetofenona	100	97
EDTA	19	4
KCN	100	100
NaF	100	99
NaN_3	100	90

Comparând datele prezentate se observă că activatorul cel mai eficace este ionul de Co^{2+} . Ionii: Cd^{2+} , Mn^{2+} , Sn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} sunt inhibitori destul de slabi. Ionii metalelor grele (Ag^+ , Hg^{2+} , Pb^{2+}) și compușii cu sulf sunt inhibitori puternici. În cazul imobilizării prin legare ionică, Ag^+ , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} inhibă mai puternic, comparativ cu enzima nativă, probabil prin acest tip de imobilizare enzima poate forma mai ușor coordinațe cu ionii respectivi, având ca efect o modificare mai drastică a conformației, cu pierderea activității. În schimb crește stabilitatea față de Mn^{2+} și Sn^{2+} . Imobilizarea nu apără enzima de efectul complexant al EDTA, aceasta, ca și în cazul celei native, pierzând zincul ionic din structură și ca atare

activitatea.

Studiind comparativ proprietățile enzimaticе ale aminoacilazei fixate pe diferite suporturi, cercetătorii japonezi [165,166,232,261] au stabilit că cele mai bune proprietăți pentru aplicarea industrială le are aminoacilaza fixată pe DEAE-Sephadex și respectiv pe iodoacetilceluloză (Tabel 2.14).

Tabel 2.14. Comparație între proprietățile enzimaticе ale diferitelor aminoacilaze imobilizate

Proprietăți	Aminoacilaza nativă	Aminoacilaza imobilizată		
		Leg. ionică (DEAE-Sephadex)	Leg. covalentă (iodoacetil-celuloză)	Entrapare (gel-acrilamidă)
pH optim	7,5-8,0	7,0	7,5-8,5	7,0
temp. optimă (°C)	60	72	55	65
energ. de activare (Kcal/mol)	6,9	7,0	3,9	5,3
Co ²⁺ optim (mM)	0,5	0,5	0,5	0,5
Km (mM)	5,7	8,7	6,7	5,0
V _{max} (μmol/h)	1,52	3,33	4,65	2,33
Stabil. termică (Activ. reman. %)				
60°C, 10 min	62,5	100	77,5	78,5
70°C, 10 min	12,5	87,5	62,5	34,5

pH-ul optim al DEAE-Sephadex-aminoacilazei este mai mic cu 0,5-1,0 unități pH față de enzima nativă. Deplasarea poate fi explicată prin redistribuirea legăturilor de hidrogen între sarcinile pozitive ale DEAE-Sephadexului și mediul apos înconjurător. Deplasarea pH-ului este de asemenea prezentă în cazul poliacrilamid-aminoacilazei, dar motivul nu este clar în acest caz.

O diferență semnificativă se observă între temperatura optimă și energia de activare a enzimelor imobilizate și a celei native. DEAE-Sephadex-aminoacilaza prezintă temperatura optimă cea mai înaltă.

În ceea ce privește efectul ionilor metalici, al inhibitorilor, al specificității de substrat, specificității optice și constantelor cinetice nu sunt diferențe marcante între enzima imobilizată și cea nativă.

Printre aminoacilazele imobilizate, cea pe DEAE-Sephadex prezintă cea mai mare stabilitate la încălzire. De asemenea prezintă o rezistență puternică față de proteaze, solvenți organici și agenți de denaturare a proteinelor.

2.4. Alte studii privind imobilizarea aminoacilazei I

Literatura privind imobilizarea aminoacilazei este extrem de bogată, în special cea de brevete. Au fost testate toate tipurile de imobilizare, pe o mare varietate de suporturi, urmărind obținerea unor preparate cât mai stabile, cu activitate cât mai mare, și la un preț cât mai redus. În continuare sunt prezentate doar câteva exemple.

Imobilizarea prin adsorbție

Franymann și Hülsmann [268] au brevetat un procedeu de obținere a unui oxid de siliciu, modificat prin tratare cu alcoxisilan pentru introducerea de grupări aminice primare sau secundare (γ-aminopropiltriethoxisilan, β-aminoetiltrimetilsilan, N-aminoetil-γ-aminopropil-

trietoxisilan, etc) sau oxid de siliciu amorf din alumino sau magneziusilicați. Au imobilizat acilază din *A. oryzae* pe aceste suporturi iar imobilizatele obținute le-au utilizat pentru hidroliza stereoselectivă a N-acetil-D,L-aminoacizilor (Phe, PheGly, Trp). Imobilizatul și-a menținut activitatea 8-10 săptămâni, la un randament de transformare de 85%.

Meiller și Mirabel [269,270] au brevetat un procedeu de obținere a unor suporturi prin acoperirea unui material mineral poros (silica, oxid de titan sau de aluminiu) cu un polimer reticulat (compuși epoxidici reticulați cu poliamine; poliamine-formaldehidă cu fenol-formaldehidă; stiren-divinilbenzen; etilenglicol diacrilat cu vinilpiridină, etc). Au imobilizat acilază renală sau din *Aspergillus* prin procedeul în coloană. Au obținut preparate cu activitate de 2-45 U/g. La utilizare, conversia în L-aminoacid a scăzut la 80% după 14 cicluri a 3 ore (cel mai bun rezultat). La utilizarea continuă, după 48 ore, rata de conversie s-a menținut la aceeași valoare ca după 3 ore.

Mazarguil și colab. [271] au obținut derivați halogenoalchilsilanici ai unor silicați sau argilă și pe care au imobilizat diferite enzime, printre care și aminoacilaza, dar fără rezultate bune în cazul acesteia.

Chibata și colab. [272,273] leagă tanin pe diferiți derivați aminohexil, n-alchil, carboxipentil, hidroxialchil de dextran reticulat sau celuloză, pe care, apoi, înglobează ioni Fe^{3+} . Pe suporturile astfel preparate au imobilizat acilază. Rezultatele cele mai bune le-au obținut cu derivați aminohexil care, după 60 ore de operare, și-au menținut 70% din activitatea inițială în cazul metioninei și nu au pierdut activitate în cazul valinei, fenilalaninei, triptofanului.

Watanabe și colab. [274] au imobilizat acilază pe tanin-aminohexil-celuloză, cu rezultate mai bune dacă procedeul a avut loc în mediu slab alcalin ce conținea NaCl și BuOH. Activitatea produsului obținut a fost de 5 ori mai mare decât cea obținută la clasică imobilizare prin legare ionică pe DEAE-Sephadex, dacă s-au utilizat concentrații mari de substrat.

Imobilizare prin entrapare și reticulare

Leuschner [275] a incorporat acilază renală porcină într-o membrană de nitrat de celuloză (1mm grosime) care a fost apoi tăiată în bucăți de 1-2 mm. Particulele obținute au fost apoi utilizate pentru hidroliza stereoselectivă a N-acetil-D,L-metioninei prin procedeul în coloană. După 28 zile de utilizate continuă, urmată de izolarea și purificarea L-metioninei, randamentul total al procesului a fost de aproximativ 80%.

Lee și colab. [276] au entrapat acilază din *A. oryzae* în alginat de calciu, stabilizat cu poli-L-lizină. Produsul a fost caracterizat (K_m , V_{max} , pH_{optim} , T_{optim}). La utilizare, după 10 cicluri, imobilizatul a pierdut 10% din activitate. Dacă perlele de alginat de calciu au fost acoperite cu un strat de polietilenimină, stabilitatea operațională a imobilizatului a crescut, după 25 de zile de operare continuă neînregistrându-se o pierdere apreciabilă de activitate.

Kawai și colab. [277] au utilizat o metodă combinată de imobilizare. Polimerul conținând grupări epoxi a fost incorporat în membrana unor fibre tubulare. Pe acest polimer au fost introduse grupări dietilamino (schimbător anionic). Acilaza a fost adsorbită/legată pe acest produs multistratificat, apoi a fost reticulată cu glutaraldehidă pentru a preveni desprinderea. Fibrele tubulare au fost utilizate pentru producerea continuă de L-metionină (4,1 moli/oră/L de fibre), la o viteză spațială de $200 h^{-1}$.

Entraparea în gel de poliacrilamidă ridică problema creșterii temperaturii în timpul polimerizării, fapt ce denaturează, de obicei, enzima.

Kawashima și colab. [278,279] depășesc aceste probleme prin radiopolimerizare la temperatura de înghețare. Au obținut, astfel, un randament de imobilizare a aminoacilazei de 43,7%.

German și Neklyudov [133] au imobilizat acilază din *Streptovorticillium olivoreticuli* prin entrapare în gel de poliacrilamidă, dar au adus o noutate, folosind NaOH în locul tetrametiletildiaminei (foarte toxică), care fusese utilizată anterior, iar enzima este și

reticulată cu glutaraldehidă. Au obținut, astfel, un randament de imobilizare de 85%, mult mai mare decât cel raportat de Chibata și colab. [261,267] de 52,6%. Preparatul a avut stabilitate maximă la 40°C și $t_{1/2}$ de inactivare de 1500 ore. Din studiile cinetice a rezultat că descreșterea conversiei procesului o dată cu creșterea concentrației inițiale a substratului se datorează inhibiției prin exces de substrat. Concentrația optimă de N-acetil-D,L-fenilalanină a fost de 0,438 M, cu care s-a obținut o conversie de 98±0,5%.

Suzuki [280] a brevetat un procedeu de reticulare a aminoacilazei cu glutaraldehidă și gelatină, obținând un randament de imobilizare de 63%.

Hirano și colab. [281] au folosit în loc de gelatină albumină și au imobilizat acilază din *A. ochraceus*. Produsul obținut a prezentat același pH optim ca și enzima nativă, a fost stabilă în intervalul de pH 4-8, dar a fost foarte instabil la pH bazic. Mai stabil a fost la acțiunea unor ioni de metale grele, dar activarea cu Co^{2+} a fost mai redusă. Autorul sugerează că, de fapt, majoritatea enzimei a fost legată covalent la miceliu.

Chibata și colab. [282] au imobilizat acilază din *A. oryzae* în Genewgel WG (un derivat de carrageenan) cu reticulare în același timp a enzimei cu glutaraldehidă și hexametildiamină, obținând un compus mult mai stabil decât cel simplu entrapat.

Imobilizare prin legare covalentă

Legarea covalentă a enzimelor la diferite suporturi insolubile se poate realiza prin diverse metode, prezentate la Cap. 2.1. Deși în foarte multe cazuri randamentul de imobilizare și activitatea produsului obținut sunt foarte bune, stabilitatea la pH și temperatură sunt mai ridicate, totuși procedeele, ca și entraparea și reticularea, prezintă marele dezavantaj că suportul, o dată enzima inactivată, nu se mai poate reutiliza, mărinnd astfel prețul de cost al procesului de hidroliză stereoselectivă a N-acetil-aminoacizilor. Cercetările sunt totuși extrem de numeroase, deoarece polimerii utilizați pot să aibă un preț scăzut, ceea ce ar putea face ca imobilizarea covalentă să concureze bine cu cea prin legare ionică.

Astfel, Mašková și colab. [283] au imobilizat acilază renală pe un polimer acrilic (Enzacryl-AA), utilizând reacția de cuplare dintre gruparea diazo a suportului și grupări aromatice ale unor resturi de aminoacizi din enzimă. Au obținut un randament de imobilizare de 70%, și o stabilitate la 60°C mult mai mare (80% activitate remanentă) față de enzima nativă (20% activitate remanentă). De asemenea, imobilizatului a prezentat o energie de activare de 1,4 ori mai scăzută decât cea a enzimei native.

Două patente [284,285] prezintă imobilizarea acilazei la nivelul unor grupări aldehidice de pe organopolisiloxani, respectiv grupări amino de pe aluminohidrosilicați modifițați. Randamentul de imobilizare a fost mult mai scăzut, de 22-32% în primul caz. Pentru al doilea exemplu, brevetul nu prezintă randamentul de imobilizare, dar, la utilizarea preparatului în coloană pentru hidroliza N-acetil-D,L-fenilalaninei, coloana și-a menținut activitatea după 1000 de ore de funcționare.

O serie de alte brevete [121,122,123] prezintă imobilizarea acilazei renale pe copolimeri acrilici parțial modifițați (Akrilex P) prin cuplare cu carbodiimidă, realizând randamente de imobilizare de 20-24%.

Sisak și colab. [286,287] au imobilizat acilaza renală tot pe suporturi poli-acrilamidice, dar de tip Akrilex C 100, cu grupări funcționale carboxil, și activate cu carbodiimide solubile în apă, urmând procedeul publicat anterior [288]. Randamentul de imobilizare a fost de 25+30%. Preparatul obținut l-au utilizat pentru hidroliza N-acetil-D,L-metioninei într-un reactor tip coloană, în pat fluidizat, și în pat fluidizat cu agitare. Conversia a depins în toate cele trei cazuri de debitul de alimentare a soluției de substrat, dar rezultate de departe mai bune s-au obținut în cazul patului fluidizat cu agitare. Dacă acest tip de reactor a fost împărțit în trei zone (straturi), rezultatele s-au îmbunătățit, la o creștere a debitului de 2 ori, conversia a scăzut cu numai 20 %, față de 50% pentru reactorul cu pat fluidizat cu agitare și cu o singură treaptă. După 60 de zile de funcționare acest tip de reactor nu a prezentat o modificare a conversiei, deci a activității imobilizatului.

Smalla și colab. [289] au utilizat Separon HEMA (copolimer 2-hidroxiethylmetacrilat cu etilendimetilacrilat, modificat cu epichelorhidrină). Randamentul de imobilizare a acilazei a fost mai ridicat dacă s-au utilizat concentrații mari (1,5-2 M) de săruri (sulfat de amoniu sau sodiu, fosfat diamoniacal), rezultatul cel mai bun fiind în cazul sulfatului de amoniu. Concentrația optimă de sare a depins de cantitatea de proteină prezentă. Randamentele de imobilizare au fost, totuși, scăzute (20-30%).

În scopul determinării N-acetil-aminoacizilor cu catenă ramificată (Val, Leu, Ile) în ser, Kiba și colab. [290] au realizat un sistem format din HPLC, cuplat cu reactoare enzimatice. Enzimele utilizate au fost aminoacilaza I și leucin dehidrogenaza, pe care le-au imobilizat pe polivinilalcool. În cazul acilazei, polimerul a fost aminat (printr-un procedeu cu clorometiloxiran) apoi enzima a fost atașată covalent prin intermediul glutaraldehidei. Randamentul de imobilizare a fost de 46%.

În spumă poliuretanică, acilaza poate fi imobilizată cu randament de 98%, după cum afirmă Bakker și colab. [143]. Aceștia au utilizat un prepolimer Hypol 3000 și un emulgator (Brij 52) pentru a îmbunătăți distribuția enzimei în amestecul de polimer. Randamentul de imobilizare a depins de raportul enzimă/polimer, rezultatul optim fiind pentru < 10 mg/g. Conversia racemicului de acetilmetionină la L-metionină a fost de 1,58 ori mai mare decât cea a preparatului comercial acilază-DEAE-Sephadex. Cercetările pentru utilizarea acestui produs într-un procedeu în coloană sunt în curs de desfășurare.

Imobilizare prin legare ionică

Nu numai colectivul lui Chibata a imobilizat acilaza pe DEAE-Sephadex A-25 ci și alți cercetători. Wang și colab. [291] au obținut un preparat cu un pH optim de 8 (mai ridicat decât cel prezentat anterior) și temperatură optimă de 65°C. La utilizarea continuă a imobilizatului timp de 300 ore nu s-a observat o pierdere semnificativă de activitate. Conversia în L-alanină a fost de 70%.

DEAE-celuloza a fost utilizată și de Barth și Masková [292] pentru imobilizarea acilazei renale, dar nu sunt prezentate randamente de imobilizare, doar activitățile preparatelor obținute (7U/mg). La exploatarea continuă în coloană, imobilizatului a pierdut 20% din activitate după 20 de zile.

Chibata și colab. [293] au imobilizat acilaza și pe alte tipuri de schimbători anionici, ca rășini fenolice, stirenice poroase, silica și sticlă poroasă, având grefate grupări schimbătoare de ioni, urmată de reticularea enzimei legate cu dialdehide alifatiche. Rezultatele cele mai bune au fost obținute cu rășini stirenice și silica, având grefate grupări trimetilamoniu, când randamentele de imobilizare au fost de 35-43%, iar preparatele și-au menținut activitatea după 20 de zile de utilizare continuă.

Rășini asemănătoare, modificate cu grupări aminice terțiare sau cuaternare, au fost utilizate și de Wuesthoff [294] pentru imobilizarea unor acilaze microbiene sau renale. Preparatele obținute au prezentat diferite activități (20-45U/g), funcție de capacitatea de schimb. Preparatul cel mai activ a fost folosit, în coloană, pentru hidroliza unor acetyl-D,L-aminoacizi. În cazul metioninei, după 3 ore de recirculare a soluției de substrat, s-a obținut o conversie de 92%.

Copolimeri acrilamidă-bisacrilamidă, modificați prin reacția Mannich cu diferiți reactivi, au dus la obținerea unor rășini anionice cu diferite capacități de schimb [152]. Acilaza din *A. oryzae* a fost imobilizată și activitatea produsului obținut a fost funcție de amina utilizată (secundară, diamină, derivat de anilină) ca și de gradul de reticulare al polimerului. Rezultatele cele mai bune au fost obținute în cazul dimetilaminei, la un raport amină/acrilamidă de 0,8 și un grad de reticulare de 47. Comparativ cu enzima nativă, imobilizatului a prezentat o temperatură optimă mult mai ridicată (75°C față de 50°C), un pH optim mai scăzut (6,8 față de 8,2) și o rezistență la temperatură și rezistență operațională mai bună decât acilaza imobilizată pe DEAE-Sephadex.

Imobilizarea unor celule producătoare de aminoacilază

În ultimii ani se insistă tot mai mult pe imobilizarea microorganismului producător de enzimă, pentru a evita procesele laborioase și costisitoare de purificare a enzimei, ca și pierderea de activitate pe parcursul imobilizării.

Yuan și colab. [153] au cultivat submers *A. oryzae* pe un mediu conținând extract de fasole și glucoză, apoi miceliul filtrat sau centrifugat a fost imobilizat în gelatină prin reticulare cu glutaraldehidă și etilendiamină. Preparatul obținut a fost introdus în coloană și studiat, comparativ cu miceliul liber, pentru hidroliza N-acetil-D,L-metioninei. pH-ul și temperatura optimă au fost mai ridicate. Valoarea K_m a crescut la celulele imobilizate, ceea ce denotă o afinitate pentru substrat mai scăzută. Acest lucru poate fi cauzat de schimbările în mediul imediat înconjurător al celulelor imobilizate. Din datele cinetice, $t_{1/2}$ al activității enzimatică pentru celulele imobilizate a fost de 70 de zile, mult mai bun decât în cazul acilazei imobilizate pe DEAE-Sephadex (~50 zile). Randamentul întregului proces, până la separarea L-metioninei, a fost de 75%.

Celule de *A. ochraceus* au fost imobilizate prin reticulare cu glutaraldehidă pe ovalbumină și utilizate la scară de laborator pentru rezoluția optică a acetil-D,L-metioninei [281], cu rezultate, de asemenea, promițătoare.

Colectivul lui Bódalo [126,128,295] a studiat imobilizarea unor celule de *Pseudomonas* sp. BA2 în alginat de calciu și k-carrageenan, în prezență de N-acetil-L-alanină. Într-o serie de experimente, celulele au fost tratate înainte sau după imobilizare cu glutaraldehidă, hexametildiamină sau polietilenimină, pentru reticulare. La imobilizarea simplă pe alginat, activitatea obținută a fost foarte mare, dar stabilitatea în timp extrem de redusă. În cazul reticulării cu glutaraldehidă s-au îmbunătățit atât stabilitatea operațională a imobilizatului cât și productivitatea lui. În cazul entrapării pe k-carrageenan rezultatele au fost ceva mai bune.

Rezultate asemănătoare au obținut și Hernandez și colab. [129].

3. Tehnologia obținerii aminoacizilor

Proteinele sunt unele dintre cele mai importante substanțe ce intră în alcătuirea organismelor vii. Unitățile structurale din care sunt formate proteinele sunt α -L-aminoacizii.

În constituția proteinelor intră 20 de aminoacizi diferiți, dar toți sunt izomeri L- α -. Sinteza tuturor acestor aminoacizi, biomolecule fundamentale, nu poate fi efectuată decât de plante și unele microorganisme. Omul și alte animale, în cursul evoluției, au pierdut capacitatea de sinteză a 8 aminoacizi pe care deci nu îi pot obține decât prin aport exogen. Aceștia sunt numiți aminoacizi esențiali și sunt: valina, leucina, izoleucina, lizina, metionina, fenilalanina, treonina și triptofanul. Alți doi, histidina și arginina, sunt indispensabili pentru organismele în creștere; sinteza lor endogenă nu este suficientă în această perioadă, ca de altfel și în cazul refacerii după anumite boli consumptive. Ei sunt numiți semiesențiali. Ceilalți 10 aminoacizi: alanina, glicocolul, serina, tirozina, cisteina, prolina, acidul aspartic, acidul glutamic, asparagina și glutamina pot fi obținuți prin sinteză endogenă și sunt numiți aminoacizi neesențiali [296].

Pe lângă rolul pe care îl au în constituția proteinelor sau reglarea metabolică și funcțională, aminoacizii, prin produșii intermediari de degradare, pot constitui baza pentru sinteza altor componente ale organismelor vii.

În realitate, în lumea vie nu există doar cei 20 de aminoacizi proteinogeni. Au fost separați peste 700 de α -aminoacizi naturali, sau alți izomeri (β -alanina, acidul γ -aminobutiric, D-aminoacizi) îndeplinind diferite funcții biologice.

Datorită metodelor spectroscopice și programelor de calculator folosite pentru a elucida relația dintre secvența de aminoacizi, conformația proteică și proprietățile fizice, chimice și biologice a apărut un interes deosebit pentru proiectarea și sinteza de novo a unor aminoacizi nenaturali cu utilizare ca inhibitori enzimatici, antimetaboliți, precursori ai unor peptide, proteine rezistente la proteaze sau cu conformații care să le inducă anumite proprietăți. Ca o consecință a apărut necesitatea unor noi metodologii viabile pentru sinteza acestor aminoacizi naturali, sau nenaturali, într-o formă optic pură.

La ora actuală se utilizează mai multe metode de obținere:

- hidroliza totală a proteinelor urmată de extracție și purificare
- fermentația
- sinteze chimice
- sinteze enzimatic

Utilizarea uneia sau alteia dintre metode depinde în final de importanța aminoacidului și mai ales de prețul de cost.

3.1. Metode generale de obținere a aminoacizilor

3.1.1. Hidroliza totală a proteinelor

Pentru câțiva dintre aminoacizi (cisteina, tirozina, prolina) cea mai economică metodă de obținere este încă izolarea din materialele naturale (vegetale și animale care conțin proteine: cheratină, colagen, gluten, drojdii) prin hidroliză acidă, bazică sau enzimatică și separare.

Importanță practică are numai procedeul clasic al hidrolizei acide, în prezența acidului clorhidric sau percloric. Hidrolizatul acid se neutralizează. Precipită o fracție bogată în L-cistină și L-tirozină, aminoacizi foarte puțin solubili în apă. Aceștia se separă de restul soluției prin filtrare apoi prin recristalizare. Restul de aminoacizi se separă din soluția rămasă prin procedee ca extracția, cromatografia (în special de schimb ionic), cristalizarea fracționată. Se obțin L-aminoacizi de puritate farmaceutică [297].

3.1.2. Sinteza chimică

În principiu toți aminoacizii pot fi obținuți prin sinteze chimice convenționale, dar rezultă amestecuri racemice.

Cele mai uzuale metode [298] sunt:

1. Reacția compușilor halogenați cu esterii acidului malonic, urmată de hidroliză, bromurare, decarboxilare și aminare, exemplu pentru sinteza fenilalaninei;
2. Sinteza Strecker, exemplu pentru obținerea metioninei;
3. Condensări Perkin;
4. Degradarea Hofmann;
5. Degradarea Curtius;
6. Sinteza Degussa a D,L-cisteinei

Metodele pentru sinteza asimetrică a aminoacizilor pot fi împărțite, în mare, în șase categorii [299,300]:

1. Hidrogenarea stereoselectivă a derivaților chirali, neracemici ai dehidroaminoacizilor [301,302] sau hidrogenarea asimetrică a derivaților prochirali ai dehidroaminoacizilor [303],

2. Echivalenții chirali ai glicinei servesc ca șabloane de α -aminoacizi, utile pentru continuarea seriei omoloage prin formarea de legături carbon-carbon în poziția α , prin alchilarea nucleofilă cu carbanionul [16,104,161,304] sau
3. Substituția electrofilă cu carbocationul [248],
4. Alchilarea asimetrică a derivaților enolici ai aminoacizilor cu formare de L-aminoacizi α -disubstituiți [153],
5. Aminarea nucleofilă [305,306] sau
6. Aminarea electrofilă a derivaților optic activi de carbonil [15,29,63]; s-au dezvoltat în ultima perioadă [307].

3.1.3. Fermentația

Deși la ora actuală este posibilă prepararea tuturor aminoacizilor prin metode microbiologice (fermentative), o aplicare industrială pe scară largă o au doar procesele pentru obținerea acidului L-glutamic și a L-lizinei. Se utilizează mutații de înaltă performanță. Materiile prime pentru mediile de cultură sunt melasa, glucoza și uneori acidul acetic. Pentru producerea unui anumit aminoacid sunt necesari precursori. Aceștia se adaugă la mediul nutritiv pentru a fi convertiți de către microorganism în L-aminoacidul dorit. În Tabelul 3.1 sunt prezentate câteva tulpini microbiene care produc L-aminoacizi și concentrația finală a acestora în mediul de cultură [322].

Tabel 3.1. Producerea aminoacizilor prin fermentație [322]

L-aminoacid	Conc. fin. g/l	Tulpina microbiană
Alanină	40	<i>Corynebacterium gelatinosum</i>
Arginină	29	<i>Brevibacterium flavum</i>
Acid glutamic	39	<i>Brevibacterium flavum</i>
Histidină	10	<i>Brevibacterium flavum</i>
Izoleucină	15	<i>Brevibacterium flavum</i>
Leucină	28	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>
Lizină	32	<i>Brevibacterium flavum</i>
	44	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Fenilalanină	2,2	<i>Brevibacterium flavum</i>
	6	<i>Bacillus subtilis</i>
Oritină	26	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Prolină	29	<i>Brevibacterium flavum</i>
Treonină	18	<i>Brevibacterium flavum</i>
	6,1	<i>Bacillus subtilis</i>
Valină	23	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>

Dezvoltările moderne ale tehnologiei genetice promit o creștere substanțială în capacitatea productivă a microorganismelor și o considerabilă reducere a costului L-aminoacizilor.

3.1.4. Cataliza enzimatică

Sintezele de aminoacizi cu enzime purificate, imobilizate, sau cu întregul sistem celular au devenit metode comerciale importante, atât la scară intermediară cât și industrială. Se pot folosi două tipuri principale de reacții pentru obținere de aminoacizi optic puri:

- rezoluția enzimatică a amestecurilor racemice de aminoacizi
- reacții cu formare de legături asimetrice pe substraturi prochirale cu un sistem enzimatic.

Sistemul biocatalitic trebuie să îndeplinească unele condiții pentru a găsi o utilizare industrială:

- biocatalizator ușor disponibil
- cost rezonabil
- stabilitatea catalizatorului
- puritatea optică înaltă a produsului final
- specificitatea de substrat bună

În plus, substratul trebuie să fie ușor accesibil, ieftin, iar în proces să prezinte caracteristici care să ușureze operarea, separarea și purificarea produsului, ca și recuperarea simplă și reutilizarea biocatalizatorului.

Câteva dintre cele mai cunoscute exemple [158,208,290,308,309,310,311,312,313,314 315,316] sunt prezentate în continuare în Tabelul 3.2.

Tabel 3.2. Etapa enzimatică în sinteza unor aminoacizi

Substrat	Enzimă	Aminoacid
α -cetobutirat + amoniu	L-metionin- γ -liază	L-metionină
D,L- α -aminocaprolactamă	1. racemază (<i>Alcaligenes fecalis</i>) 2. L- α -aminocaprolactam hidrolază (<i>Candida brumicola</i>)	L-lizină
Fumarat de amoniu	Aspartază (<i>E.coli</i> imobil.)	L-aspartat
Indol + piruvat de amoniu Indol + L-serină	Triptofanază (<i>E.coli</i>)	L-triptofan
Fenol + piruvat de amoniu	β -tirozinază (<i>Proteus rettgeri</i> , <i>Erwinia herbicola</i>)	L-tirozină
L-aspartat	L-aspartat decarboxilază (<i>Pseudomonas dacunhae</i> imobil.)	L-alanină
Acid trans-cinamic + amoniu	Fenilalanin-amoniu liază (<i>Rhodoturula rubra</i> imobil.)	L-fenilalanină
D-treonină + glucoză	4 enzime (<i>Serratia marcescens</i>)	L-izoleucină
D,L-5-(p-hidroxifenil)-hidantoină	D-hidantoinază (<i>B.brevis</i> , <i>Pseudomonas striata</i>)	D-p-hidroxifenilglicină
Acid α -ceto- β -fenilpropionic	Transaminază (celule imobil.)	L-fenilalanină
Pirocatecol + piruvat de amoniu	β -tirozinază (<i>Erwinia herbicola</i>)	L-DOPA
α -Cetoacid+ amoniu + NADH ₂	L-aminoacid dehidrogenază	L-aminoacid
Glicină + formaldehidă + Tetrahidrofolat	Hidroximetil transferază (<i>Klebsiella aerogenes</i> + genă <i>E.coli</i>)	L-serină
Acid aminotiazolic	Tiazolinidază (<i>Pseudomonas thiazolinophilum</i>)	L-cisteină
Esteri ai acizilor α -nitro- α -metil-carboxilici	α -chimotripsină (urmată de reducere cu hidrogen)	L-aminoacizi
Metil- sau benzilesteri ai D,L-aminoacizilor	Alcalază (<i>Bacillus licheniformis</i>)	L-aminoacizi
N-acil-D,L-aminoacizi	aminoacilază	L-aminoacizi

Toate metodele prezentate au avantajele și dezavantajele lor. Metoda optimă se alege pentru fiecare caz în parte, ținând cont de funcționalitate, cantitatea dorită, cost și timp.

La începutul anilor '80 aceste metode erau limitate la fază de laborator, astăzi însă unele se aplică și industrial.

3.1.5. Obținerea L-aminoacizilor cu aminoacilază I solubilă

Hidroliza stereoselectivă a racemicurilor de acetilaminoacizi, în prezența aminoacilazei I se folosește la scară industrială încă din anii 60', după cum s-a precizat și anterior. În continuare sunt prezentate câteva dintre cele mai utilizate tehnologii ce folosesc acilaza fie solubilă, fie imobilizată.

Tehnologia de obținere a L-aminoacizilor cu reactorul cu membrană

Din datele de caracterizare fizică (greutate moleculară 76.100 D) și chimică (stabilitate) a aminoacilazei solubile rezultă că această enzimă poate fi folosită pentru cataliza omogenă continuă. Pentru stabilirea compatibilității enzimei cu membranele în reactoarele cu membrană au fost testate o serie de materiale diferite. Cel mai bun pentru unitatea de separare s-a dovedit a fi acetatul de celuloză sub forma de fibre tubulare [312,323]. În Figura 3.1 este ilustrată schema tehnologică de producere a L-metioninei într-un singur reactor cu o singură unitate de separare.

Substratul (acil-D,L-aminoacidul) este transportat cu ajutorul unei pompe dozatoare printr-un electroventil de siguranță care controlează presiunea în fața celor două filtre sterile cu pori de 0,2 μm prin intermediul unui manometru. Substratul trece printr-un ventil de siguranță și un termostat (d) pentru a ajunge la reactorul propriu-zis (e). Bucla de reactor cu unitatea de separare (g), pompa de recirculare (f) și un alt termostat constituie în principiu un CSTR (reactor continuu cu amestecare perfectă).

Produsul și substratul neconvertit părăsesc unitatea de separare prin interiorul fibrelor tubulare.

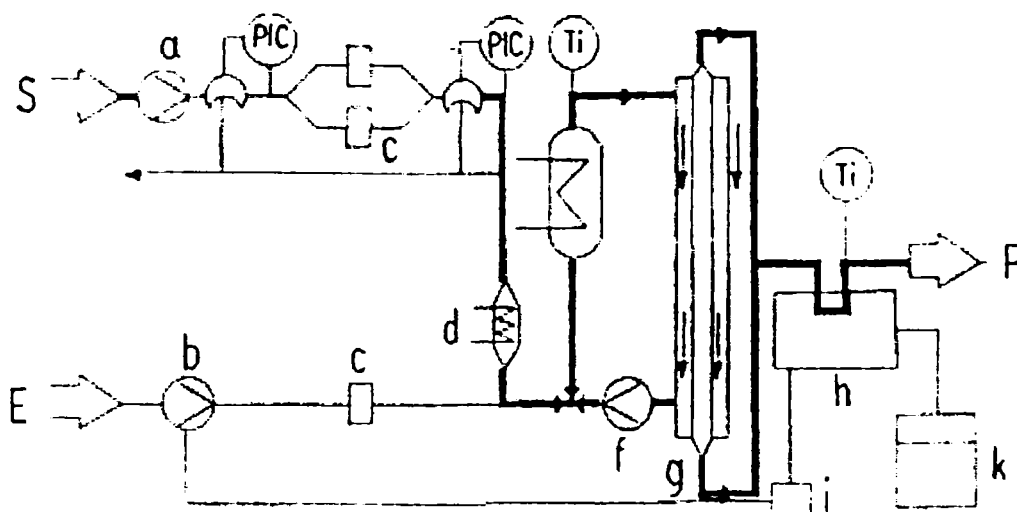


Figura 3.1. Schema tehnologică a unei instalații de producere a L-metioninei cu aminoacilază solubilă.[323]

- | | |
|--|--------------------------|
| a - pompa de alimentare | e - reactor |
| b - pompa automată cu înregistrare pentru enzimă | f - pompa de recirculare |
| c - filtre sterile | g - unitate de separare |
| d N pretermostat | h - polarimetru |
| i - unitate de control a adăugării enzimei | k - înregistrare |

Produsul de reacție trece prin cuva unui polarimetru, iar semnalul analog al polarimetrului (h) este continuu înregistrat la un recorder (k). Același semnal este utilizat într-un sistem de control (i) pentru a opera o biuretă automată (b). Astfel, atunci când concentrația produsului scade, se adaugă prin biuretă soluția proaspătă de catalizator. Debitul de alimentare cu catalizator este continuu înregistrat, permițând calcularea cantității de catalizator necesară per unitate de produs. Pompa de recirculare se operează la viteze mari pentru a menține scăzută polarizarea concentrației sau adsorbția enzimei pe membrană. La un debit de 1 l/h, retenția enzimei este cantitativă după aproximativ 25 timpi de retenție, datorită efectului de filtrare adițională provocat de stratul de gel de proteină enzimatică.

Catalizatorul nu poate fi utilizat cantitativ în mod omogen pentru că nu se poate evita în totalitate adsorbția lui la membrană. Este mult mai avantajos să se opereze reactorul la concentrații scăzute de enzimă, mai ales atunci când se constată că concentrația de proteine din reactor crește treptat.

De regulă, se folosesc concentrații de enzime de 0,5-0,2 g/l. Dacă este necesar, se poate opera cu sistemul și la concentrații de enzimă mai scăzute, fără ca acest lucru să aibă un efect limitativ, întrucât capacitatea unității de separare este treapta limitativă a sistemului.

În practică se recomandă operarea sub debitul maxim al unității de separare pentru a menține retenția cantitativă a enzimei.

Eficiența catalizatorului, definită ca raportul vitezelor de reacție în reactorul cu membrană și cu enzima liberă la același nivel de conversie și concentrație, descrește liniar o dată cu creșterea conversiei. Extrapolând la condițiile inițiale de viteză de reacție, se găsește valoarea eficienței de 70% (necesară pentru analiza economică). Constanta de dezactivare, calculată din datele de flux de enzimă suplimentară, descrește în timp (Figura 3.2) datorită formării învelișului de proteine pe membrană, care îmbunătățește retenția catalizatorului și protejează dezactivarea enzimelor noi pe membrană. În stare statică, constanta de dezactivare este de $0,0344 \text{ zile}^{-1}$, în comparație cu valoarea de $0,020 \text{ zile}^{-1}$ pentru acilaza solubilă "liberă". Deci, practic este nevoie de o lună pentru a dubla concentrația de proteine în reactorul cu membrană.

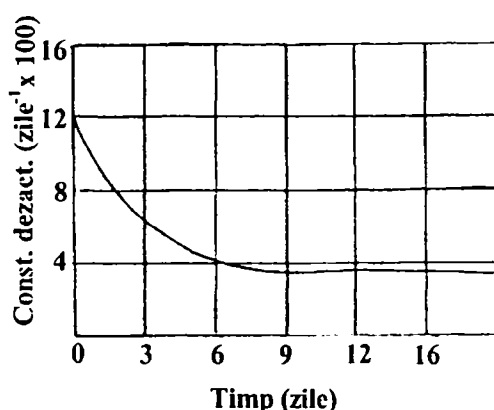


Figura 3.2 Variația constantei de dezactivare în funcție de timpul de operare într-un reactor cu membrană [323]

Tipul de cinetică descris se pretează pentru un sistem cu deplasare totală, fapt care a dus la aproximarea acestuia cu un reactor tip cascadă (Figura 3.3).

Tehnologia de obținere a L-aminoacizilor cu reactorul în cascadă [323]

O schemă de principiu a unui reactor de acest tip este prezentată în Figura 3.3.

Soluția proaspătă de substrat cu un debit volumetric F_{v0} , împreună cu cea recirculată F_{vR} de la pompa catalizatorului intră în primul reactor de volum V_1 cu o concentrație de

enzimă E1. Al doilea reactor are $V_2 = V_1$ și $E_2 = E_1$. A treia etapă are doar 1/10 din volumul primului reactor. ($V_3 = V_2/10$) și $E_3 \neq E_1$

Produsul părăsește unitatea de separare cu debitul F_{v0} în timp ce catalizatorul reținut se va recircula cu debitul F_{vR} în primul reactor.

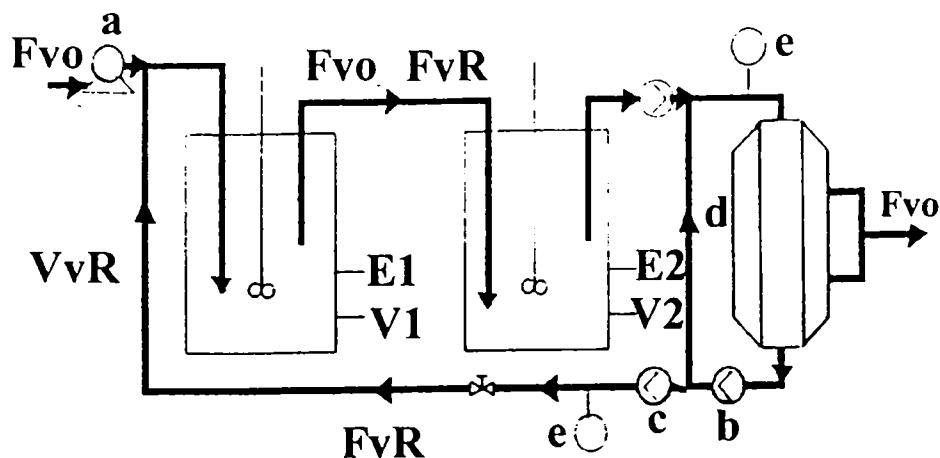


Figura 3.3. Schema fluxului tehnologic la reactoare cu membrană, în cascadă cu recircularea catalizatorului, cu o singură unitate de separare [323]

- a - pompă de alimentare
- b - pompă de recirculare pentru unitatea de separare
- c - pompă de recirculare pentru catalizator
- d - modul asimetric de fibre tubulare
- e - manometru

Dacă acest flux F_{vR} este egal cu zero, tot catalizatorul se va acumula în ultima etapă și în primele două nu se va realiza astfel nici o conversie. Dacă, însă, pompa de catalizator se operează la viteze foarte mari, catalizatorul va fi distribuit uniform de-a lungul întregii cascade. În aceste condiții întregul sistem se va comporta ca un unic CSTR. Ambele extreme vor duce la aceeași performanță a reactorului. Prima va fi un CSTR cu volum mic, dar cu concentrație mare de enzimă, iar a doua un CSTR cu volum mare, bine amestecat cu concentrație scăzută de enzimă. Între aceste două extreme există evident, un optim. Întrucât a treia etapă are doar 1/10 din volumul etapelor anterioare, performanțe ideale se vor obține atunci când concentrația enzimei în cea de-a treia cascadă va fi de 10 ori mai mare decât în primele două. În acest caz, produsul dintre timpul de staționare și concentrația enzimei este egal în toate cele trei etape.

La viteze mici de recirculare a catalizatorului, cea mai mare parte a conversiei se realizează în etapa a treia.

Deviația rezultatelor experimentale de la valorile calculate pentru cea mai mică valoare a debitului de recirculare a catalizatorului este destul de mare, astfel că se va adsorbi o cantitate mare de enzimă pe membrană și care nu va mai putea fi disponibilă pentru cataliza omogenă eficientă.

La viteze de recirculare mari adsorbția catalizatorului pe membrană devine din ce în ce mai mică și efectul dispare treptat. La un raport $F_{vR}/F_{v0} = 0,111$ se atinge o valoare identică a produsului dintre concentrația catalizatorului și timpul de staționare pentru fiecare dintre etape.

Aceasta ar fi distribuția optimă de catalizator pentru o reacție de ordinul I. În acest caz, se realizează conversia maximă la un raport de 0,125, demonstrând că sunt mai avantajoase vitezele mari de recirculare a catalizatorului. Ordinul de reacție crește de la 0 la 1 o dată cu creșterea conversiei.

Un reactor cu membrană (Minitan S de la Millipore Co.) propune și Bodalo și colab.

[318,326], format, de fapt, din reactorul enzimatic și unitatea de filtrare. Viteza de recirculare a materialului nu influențează prea mult conversia în L-aminoacid, dar creșterea concentrației substratului duce la scăderea conversiei.

3.1.6. Obținerea L-aminoacizilor cu aminoacilază fixată pe suport

Producerea industrială a L-aminoacizilor a dus la dezvoltarea și optimizarea tehnologiilor existente. Studiile economice asupra costului total de operare cu enzime libere și enzime imobilizate pledează pentru o tehnologie bazată pe enzime fixate pe suport, costul acestuia fiind cu 60% mai mic decât cel al procesului convențional cu enzima liberă.

Tehnologia de obținere a L-aminoacizilor cu aminoacilază imobilizată pe un suport insolubil implică operarea unui reactor enzimatic tip coloană termostată și cu enzima împachetată uniform în reactorul tubular. Pentru realizarea unei eficiențe maxime în exploatare este necesară menținerea debitului de alimentare, a pH-ului și a temperaturii constante, fapt realizabil prin automatizarea procesului tehnologic.

Aminoacilaza, având o stabilitate operațională bună, poate fi folosită 30 zile [166] fără a fi nevoie de regenerarea sa. Schema fluxului tehnologic este prezentată în Figura 3.4.

Acetil-D,L-aminoacidul 0,2 M, pH 7 cu 5×10^{-4} M CoCl_2 din rezervorul de zi este trecut cu ajutorul unei pompe centrifuge prin filtrul pentru materia primă și printr-un schimbător de căldură pentru preîncălzirea substratului la 50°C . Căldura necesară acestui schimbător de căldură este furnizată de agentul termic (apă fierbinte) recirculat cu ajutorul pompei de recirculare a apei din tancul de apă caldă. Reglarea temperaturii de alimentare se realizează cu ajutorul unui regulator de temperatură cu elementul sensibil situat la intrarea în coloană, iar semnalul de ieșire acționează asupra unui ventil pneumatic situat pe refularea pompei de recirculare a agentului termic al schimbătorului de căldură.

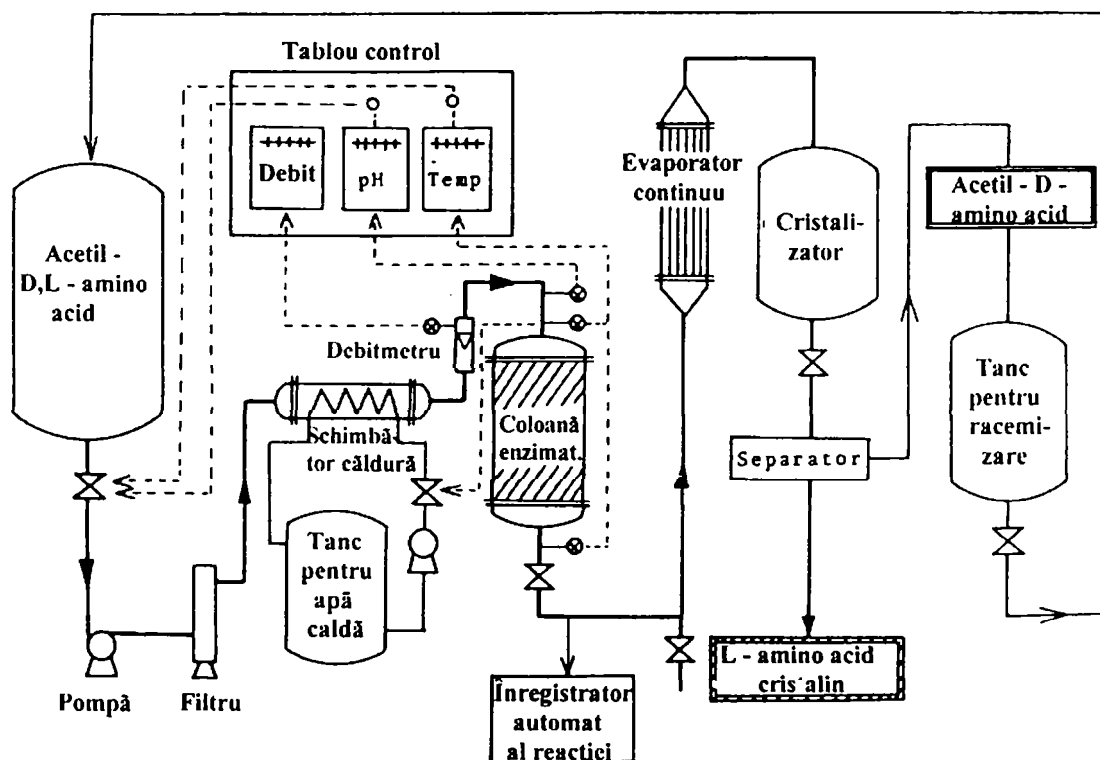


Figura 3.4. Schema tehnologică de obținere a L-aminoacizilor cu aminoacilază imobilizată pe DEAE-Sephadex [166]

Debitul de alimentare este continuu urmărit și înregistrat la tabloul de control al procesului. Soluția de substrat preîncălzit la 50°C este trecut în reactorul enzimatic în care se face o reglare a pH-ului și a temperaturii prin intermediul reguletoarelor de pH și de temperatură care acționează asupra ventilului de golire a rezervorului.

Produsul de reacție este trecut la faza de evaporare într-un evaporator continuu unde soluția de L-aminoacid și N-acetil-D-aminoacid este concentrată la 5-10% din volumul său inițial și trecută la faza de cristalizare unde este răcită la aproximativ 10°C. L-aminoacidul se separă din soluție prin cristalizare și se filtrează, iar soluția de acetil-D-aminoacid este trecută la faza de racemizare de unde se recirculă în sistem.

În Tabelul 3.3 sunt prezentate cantitățile teoretice de producere a câtorva L-aminoacizi cu un reactor de 1000 l umplut cu aminoacilază fixată pe DEAE- Sephadex, la viteze spațiale optime pentru o conversie totală a L-substratului. Viteza spațială se definește ca volumul de lichid ce trece printr-un anumit volum de enzimă imobilizată într-o oră, raportat la volumul de enzimă imobilizată.

Tabel 3.3. Producția de L-aminoacizi cu o coloană de 1000 l de aminoacilază fixată pe DEAE-Sephedex A-25 [166]

L-aminoacid	Viteză spațială (h ⁻¹)	Cantitate (teoretică) de L-aminoacid	
		în 24 ore (kg)	în 20 zile (kg)
L-alanină	1,0	214	6420
L-metionină	2,0	715	21450
L-fenilalanină	1,5	594	17820
L-triptofan	0,9	441	13230
L-valină	1,8	505	15150

Cercetările în domeniul reactoarelor enzimatic (imobilizate) au arătat că trebuie să se utilizeze un reactor cu deplasare totală. Umplutura de catalizator poate fi aminoacilaza fixată pe silicat de aluminiu [324] sau DEAE-Sephadex [325] în reactoare tubulare la numere Reynolds rezonabile.

Stratul de silicat de aluminiu are o permeabilitate mai bună decât straturile de particule de polimeri care sunt foarte compresibile, dar stabilitatea enzimei pe acest suport este mai mică decât pe DEAE-Sephadex.

Pentru studiul modelului de curgere al unui reactor tubular, umplut cu aminoacilază fixată pe silicat de aluminiu, Wandrey și Flaschel [323] au construit un reactor de 1 m lungime și 1 cm diametru (Figura 3.5) și au constatat că este suficient un strat de catalizator de 16 cm pentru a obține un model de curgere ca cel dintr-o cascadă în 10 etape. Desigur această înălțime nu ar fi suficientă pentru a realiza o conversie rezonabilă a substratului cu concentrația volumetrică maximă de enzimă din coloană. De aceea calculul înălțimii coloanei va ține cont de conversia maximă impusă la un debit de alimentare dat.

Construcția unui reactor enzimatic de mare eficiență, cu enzime imobilizate, necesită studiul următorilor factori :

1. influența vitezei de curgere a substratului asupra vitezei de reacție,
2. influența modelului de curgere a soluției de substrat asupra vitezei de reacție,
3. influența dimensiunilor coloanei asupra vitezei de reacție,
4. influența căderii de presiune asupra comportării stratului de catalizator.

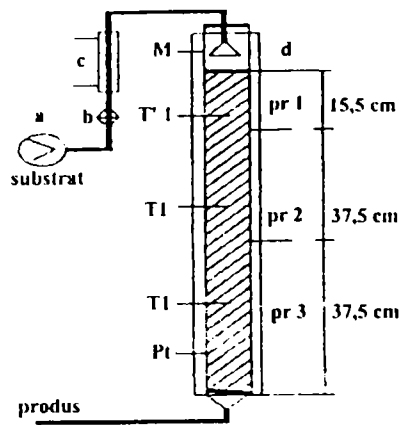


Figura 3.5. Reactor cu deplasare totală pentru enzima fixată pe suport [323]
 a - pompă de alimentare, b - filtru steril,
 c N termostat, d - strat de vată de sticlă

Viteza de curgere prin coloană afectează viteza de hidroliză enzimatică a acil-D,L-metioninei și la $VS = 2,4 \text{ h}^{-1}$ pentru acetil-D,L-valină, reacția încetează la o concentrație a substratului (forma L-acetilată) de 0,1 M (pornindu-se de la o concentrație de acil-D,L-aminoacid de 0,2 M) ceea ce corespunde la o hidroliză de 50% a substratului racemic și 100% a formei L. Acest lucru ne arată că aminoacilaza este specifică din punct de vedere optic (Figura 3.6).

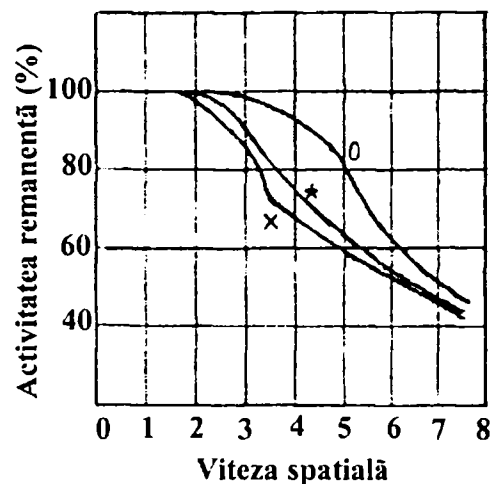


Figura 3.6 Gradul de hidroliză a acetil-D,L-aminoacizilor cu aminoacilază imobilizată pe DEAE-Sephadex [323]
 Concentrația substratului 0,2 M (pH 7,0 cu $5 \times 10^{-4} \text{ M CoCl}_2$).
 Viteza spațială 1,5-8,0 h^{-1} la 50°C;
 0 - acetil-D,L-metionina
 * - acetil-D,L-fenilalanină
 x - acetil-D,L-valina

În Tabelul 3.4 sunt prezentate valorile vitezelor spațiale pentru hidroliza completă a câtorva acetil-D,L-aminoacizi.

Tabel 3.4. Viteza spațială maximă pentru hidroliza asimetrică completă a substratului [323]

Substratul	Viteza spațială (h^{-1})
Acetil-D,L-alanină	1,4
Acetil-D,L-metionină	2,8
Acetil-D,L-fenilalanină	2,0
Acetil-D,L-triptofan	1,2
Acetil-D,L-valină	2,4

Datele corespund pentru aminoacilaza proaspăt imobilizată. O dată cu scăderea activității enzimice, este necesară micșorarea acestor valori.

Activitatea coloanelor cu aminoacilază este aceeași atât pentru alimentarea de jos în sus cât și pentru alimentarea de sus în jos. În practică însă se preferă curgerea de sus în jos pentru a preveni canalizarea coloanei datorită bulelor de aer dizolvate în substratul încălzit care, la o alimentare de sus în jos, pot fi ușor eliminate, rămânând în partea de sus a coloanei.

La aceste coloane, diferențele în vitezele de reacție datorită variației dimensiunilor coloanei abia se observă.

Astfel, dacă aminoacilaza este uniform împachetată în coloană, iar soluția de substrat trece lin prin coloană, reacția enzimatică va avea loc cu aceeași viteză la dimensiuni diferite de coloană.

Umpluturile de aminoacilază fixată pe DEAE-Sephadex se tasează în timpul funcționării datorită, pe de-o parte, debitului de alimentare iar pe de altă parte datorită căderii de presiune pe coloană.

Coloanele cu aminoacilază imobilizată pe DEAE-Sephadex își mențin mai mult de 60% din activitate timp de 30 zile de operare continuă, iar timpul de înjumătățire, definit ca timpul necesar pentru a ajunge la 50% din activitatea inițială a coloanei, este estimat la 60 de zile.

Regenerarea coloanelor este foarte importantă din punct de vedere industrial. Pierderea din activitate a aminoacilazei poate fi compensată prin reactivare, trecând cantitatea de enzimă corespunzătoare pierderii de activitate peste coloana de regenerat (Figura 3.7)

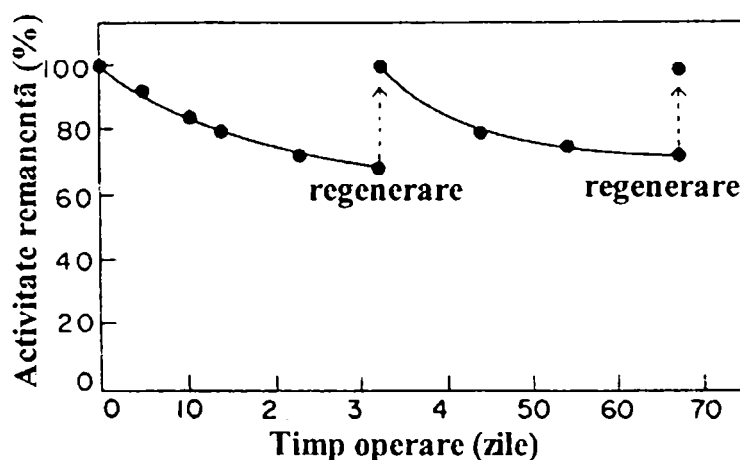


Figura 3.7. Stabilitatea operațională a unei coloane de aminoacilază fixată pe DEAE-Sephadex [323]

O soluție de acetil-D,L-metionină de 0,2 M (pH 7,0 cu $5 \cdot 10^{-4}$ $CoCl_2$ este trecută peste o coloană la $50^\circ C$ cu $VS = 2,0 h^{-1}$. Activitatea s-a determinat la $VS=10 h^{-1}$.

Deoarece DEAE-Sephadexul este mult mai stabil decât ne-am fi așteptat, acesta se poate folosi timp de mai mult de 5 ani fără ca să-și piardă proprietățile de fixare sau să se deterioreze fizic.

3.1.7. Utilizări ale aminoacizilor

Aminoacizii prezintă o piață de milioane de dolari la ora actuală. Utilizările tradiționale au fost ca aditivi alimentari în nutriția umană și animală și la prepararea de medicamente. În zilele noastre utilizarea lor este mult diversificată. Foarte pe scurt sunt prezentate, în continuare, câteva din domeniile de utilizare.

Agricultură

Derivații aminoacizilor sunt frecvent descriși în literatură ca regulatori de creștere, erbicide și pesticide. De exemplu acidul L-tiazolidin-4-carboxilic posedă proprietăți speciale de stimulare a creșterii pentru fructe și diferite plante de cultură. Glicina se utilizează pentru sinteza erbicidului glyphosate.

Nutriție

Cantitatea de proteine necesară organismului uman variază între 0,5 și 2,5 g/kg corp, funcție de vârstă și alte condiții. În general, proteinele provenite din surse vegetale au o valoare biologică, atât pentru om cât și pentru alte animale, mult mai scăzută decât cele de origine animală deoarece au un deficit de aminoacizi esențiali. Deci este de dorit suplimentarea dietei cu acești aminoacizi esențiali, în special a lizinei, metioninei, triptofanului.

Aminoacizi liberi și peptide se află în majoritatea alimentelor și în parte contribuie la gust, aromă și culoare [157].

Altă particularitate a aminoacizilor este abilitatea lor de a mări sinergetic aromele. Mulți L-aminoacizi sunt amari, pe când formele lor D- sunt dulci. Peptidele au în exclusivitate gust amar. Aminoacizii sunt precursori foarte importanți ai substanțelor aromate produse atunci când mâncarea este fiartă sau prăjită [317,318]. Reacția aminoacizilor liberi cu zahăr reducător sau alți compuși carbonilici duce la formarea unui spectru larg de compuși cum ar fi aldehide, cetone, heterocicli. Fenilalanina și acidul aspartic sunt folosiți la sinteza aspartamului, îndulcitor folosit de diabetici sau în alimentația hipocalorică.

Farmacie

Perfuziile cu soluții ce conțin L-aminoacizi sunt o parte esențială a tratamentului dietetic clinic. Metoda este utilizată atunci când alimentarea pe cale bucală nu este posibilă timp îndelungat. În mod normal la perfuziile cu soluții de aminoacizi (5 - 10%) se adaugă clorură de sodiu și ocazional sorbitol, xilitol, acid malic, vitamine. De asemenea se alcătuiesc amestecuri de anumiți aminoacizi cu excluderea intenționată a altora, împreună cu alte elemente nutritive, pentru alimentația copiilor care suferă de boli genetice în metabolismul aminoacizilor.

Farmacopeea Română ediția X-a [319] prevede acidul aspartic utilizat în hipovitaminoze C (pag.68), acidul glutamic ca neurotonic (pag.74), metionina ca hepatoprotector (pag.633) și glutamolactat de magneziu cu utilizare în hipomagnezinemie (pag.599).

În sinteza unor inhibitori ai enzimei de conversie (pentru tratamentul hipertensiunii arteriale), se pornește de la anumiți aminoacizi.

Treonina este scheletul pentru obținerea antibioticului azthreonam.

L- α -aminoacizi sunt precursori ai unor acizi L- α -hidroxicarboxilici, utilizați la sinteza unor peptolide (antibiotice peptidice) [47,320].

Cisteina și metionina, constituenți esențiali ai cheratinei, sunt încorporați în diverse preparate farmaceutice (exemplu Revalid), folosite la tratamentul alopeciei [321]

Studii intense se realizează pentru obținerea de substanțe active cu uz farmaceutic pornind de la triptofan sau metaboliții lui naturali [334].

L- sau D-aminoacizii servesc drept substraturi prochirale în diverse sinteze chimice asimetrice.

Cosmetică

Aminoacizii liberi prezenți la suprafața pielii formează o emulsie stabilă apă-ulei cu materiile sebacee, protejând pielea de umiditate și de influența mediului dăunător. Derivați ai L-cisteinei, S-(carboximetil)-L-cisteină, sunt ingrediente importante ale cremelor de mâini și șampoanelor. Cisteina este utilizată la obținerea soluțiilor de încrețire a părului.

Unele șampoane pentru întreținerea părului uscat conțin hidrolizate de cheratină.

Partea II. Contribuții originale. Separarea unor L-aminoacizi din racemic prin biocataliză cu aminoacilază

După cum rezultă din studiul de literatură, aminoacilaza este o enzimă cu utilizare industrială pentru separarea L-aminoacizilor din amestecurile racemice. Acest lucru permite utilizarea unor metode chimice de sinteză a aminoacizilor, când se obțin amestecuri racemice, urmată de separarea simplă, rapidă și relativ ieftină în enantiomeri, utilizând aminoacilaza I.

Cercetările efectuate au urmărit:

1. Identificarea enzimei aminoacilaza I (ACY I) în diverse țesuturi animale;
2. Identificarea unei tulpini fungice, producătoare de enzimă, cu eliberarea ei în mediul de cultură. Au fost testate ambele variante de obținere a enzimei din culturi microbiene: cultura pe mediu solid și cultura în mediu submers;
3. Purificarea enzimei, fără a urmări o purificare prea avansată, care este laborioasă, necesită aparatură sofisticată și ar costa prea mult;
4. Caracterizarea preparatelor enzimatic native, determinându-se activitatea aminoacilazică, conținutul în proteine și influența unor factori asupra activității enzimatic;
5. Imobilizarea aminoacilazei prin legare covalentă, respectiv ionică pe suporturi insolubile;
6. Caracterizarea preparatelor enzimatic imobilizate, determinându-se activitatea, și influența unor factori asupra activității enzimatic;
7. Utilizarea enzimei imobilizate pentru separarea din amestecul racemic a:
 - D-fenilglicinei (utilizată în industria antibioticelor) și
 - L-metioninei (cu utilizare în industria farmaceutică, alimentară și în zootehnie).

4. Identificarea și izolarea aminoacilazei

4.1. Metode de analiză

Pe parcursul cercetărilor efectuate s-a determinat activitatea aminoacilazică, conținutul în proteine, conținutul în aminoacid, conținutul în sulfat de amoniu.

4.1.1. Determinarea activității aminoacilazei solubile

Activitatea aminoacilazei se exprimă în unități enzimatic (U). O unitate aminoacilazică se definește ca fiind cantitatea de enzimă dintr-un mililitru de extract enzimatic, s-au dintr-un miligram de preparat enzimatic solid, care determină eliberarea unui micromol de L-aminoacid într-un minut, în condiții date, utilizând drept substrat N-acil-L-aminoacidul.

$$\text{Activitatea} = \frac{\mu\text{moli L - aminoacid}}{\text{minute} \times \text{ml extract}} \quad (\text{U/ml})$$

sau

$$\text{Activitatea} = \frac{\mu\text{moli L - aminoacid}}{\text{minute} \times \text{mg preparat}} \quad (\text{U/mg})$$

În cazul în care activitatea se raportează la cantitatea de proteină din extractul lichid sau din preparatul solid, se definește drept *activitate specifică* și se exprimă în unități/mg proteină.

Activitatea aminoacilazei se determină pe baza reacției specifice de hidroliză a N-acil-L-aminoacizilor la L-aminoacizii corespunzători, în condiții standard de pH, temperatură și durată de incubare. De-a lungul timpului s-au folosit diferite substraturi pentru reacția de hidroliză, modul de determinare a activității s-a bazat fie pe determinarea substratului, fie pe cea a produșilor de reacție. De asemenea, exprimarea activității enzimatică, plecând de la aceste metode, nu este unitară, creând probleme la compararea diferitelor produse.

L-aminoacidul format în reacție se poate determina prin una din metodele clasice de analiză a aminoacizilor:

1) Înregistrarea spectrului de absorbție în ultraviolet al aminoacidului, urmărind creșterea intensității benzii de absorbție la lungimea de undă corespunzătoare.

2) Metoda polarimetrică, bazată pe modificarea rotației moleculare a amestecului de reacție în urma formării aminoacidului optic activ.

3) Metoda colorimetrică, bazată pe reacția de oxido-reducere dintre aminoacid și ninhidrină, cu formarea unui compus intens colorat în albastru. Intensitatea colorației formate se determină spectrofotometric la $\lambda=570 \text{ nm}$ [305,332].

4) Metoda fluorimetrică care măsoară fluorescența restului fluorogenic din produsul rezultat în reacția dintre aminoacid și compusul respectiv [333].

5) Metoda cromatografiei HPLC pe coloane chirale [316].

Szewczuk [72] determină în 1972 aminoacilaza în seruri umane, în vederea diagnosticării unor boli hepatobiliare, folosind drept substrat N-cloracetil- γ -L-glutamyl- β -naftilamida care este hidrolizată la cloroacetat și γ -L-glutamyl- β -naftilamidă în prezența acilazei serice. γ -L-Glutamil- β -naftilamida este reacționată în continuare cu glicilglicină în prezența γ -glutamyl transpeptidazei cu formare de γ -glutamyl-glicilglicină și β -naftilamină. Aceasta din urmă este diazotată și cuplată cu o-dianisidină, formând un compus colorat roșu a cărui absorbantă la 520 nm este înregistrată. O unitate de activitate acilazică a fost definită drept cantitatea de enzimă ce a eliberat 1 μmol de β -naftilamină într-un minut, la 37°C și la pH 7,4.

Tot Szewczuk [224] determină în 1978, tot în seruri umane, aminoacilaza, dar folosește drept substrat acidul N-cloroacetil- γ -L-glutamyl-p-aminobenzoic. În rest, metoda este foarte asemănătoare cu precedentă.

În 1982, Szewczuk [328] utilizează o metodă ELISA cu peroxidază cuplată la anticorpii aminoacilazei umane, tot pentru determinarea activității enzimei în seruri umane.

Un patent URSS [329] în 1982 prezintă utilizarea titrării potențiometrice a L-metioninei eliberate din N-acetil-L-metionină în urma reacției de hidroliză enzimatică în prezența aminoacilazei. Pentru o mai netă inflexiune a curbei de titrare și deci pentru o determinare mai exactă, metionina se N-formilează înaintea titrării. De fapt formaldehida este și reactivul utilizat pentru stoparea reacției enzimatică.

Cho utilizează testul optic pentru determinarea activității aminoacilazice renale, fungice și bacteriene [330]. Substratul folosit este acetamidoacrilatul, un aminoacid N-acetil, nesaturat, sintetic. Acesta este hidrolizat la acetat, amoniac și piruvat. Folosind lactat dehidrogenaza, se determină piruvatul prin înregistrarea scăderii absorbției la 340 nm datorată consumului de NADH în reacția de reducere a piruvatului la lactat.

În studiul privind toxicitatea renală a haloalchenelor, Kraus [331] folosește drept substrat pentru determinarea activității aminoacilazice renale S-(4-nitrobenzil)-N-acetil-L-cisteina. Produșii de reacție sunt analizați prin HPLC.

Determinările fluorimetrice sunt foarte rapide și sensibile. Wolfbeis [209] a testat esteri acetici, butirici, caprilici și oleici ai acidului 1-hidroxipiren-3,6,8-trisulfonic, știind că acest acid este un excelent fluorescent. Esterul acetic este cel mai potrivit substrat pentru aminoacilaza renală porcină, înregistrându-se o scădere liniară a fluorescenței în timp.

O variantă a metodei clasice de determinare a activității aminoacilazei I este folosită de Story [142] pentru enzima termostabilă produsă de *Pyrococcus furiosus*. Substratul este N-acetil-L-metionina. Acidul tricloracetic este utilizat pentru stoparea reacției. După centrifugare pentru îndepărtarea proteinei precipitate, L-metionina se determină în supernatant cu reactiv ninhidrină, în tampon acetat-cianură la fierbere și cu adăugare în final de izopropanol pentru o mai bună solubilizare a compusului colorat format.

Determinarea activității enzimei native, metodă utilizată pe parcursul studiului prezentat în continuare, s-a realizat conform metodei prezentate de Chibata și colab.[166]:

Reactivii utilizați în determinări au fost:

- Soluție N-acetil-D,L-aminoacid, 0,1 M, pH 7,5, conținând 1,5 mM CoCl_2 . Ajustarea pH-ului s-a făcut cu soluție de hidroxid de sodiu. Ionul Co^{2+} este activator al aminoacilazei I (ACY). Soluția s-a preparat în laborator din reactivi de puritate analitică (SIGMA, respectiv Chimopar București).

- Tampon fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 0,1 M, pH 7,5 preparat în laborator din reactivi de puritate analitică (Chimopar București).

- Preparatul enzimatic obținut.

Modul de lucru: Amestecul de reacție conține:

- 1 ml tampon fosfat 0,1 M, pH 7,5

- 1 ml N-acetil-D,L-aminoacid, 0,1 M, pH 7,5, conținând 1,5 mM CoCl_2 .

- 1 ml soluție aminoacilază (preparat enzimatic).

Amestecul se incubează exact 30 de minute la 37°C. L-aminoacidul eliberat se determină colorimetric prin metoda cu ninhidrină [305].

Martorul constă din același amestec de reacție, dar nu se realizează incubarea la 37°C ci imediat după amestecarea celor trei componente se colectează proba pentru reacția cu ninhidrină.

Activitatea aminoacilazică se calculează cu formula:

$$a = \frac{c \times 10^3 \times 3}{M \times t} \quad (\text{U/ml})$$

unde - c = mg L-aminoacid determinate din curba de etalonare și corespunzătoare extincției probei

- M = masa moleculară aminoacidului

- 3 = factorul de diluție

- t = timpul de incubare în minute

În cazul exprimării activității enzimatice specifice (per cantitatea de proteină), se utilizează formula:

$$a = \frac{c \times 10^3 \times 3}{M \times t \times p} \quad (\text{U/mg})$$

unde - c, M, 3 și t N au aceeași semnificație ca anterior

- p = concentrația proteică a soluției enzimatice, în mg/ml.

4.1.2. Determinarea aminoacizilor cu ninhidrină [305].

Ninhidrina formează cu aminoacizii un colorant albastru-violet (purpura lui Ruhemann). Reacția este interferată de prezența amoniacului sau a aminelor, care dau aceeași colorație. Colorantul absoarbe specific la 570 nm.

Reactivi utilizați în determinări au fost:

Soluția de ninhidrină utilizată are următoarea compoziție:

- 750 ml metil-celosolv + 250 ml tampon acetat 4N, pH 5,5
- 20 g ninhidrină
- 0,4 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Soluția se prepară și se menține sub pernă de azot. Reactivii utilizați au fost de puritate analitică: metil-celosolv, ninhidrină - SIGMA, acetat de sodiu, acid acetic și SnCl_2 - Chimopar, București.

Modul de lucru: Curba de etalonare s-a realizat utilizând o soluție de L-aminoacid 1 mg/ml, din care s-au luat cote parte ce s-au diluat cu apă. Modul de lucru, atât pentru curba de etalonare cât și pentru proba de analizat este următorul:

- 0,5 ml soluție L-aminoacid (sau amestec de reacție de la determinarea activității enzimaticе);
- 0,5 ml soluție ninhidrină.

Se încălzește pe baie de apă la fierbere 20 minute apoi se diluează cu 19 ml apă distilată. Probele se spectrofotometrează la 570 nm față de un martor realizat în aceleași condiții, dar în care proba a fost înlocuită cu apă distilată sau martorul de la determinarea activității enzimaticе. Din curba de etalonare se determină c N mg aminoacid corespunzătoare absorbției probei.

4.1.3. Determinarea conținutului în proteine - metoda Lowry [334]

Dozarea proteinelor (domeniu 25-500 μg) se bazează pe formarea unui complex cupric între proteină și un reactiv alcalin de cupru (reacția biuretului) și reducerea fosfowolframților și fosfomolibdaților din reactivul Folin-Ciocalteu de către resturile tirozinice din proteină.

Reactivii utilizați în determinări au fost:

- reactiv Folin N Ciocalteu (SIGMA) (diluat 1:2 cu apă distilată înainte de utilizare)
- soluție alcalină A (4 g NaOH, 10g Na_2CO_3 , 0,2 g tartrat dublu de sodiu și potasiu se dizolvă în apă și se aduc la 1000 ml). Soluția a fost preparată în laborator din reactivi de puritate analitică (NaOH N de la Lachema , iar restul Chimopar București)
- soluție B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,5%. Soluția a fost preparată în laborator din reactivi de puritate analitică (Chimopar București).

- reactiv alcalin de cupru - înainte de folosire se amestecă soluția alcalină A cu soluția B în raport volumetric 50:1

- soluție etalon de albumină serică bovină (SIGMA), 1 mg/ml.

Modul de lucru: Curba de etalonare s-a realizat utilizând soluția etalon de albumină, din care s-au luat cote parte ce s-au diluat cu apă. Modul de lucru, atât pentru curba de etalonare cât și pentru proba de analizat, este următorul:

- 0,2 ml soluție proteică (soluția etalon diluată corespunzător sau proba de analizat)
- 5 ml reactiv alcalin de cupru

Se agită energic. Se lasă în repaus 10 minute. Se adaugă:

- 0,5 ml reactiv Folin-Ciocalteu diluat.

Se agită din nou energic. Se mențin probele 30 de minute la temperatura camerei apoi se spectrofotometrează la 660 nm față de un martor în care proba a fost înlocuită cu 0,2 ml apă distilată.

Concentrația proteică, p, se determină cu formula:

$$p = c / V_p \quad (\text{mg/ml})$$

unde: c - mg proteine determinate din curba de etalonare corespunzătoare absorbției probei
V_p- volumul de soluție proteică luat la determinare (în acest caz 0,2 ml)

4.1.4. Determinarea concentrației de sulfat de amoniu - Metoda Nessler

Reactivul Nessler este utilizat pentru determinarea colorimetrică a azotului anorganic în concentrații în domeniul 5-100 μg azot. Reactivul Nessler reacționează cu sarea de amoniu formând un sol coloidal colorat, stabilizat de guma arabică.

Reactivii utilizați pentru determinare au fost:

- reactiv Nessler (Chimopar București)
- soluție gumă arabică (Serva Chemie, Austria) 0,2%
- soluție etalon sulfat de amoniu (Chimopar București) 0,4 mg/ml

Modul de lucru: Curba de etalonare s-a realizat utilizând soluția etalon de sulfat de amoniu, din care s-au luat cote parte ce s-au diluat cu apă. Modul de lucru, atât pentru curba de etalonare cât și pentru proba de analizat, este următorul:

- 5 ml soluție etalon sau soluție de analizat
- 0,2 ml soluție gumă arabică
- 0,5 ml reactiv Nessler

Se agită energic și se lasă 15 minute la temperatura camerei, apoi se citește absorbția probelor la 480 nm față de un martor obținut în aceleași condiții, dar cu înlocuirea probei cu apă distilată. Concentrația în sulfat de amoniu se determină cu formula:

$$C = c / V_p \quad (\text{mg/ml})$$

unde: c - mg sulfat de amoniu determinate din curba de etalonare și corespunzătoare absorbției probei;

V_p- volumul probei luat în determinare (în acest caz 0,5 ml)

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

4.2. Obținerea aminoacilazei I din țesuturi animale

S-a determinat activitatea aminoacilazică în 4 tipuri de țesut (rinichi, inimă, plămân și ficat) recoltate de la șoareci albi (4 indivizi) și porc (2 indivizi).

Mod de lucru: țesutul a fost cântărit, triturat la mojar cu nisip marin și reluat cu tampon fosfat 0,01 M, pH 7,5 (în raport aproximativ 1 g țesut și 50 ml tampon). Amestecul a fost centrifugat 10 min. la 4000 rpm. În supernatant s-a determinat activitatea enzimatică și conținutul în proteine.

Rezultate obținute

Rezultatele obținute în urma extracției țesuturilor și determinarea activității

aminoacilazice sunt prezente în Tabelele 4.1 și 4.2.

În cazul șoarecilor, activitatea acilazică cea mai mare apare la nivelul rinichilor, scăzând apoi la ficat și la inimă. La nivelul plămânului nu s-a decelat în nici unul din cele patru cazuri activitate aminoacilazică.

Tabel 4.1. Activitatea aminoacilazică în extractele de șoarece

Șoarece	Tip țesut	Cantitate g	Proteine		Activitate aminoacilazică		
			mg/ml	mg tot	U/ml extract	mU/mg proteină	mU/mg țesut
1.	Rinichi	0,18	3,45	34,5	0,0510	14,78	2,85
	Inimă	0,13	2,03	20,3	0,0039	1,92	0,29
	Plămân	0,14	1,73	17,3	-	-	-
	Ficat	0,22	3,8	38	0,0121	3,18	0,53
2.	Rinichi	0,19	3,3	33	0,0375	11,36	1,89
	Inimă	0,17	2,53	25,3	0,0041	1,62	0,24
	Plămân	0,20	1,83	18,3	-	-	-
	Ficat	0,17	3,2	32	0,0078	2,44	0,44
3.	Rinichi	0,22	2,89	28,9	0,0576	19,93	2,54
	Inimă	0,15	2,25	22,5	0,0037	1,64	0,23
	Plămân	0,17	1,37	13,7	-	-	-
	Ficat	0,18	2,66	26,6	0,0114	4,28	0,60
4.	Rinichi	0,20	3,50	35,0	0,0096	2,74	0,47
	Inimă	0,14	1,77	17,7	0,0005	0,26	0,03
	Plămân	0,15	1,53	15,3	-	-	-
	Ficat	0,16	3,69	36,9	0,0094	2,55	0,6

Tabel 4.2. Activitatea aminoacilazică în extractele de porc

Porc	Tip țesut	Cantitate g	Proteine		Activitate aminoacilazică		
			mg/ml	mg tot	U/ml extract	mU/mg proteină	mU/mg țesut
1.	Rinichi	0,200	2,34	23,4	0,547	233,76	27,35
	Inimă	0,190	1,93	19,3	0,136	70,46	7,16
	Plămân	0,190	1,91	19,1	0,053	27,75	2,79
	Ficat	0,200	2,87	28,7	0,159	55,40	7,95
2.	Rinichi	0,190	3,26	32,6	0,608	186,50	32,0
	Inimă	0,190	1,73	17,3	0,131	75,72	6,89
	Plămân	0,200	1,78	17,8	0,049	27,5	2,45
	Ficat	0,200	3,13	31,3	0,189	60,38	9,45

În cazul țesuturilor de porc se menține aceeași ordine în cazul regăsirii activității aminoacilazice. Activitatea cea mai mare apare în cazul rinichiului (dar de aproximativ 15 ori mai mare decât în cazul rinichiului de șoarece) urmând apoi inima, ficatul, plămânul. Se observă că activitatea în inimă este mai mare în acest caz decât cea în ficat și de asemenea apare activitate aminoacilazică și în plămân.

4.3. Obținerea aminoacilazei din culturi de funghi. Stabilirea condițiilor optime de cultură

4.3.1. Identificarea unor tulpini producătoare de aminoacilază [335,336]

Literatura prezintă o serie de tulpini de funghi producătoare de aminoacilază. Cel mai des utilizată, datorită cantității mari de enzimă eliberată în mediul de cultură, este *Aspergillus oryzae*.

Au fost testate un număr de 3 tulpini de *Aspergillus oryzae* (una furnizată de Institutul Cantacuzino București iar celelalte două izolate și caracterizate în laboratorul nostru) și 8 tulpini de *Aspergillus niger* (două de la Institutul Cantacuzino București, câte una de la Combinatul Petrochimic Solventul Timișoara, Institutul Pasteur București, ICATCC București, respectiv ICEBIOL București și două izolate și caracterizate în laboratorul nostru).

Mediile Sabouraud solid și lichid și mediul Czapek au fost tip reactiv de la Institutul Cantacuzino București. Tărâțele de grâu și cojile de orez au fost furnizate de Moara din Timișoara.

O schemă generală de obținere a aminoacilazei, pornind de la liofilizat până la extragerea enzimei din mediul de cultură este prezentată în Fig. 4.1.

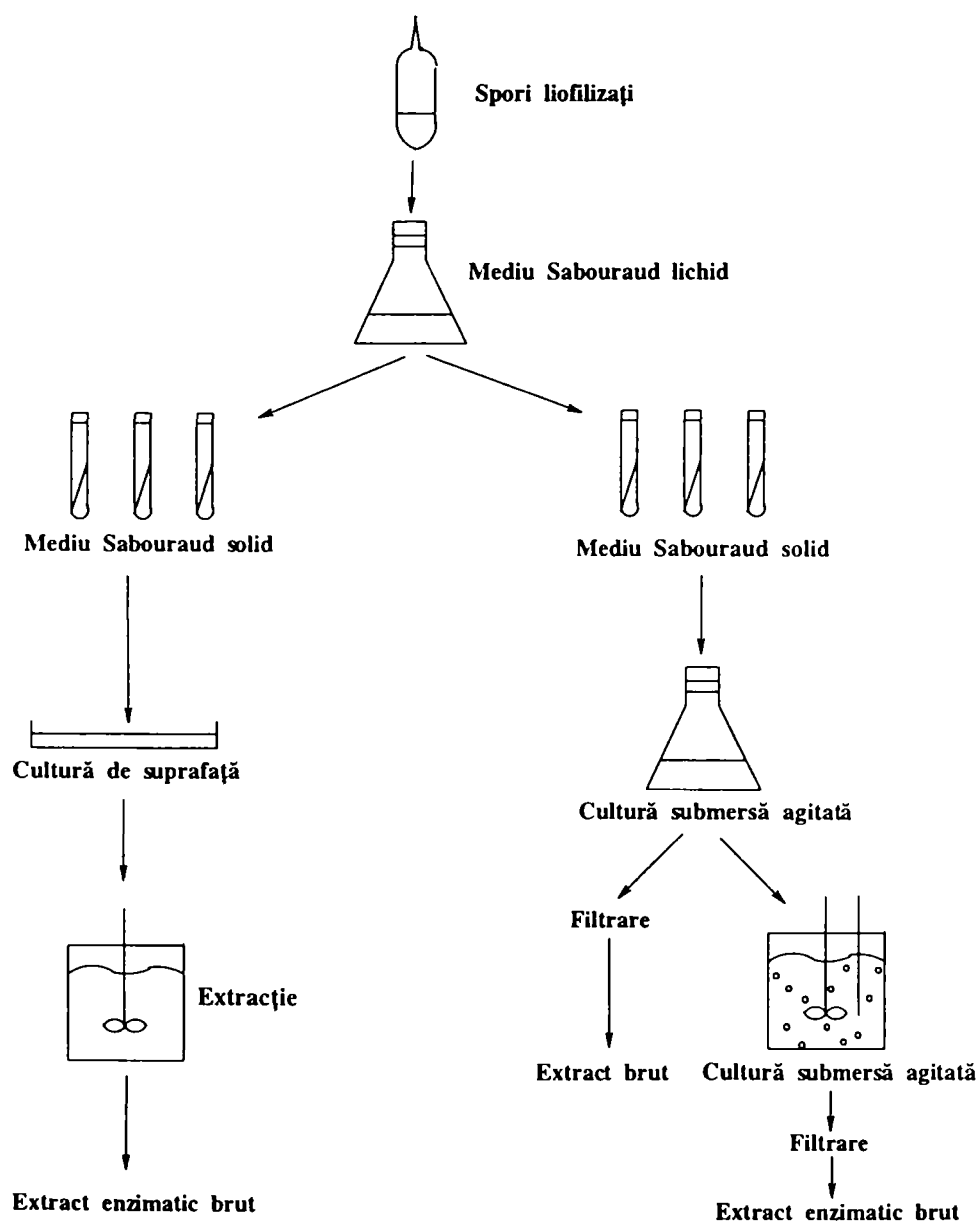


Figura 4.1. Schemă generală de obținere a extractului enzimatic aminoacilazic

Modul de lucru: Tulpinile primite au fost fie în formă liofilizată, fie crescute pe mediu Sabouraud solid. Au fost pasate prima dată pe mediu Sabouraud lichid și incubate la 30°C până la sporulare totală. Sporii au fost trecuți pe mediu Sabouraud solid și tulpinile au fost incubate la 30°C până la sporulare totală. Următoarea fază a fost de cultivare pe un mediu solid natural. Acesta a constat din 17 g tărâțe de grâu și 9 g coji de orez, în flacoane conice de un litru. Mediul a fost sterilizat de 2 ori câte 20 minute la 2 atm în autoclavă. În fiecare flacon au fost inoculați sporii raclați de pe 2 tuburi (Sabouraud solid) cu câte 10 ml apă sterilă. Flacoanele cu ciuperca inoculată au fost incubate în termostat la 30°C, cu agitare în fiecare zi a mediului, timp de 5 zile.

Extracția aminoacilazei din mediul de cultură s-a realizat cu apă distilată. În fiecare flacon s-au adăugat 250 ml apă distilată și s-au agitat timp de 2 ore pe o masă agitatoare sistem dute-vino. Suspensia obținută s-a filtrat pe tifon, apoi filtratul a fost centrifugat la 4°C, 15 minute la 3000 rpm. În supernatantul obținut s-a determinat activitatea aminoacilazică și conținutul în proteine.

Din toate tulpinile testate doar tulpina de *Aspergillus oryzae*, furnizată de Institutul Cantacuzino București a prezentat activitate aminoacilazică. În continuare s-a lucrat numai cu această tulpină în toate testele realizate.

4.3.2. Stabilirea condițiilor optime de cultură pe mediu solid

S-a lucrat cu tulpina de *Aspergillus oryzae* furnizată de Institutul Cantacuzino București în formă liofilizată sau în tuburi pe mediu Sabouraud solid. Din tuburile liofilizate, tulpina a fost trecută inițial pe mediu Sabouraud lichid, apoi în tuburi pe mediu înclinat Sabouraud solid.

Modul de lucru a fost următorul:

a) Mediul de cultură al *Aspergillus oryzae*

Ciuperca a fost crescută în flacoane conice de 1 litru pe un mediu alcătuit din:

- 17 grame tărâțe de grâu
- 9 grame coji de orez

Mediul a fost sterilizat de 2 ori câte 20 minute la 2 atm în autoclavă. În fiecare flacon au fost inoculați sporii raclați de pe 2 tuburi (Sabouraud solid) cu câte 10 ml apă sterilă. Flacoanele cu ciuperca inoculată au fost incubate în termostat la 27°C, cu agitarea mediului în fiecare zi.

b) Extracția aminoacilazei din mediul de cultură

S-a realizat cu apă distilată. În fiecare flacon s-au adăugat 250 ml apă distilată și s-au agitat timp de 2 ore pe o masă agitatoare sistem dute-vino. Amestecul obținut a fost filtrat pe tifon, apoi filtratul a fost centrifugat la 4°C, 15 minute la 3000 rpm. În supernatantul obținut s-a determinat activitatea enzimatică și conținutul în proteine.

c) Influența mediului de cultură a *A. oryzae* (inocul)

S-au testat trei medii artificiale, respectiv naturale, pentru înmulțirea ciupercii (crearea inoculului): cartof, Czapek și Sabouraud. De pe cultura pe mediul Sabouraud lichid, tulpina a fost inoculată în tuburi pe cele trei medii, apoi a fost incubată 7 zile la 27°C. Sporii obținuți au fost trecuți pe mediul natural de tărâțe și s-au incubat 5 zile la 27°C cu agitare zilnică. A urmat extracția și determinarea conținutului în proteine și a activității aminoacilazice conform metodologiei prezentate anterior.

d) Influența timpului de creștere a ciupercii pe mediul Sabouraud

Deoarece tulpina de *A. oryzae* de care s-a dispus nu a fost testată pentru obținerea de aminoacilază, s-au căutat condițiile optime de cultură pentru a obține un extract enzimatic cu activitate cât mai mare. De aceea, în primul rând s-a testat timpul de creștere al tulpinii pe

mediul Sabouraud solid. După inocularea ciupercii, tuburile s-au incubat un număr diferit de zile la 27°C. Ciuperca de pe fiecare tub a fost apoi inoculată pe mediul de tărâțe și incubată 5 zile la 27°C, cu agitare zilnică. A urmat apoi extracția enzimei și analiza, conform metodologiei prezentate anterior.

e) Influența timpului de creștere a ciupercii pe mediul natural de tărâțe

Flacoanele conice cu mediul natural de tărâțe au fost inoculate cu ciupercă crescută pe mediul Sabouraud solid timp de 7 zile. Flacoanele s-au incubat un număr diferit de zile la 27°C, cu agitare zilnică. Ciuperca a ajuns în faze diferite de dezvoltare N de la nesporulat la sporulat total. Mediul a fost extras după metoda prezentată anterior și în extracte s-a determinat conținutul în proteine și activitatea aminoacilazică.

f) Influența introducerii unor promotori în mediul de cultură natural de tărâțe

Se știe că la unele microorganisme sinteza unei enzime poate fi indusă prin prezența în mediul de cultură a unui promotor (în general substratul, dar poate fi și produsul de reacție); de aceea s-a încercat introducerea în mediul de cultură a unor cantități diferite de L-metionină (Sigma) și, respectiv N-acetil-D,L-metionină (Sigma). S-au preparat soluții de concentrații diferite, s-au sterilizat și s-au folosit la raclarea ciupercii de pe tuburile cu mediul Sabouraud (inoculul pentru mediul de cultură natural). Flacoanele s-au incubat apoi 5 zile la 27°C, cu agitare în fiecare zi. Pentru extracția enzimei s-a folosit metoda prezentată. În extracte s-a determinat conținutul în proteine și activitatea aminoacilazică.

Rezultate obținute

a) Mediul de cultură pentru *A.oryzae* are influență asupra cantității de enzimă produsă. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 4.3.

Se observă că activitatea maximă o prezintă extractele enzimatice obținute la înmulțirea ciupercii pe mediul Sabouraud, aceasta fiind de 9 ori mai mare ca pe mediul cartof și de 5,7 ori mai mare ca pe mediul Czapek.

Tabel 4.3. Influența mediului de cultură a *A.oryzae* asupra producerii de aminoacilază

Mediul de cultură	Proteine mg/ml	Activitate enzimatică		
		U/ml extract	U/mg proteină	U/g mediu
Cartof	0,98	0,08	0,08	0,30
Czapek	0,44	0,13	0,29	0,97
Sabouraud	1,99	0,74	0,37	1,70

b) În ceea ce privește influența timpului de creștere al tulpinii pe mediul Sabouraud solid, se poate observa în Tabelul 4.4 că activitatea aminoacilazică maximă (0,12 U/ml) o prezintă extractul enzimatic la creșterea timp de 7 zile a ciupercii în vederea obținerii inoculului. Un timp mai lung sau mai scurt de 7 zile duce la o scădere mare a activității (aproape de 2 ori la 6 și 8 zile). După o creștere de 7 zile ciuperca este complet sporulată.

La culturile ulterioare s-a creat inoculul prin incubarea tulpinii de *Aspergillus oryzae* timp de 7 zile la 27°C pe mediul Sabouraud solid.

Tabel 4.4. Influența timpului de creștere pe mediu Sabouraud solid asupra producerii de aminoacilază

Timp de creștere zile	Proteine mg/ml	Activitate enzimatică		
		U/ml extract	U/mg proteină	U/g mediu
1	1,607	0,04	0,025	0,094
2	1,903	0,03	0,015	0,063
3	1,353	0,02	0,014	0,012
4	1,809	0,02	0,011	0,059
5	1,660	0,07	0,042	0,160
6	1,890	0,12	0,063	0,032
7	1,465	0,07	0,048	0,190
8	0,957	0,04	0,041	0,130
9	1,444	0,06	0,041	0,130
10	1,054	0,03	0,028	0,090
11	1,503	0,09	0,059	0,230

c) Tulpina crescută pe mediu Sabouraud timp de 7 zile a fost apoi inoculată pe mediul natural de tărâțe, unde a fost incubată între 2 și 8 zile. Activitatea aminoacilazică prezentă în extractul mediului de cultură este prezentată în Tabelul 4.5. Din tabel se observă un salt brusc al activității enzimatice la 5 zile de creștere pe mediul de tărâțe (de 4 ori față de valoarea la 4 zile). Tulpina este complet sporulată, întreaga masă de tărâțe fiind cuprinsă de miceliul sporulat. La 8 zile se observă o creștere doar de 1,2 ori față de ziua a 5-a. Pentru a scurta procesul de obținere a enzimei (dar și pentru a evita pericolul infectării cu microorganisme nedorite, în special Bacillus sp.) s-a ales timpul de 5 zile pentru creșterea tulpinii pe mediul natural.

Tabel 4.5. Influența timpului de creștere pe mediul natural de tărâțe asupra activității enzimatice

Timp creștere zile	Proteine mg/ml	Activitate enzimatică		
		U/ml extract	U/mg proteină	U/g mediu
1	1,200	0,043	0,036	0,102
2	1,490	0,043	0,029	0,109
3	1,438	0,064	0,044	0,202
4	2,196	0,270	0,120	0,540
5	3,303	0,280	0,084	0,560
6	3,325	0,300	0,090	0,540
7	2,570	0,340	0,130	0,680

În continuare, la toate culturile realizate, s-a procedat la o incubare timp de 5 zile la 27°C pe mediul de tărâțe.

d) Din rezultatele experimentale obținute se poate presupune că aminoacilaza este o enzimă inductibilă. Adăugarea în mediul de cultură a L-metioninei la o concentrație de aproximativ 0,2 mg/g mediu de cultură a dus la o creștere substanțială a activității enzimatice, de 6 ori față de cultura neindusă. Mărirea cantității de metionină peste această valoare a dus la scăderea activității (Tabel 4.6.).

Tabel 4.6. Influența prezenței L-metioninei în mediul de cultură asupra activității enzimaticice

Concentr. L-Met		Proteine mg/ml	Activitate aminoacilazică		
g/l	mg/g mediu		U/ml extract	U/mg proteină	U/g mediu
0	0	1,37	0,25	0,18	0,58
0,10	0,08	1,64	0,28	0,17	0,62
0,25	0,20	1,30	1,54	1,18	3,70
0,40	0,32	1,40	0,37	0,26	0,79

În schimb introducerea de N-acetil-D,L-metionină (substratul enzimei) în mediul de cultură duce la o scădere de aproximativ de 2 ori a activității enzimaticice, fără influență în ceea ce privește variația concentrației de N-acetil-D,L-metionină (Tabel 4.7).

S-ar putea presupune că reacția de hidroliză a N-acetil-L-metioninei este reversibilă (caz întâlnit la majoritatea reacțiilor enzimaticice) și că enzima are, în vivo, mai dezvoltată puterea de acetilare a aminoacizilor decât cea de hidroliză a N-acetil-L-aminoacizilor.

În continuare cercetările s-au orientat spre stabilirea unor condiții optime pentru a obține aminoacilaza în cantități mai mari.

Tabel 4.7. Influența prezenței N-acetil-D,L-metioninei în mediul de cultură asupra activității enzimaticice

N-acetil-D,L-Met		Proteine mg/ml	Activitate aminoacilazică		
g/l	mg/g mediu		U/ml extract	U/mg proteină	U/g mediu
0	0	1,663	0,196	0,118	0,42
0,2	0,16	1,632	0,070	0,043	0,155
0,4	0,32	1,799	0,094	0,052	0,201
0,6	0,48	1,702	0,097	0,057	0,207

4.3.3. Obținerea aminoacilazei din culturi de *A. oryzae* pe mediu solid [337,338,339]

Mod de lucru: Cultura de *A. oryzae* în fază solidă a fost realizată în tăvi de oțel inox, cu dimensiunile 240 x 200 x 70 mm, prevăzute cu capac din același material și care depășește cu 2 mm marginea tăvii.

Mediul de cultură a constat din:

- 400 g tărâțe de grâu

- 200 g coji de orez

- 480 ml soluție L-metionină 2.5g/l în apă distilată. Mediul a fost omogenizat apoi sterilizat în autoclavă la 120°C și 2 atm timp de 2 ore, de 2 ori la interval de 24 de ore. În fiecare tavă au fost inoculați sporii de *A. oryzae* raclați de pe două tuburi cu mediu Sabouraud solid. Materialul a fost din nou omogenizat și incubat 5 zile la 27 °C. După 36 ore capacele au fost înlăturate și tăvile au fost învelite în hârtie pentru a evita infectarea. În fiecare zi materialul a fost omogenizat din nou.

După 5 zile materialul din tavă a fost transferat într-un reactor prevăzut cu agitator cu palete. Enzima a fost extrasă cu 12 l apă distilată, sub agitare, timp de 2 ore. Extractul a fost filtrat prin tifon apoi centrifugat la 4°C, 15 minute la 3000 rpm.

Rezultate obținute

Având în vedere faptul că ciuperca se dezvoltă cu atât mai bine cu cât aerarea este mai eficientă, s-au realizat o serie de experimente în care s-a variat cantitatea de mediu introdusă într-o tavă, menținându-se raportul între componente și ajustând corespunzător volumul de inocul și de apă de extracție.

În Tabelul 4.8. sunt prezentate rezultatele medii obținute pentru 3 culturi pentru fiecare cantitate de mediu.

Tabelul 4.8. Influența cantității de mediu de cultură asupra activității aminoacilazice

Cantitate mediu g	Nr. tavi	Volum extract ml	Proteine mg/ml	Activitate enzimatică		
				U/ml extract	U/mg proteine	U/g mediu
300	2	4 150	3,00	0,150	0,050	1,03
450	3	11 000	3,12	0,145	0,047	1,20
600	3	15 000	2,21	0,155	0,070	1,33

Din tabel se observă că, în ceea ce privește activitatea enzimatică, exprimată în U/ml extract, nu sunt diferențe deosebite. În experimentele în care s-a folosit o cantitate maximă de mediu se observă o activitate specifică (U/mg proteină) mai mare, ceea ce denotă o productivitate mai mare a enzimei. Aceasta s-ar putea explica prin faptul că, în cazul unei cantități mai mari de mediu, are loc o sporulare mai puțin intensă, cantitatea de proteină produsă este mai mică față de cantitatea de enzimă, fapt ce se reflectă și în extractul apos.

Având în vedere rezultatele obținute, în continuare culturile au fost realizate pe o cantitate maximă de mediu (600g/tavă). Deoarece L-metionina este un aminoacid scump, restul culturilor au fost făcute fără L-metionină. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 4.9. (La fiecare experiment s-a lucrat cu trei tăvi).

Tabel 4.9 Activitate aminoacilazică obținută din culturi solide de *A. oryzae*

Nr. crt.	Volum extract ml	Proteine mg/ml	Activitate enzimatică	
			U/ml	U/mg proteină
1	15 100	2,03	0,150	0,074
2	15 000	2,10	0,146	0,069
3	15 300	1,95	0,138	0,071
4	15 250	2,03	0,140	0,069
5	14 900	2,25	0,152	0,067
6	15 050	2,08	0,136	0,065
7	15 150	2,10	0,128	0,061
8	15 200	2,03	0,148	0,073
Medie	15 120	2,07	0,142	0,068

Se poate observa, așa cum era de așteptat, că activitatea aminoacilazică obținută în acest caz este mai mică decât în cazul introducerii L-metioninei în mediul de cultură, dar rezultatele sunt constante.

Extractele enzimatiche obținute în cadrul acestor experimente au fost utilizate ulterior pentru studii de purificare, cinetică și imobilizare.

4.3.4. Obținerea aminoacilazei din culturi de *A. oryzae* pe medii submerse [340]

Având în vedere avantajele deosebite ale culturii submerse față de cultura în fază solidă (spațiu mic, productivitate mare, conducere eficientă a procesului, posibilitate de control a producerii enzimei pe parcursul culturii, securitatea muncii sporită) s-a încercat obținerea de aminoacilază prin cultură în fază submersă a ciupercii *A.oryzae*.

4.3.4.1. Culturi submerse statice

S-au utilizat flacoane conice de 1 litru, obturate cu dop de vată. Mediile de cultură au cuprins surse naturale sau artificiale de carbon și azot la care s-au adăugat diferite săruri minerale și substanțe cunoscute sau apreciate ca fiind inductori enzimatici. Reactivii utilizați pentru obținerea mediilor de cultură au fost: peptonă, cazeină, gelatină, extract de drojdie, glucoză de la Merck, L-metionină și N-acetil-D,L-metionină de la Sigma, amidon, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , KH_2PO_4 , CoCl_2 , NaNO_3 , NH_4Cl , FeSO_4 , MgSO_4 , NaCl , $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, HCl , acid benzoic, acetat de benzil de la Chimopar București și au fost de puritate analitică. Fasolea degresată s-a obținut în laborator prin tratarea făinii de fasole cu acetonă, filtrare și apoi uscare în aer.

Mediile de cultură utilizate au fost:

Mediul 1

6g coji orez
4,5g făină porumb
0,05g L-metionină

Mediul 2

24 ml extract fasole
1,5g peptonă
1,5g amidon
0,05g L-metionină

Mediul 3

1,5g făină porumb
1,5g amidon
16 ml extract fasole
0,05g L-metionină

Mediul 4

4,5g tărâțe grâu
3g făină porumb
0,05g L-metionină

Mediul 5

4,8g coji de orez
10,2g tărâțe grâu
0,05g L-metionină

Mediul 6

7,5g glucoză
1,5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0,05g MgSO_4
0,05g KH_2PO_4
0,01g CoCl_2
0,05g L-metionină

Mediul 7

4,5g amidon
1g fasole degresată
1,8g cazeină
0,75g gelatină
0,4g extract drojdie
0,4g KH_2PO_4

0,15g NaNO_3
0,15g NH_4Cl
0,0015g FeSO_4
0,0015g CoCl_2
0,2g MgSO_4

Mediul 8
2g făină de orez
0,5g cazeină
0,2g MgSO₄
0,05g KH₂PO₄
0,01g NaNO₃

Mediul 9
1,8g tărâțe grâu
0,9g coji orez
1g fasole degresată
0,01g CoCl₂
0,05g L-metionină

Mediul 10
1,8g tărâțe grâu
0,9g coji orez
1g fasole degresată
0,01g CoCl₂
0,05g L-metionină
0,01g acid benzoic

Mediul 11
1,8g tărâțe grâu
0,9g coji orez
1g fasole degresată
0,01g CoCl₂
0,05g L-metionină
0,01g acetat de benzil

Mediul 12
1,8g tărâțe grâu
0,9g coji orez
1g fasole degresată
0,01g CoCl₂
0,05g L-metionină
0,01g N-acetil-D,L-metionină

Mod de lucru: În fiecare flacon s-au adăugat 150 ml apă distilată (respectiv s-a adus volumul la 150 ml în cazul mediilor 2 și 3 și s-a ajustat pH-ul la 5,5 cu HCl 0,1M. Flacoanele au fost apoi sterilizate la 120°C și 2 atm, în autoclavă, timp de o oră, de două ori la interval de 24 de ore. În fiecare flacon s-au inoculat spori raclați de pe 1 tub de cultură pe mediu Sabouraud solid.

După inoculare, flacoanele s-au menținut la 30°C timp de 4 zile, agitându-se de 2-3 ori pe zi. Apoi mediile de cultură au fost filtrate pe hârtie de filtru iar filtratele au fost centrifugate 30 minute la 5000 rpm. După centrifugare, în supernatante s-a determinat conținutul în proteine și activitatea aminoacilazică.

Rezultate obținute

Rezultatele obținute pentru cele 12 medii de cultură testate sunt prezentate în Tabelul 4.10. În urma testelor microscopice și chimice se pot trage următoarele concluzii:

- în toate mediile de cultură folosite ciuperca s-a dezvoltat bine, observându-se început de sporulare după 4 zile;

- activitate aminoacilazică au prezentat culturile pe mediile 2, 3, 5 și 9, fapt ce denotă efectul inductiv al cojilor de orez și al extractului de fasole;

- cantitatea de aminoacilază produsă (0,09 U/g mediu) este mult inferioară (de 10-15 ori) celei obținute pe mediu solid în tăvi;

- datorită vâscozității mari, mediul 5 a favorizat sporularea cea mai intensă. Acest lucru, corelat cu activitatea specifică cea mai mare obținută pe acest mediu și cu rezultatele obținute în cazul culturilor în fază solidă indică faptul că producerea de aminoacilază este un fenomen legat de procesul de sporulare;

- conținutul scăzut în proteine și absența activității aminoacilazice la culturile 10, 11, 12 demonstrează efectul inhibitor al acidului benzoic, acetatului de benzil și N-acetil-D,L-metioninei;

- în cazul culturii pe mediul 9, activitatea specifică enzimatică este mai mică față de cea obținută pe mediul 5 datorită, probabil, conținutului mai scăzut în sursa de carbon;

- se observă că randamentul activității enzimatice per gram mediu a crescut, ajungând la 0,16 U/g mediu, rămânând totuși de 8 ori mai scăzut decât cel obținut în fază solidă.

În urma acestor rezultate se constă că în medii submerse statice, fără agitare și aerare, *A. oryzae* secretă o cantitate foarte mică de aminoacilază și aceasta doar când mediul de cultură este format din aproximativ aceleași componente ca cele din mediul de cultură solid.

Tabel 4.10. Influența mediului de cultură la culturile submerse statice

Mediu nr.	pH final	Proteine mg/ml	Activitate enzimatică		
			U/ml	U/mg proteină	U/g mediu
1	4,0	1,18	-	-	-
2	5,1	5,40	0,023	0,0042	0,09
3	4,1	7,17	0,027	0,0037	0,087
4	5,0	1,17	-	-	-
5	5,5	2,53	0,026	0,01	0,06
6	2,5	0,48	-	-	-
7	4,2	3,4	-	-	-
8	4,1	2,8	-	-	-
9	5,0	2,3	0,005	0,002	0,16
10	5,1	1,7	-	-	-
11	5,1	1,5	-	-	-
12	5,2	1,4	-	-	-

4.3.4.2. Culturi submerse agitate

Culturile s-au realizat tot în flacoane conice de 1 litru. În urma rezultatelor obținute la culturile submerse statice s-au testat doar 3 medii de cultură:

Mediul 1

2,7g coji orez
0,54g făină fasole
0,75g NaCl
0,075g (NH₄)₃PO₄

Mediul 2

2g tărâțe grâu
0,5g coji orez

Mediul 3

3g tărâțe grâu
1,5g făină fasole

Mod de lucru: În fiecare flacon s-au adăugat 150 ml apă distilată și s-a corectat pH-ul la 5,5 cu HCl 0,1N. Modul de sterilizare și inoculare a fost identic cu cel al culturilor submerse statice.

După inoculare flacoanele au fost incubate 3 zile la 30°C cu agitare pe o masă agitoare tip dute-vino, cu o frecvență de 60 curse/minut.

După 3 zile mediile de cultură au fost prelucrate în mod identic cu cele obținute la culturile statice.

S-a studiat, de asemenea, dependența producerii de aminoacilază de timpul de incubare la culturile submerse agitate.

Mediul de cultură utilizat a fost cel cu rezultatele cele mai bune obținute în cadrul culturilor submerse agitate, și anume mediul 3.

Pentru studiu au fost prelevate probe la intervale de 24 ore care au fost prelucrate și analizate în modul prezentat la culturile submerse statice.

Rezultate obținute

Aceste culturi au avantajul că realizează o aerare continuă a mediului, permițând o mai bună dezvoltare a ciupercii.

Rezultatele obținute pentru cele trei medii de cultură testate sunt prezentate în Tabelul 4.11. (S-au testat 2 probe în paralel)

Tabel 4.11 Influența mediului de cultură la culturile submerse agitate

Mediu nr.	pH final	Proteine mg/ml	Activitate enzimatică		
			U/ml	U/mg proteină	U/g mediu
1	5,2	0,76	0,026	0,034	0,70
	5,3	0,80	0,019	0,024	0,52
2	5,5	0,99	0,021	0,021	0,84
	5,5	1,03	0,045	0,044	1,94
3	5,4	1,52	0,075	0,049	1,51
	5,2	1,97	0,101	0,051	2,40

Din Tabelul 4.11. se observă că prin procedeul culturilor submerse agitate se obțin cantități mai mari de aminoacilază decât în cadrul culturilor statice. Rezultatele cele mai bune s-au obținut în cazul mediului de cultură 3 (ce conține doar tărațe de grâu - sursa de carbon, și făină de fasole - sursa de azot). Activitatea specifică (U/mg proteină) este de 5 ori mai mare iar cea per gram mediu de cultură de 3 ori mai mare decât cea obținută pentru mediul 5 din experimentul pe culturi statice.

Pornind de la aceste rezultate s-a realizat o cultură pe 16 flacoane conținând mediul 3 de cultură. Probele s-au prelucrat prin unirea mediilor de cultură(6; 6 și 4). Rezultatele obținute sunt prezente în Tabelul 4.12.

Tabel 4.12. Culturi submerse pe mediul 3

Nr. Flacoane	Proteine mg/ml	Activitate enzimatică		
		U/ml	U/mg proteină	U/g mediu
6	2,96	0,074	0,025	2,0
6	2,05	0,118	0,057	2,7
4	3,05	0,071	0,023	1,9

După cum se poate observa, există o bună reproductibilitate a biosintezei aminoacilazei în mediul de cultură cu fasole și tărațe de grâu. Randamentele obținute sunt, în general, în jur de 2U/g și au o valoare cu 30-50% mai mare decât în cazul culturii pe mediu solid (1,03 -1,33U/g mediu) și de 20-30 ori mai mare decât în cazul culturi submerse statice (0,06-0,16 U/g mediu).

Culturile microbiene cuprind, în general, trei faze de dezvoltare - o primă fază de lag, cu dezvoltare înceată, apoi o fază explozivă, cu înmulțirea foarte rapidă a microorganismului, urmată de o fază staționară sau descrescătoare în cazul în care se epuizează resursele din mediul de cultură.

În cazul testului realizat pentru urmărirea producerii de aminoacilază în timp, rezultatele sunt prezentate în Tabelul 4.13.

Tabel 4.13. Influența timpului de incubare la culturile submerse agitate asupra producerii de aminoacilază

Timp incubare ore	Proteine mg/ml	Activitate enzimatică	
		U/ml	U/mg proteină
24	1,21	-	-
48	1,49	-	-
72	1,44	0,063	0,043
96	2,04	0,145	0,071
120	2,53	0,147	0,058

Tulpina s-a dezvoltat din prima zi foarte bine, dar a început eliberarea în mediul de cultură a enzimei abia în ziua a treia. Maximul de activitate specifică (U/mg proteină) s-a obținut la 96 de ore, după care activitatea specifică are tendință de scădere, crescând cantitatea de proteină din mediu.

4.2.4.3. Cultură submersă în fermentator

Deoarece la culturile submerse în flacoane agitate s-au obținut rezultate relativ bune, s-a încercat obținerea de aminoacilază în cantitate mai mare prin cultivarea tulpinii de *A. oryzae* într-un reactor de 30 litri. Reactorul a fost prevăzut cu agitator mecanic cu palete, cu o turație de 112 rot/min. La partea inferioară a fost prevăzut cu un sistem de barbotare a aerului printr-o frită.

Mod de lucru: Reactorul a fost sterilizat prin barbotare de abur de 2 atm timp de 2 ore. Aerul introdus în mediul de cultură a fost sterilizat prin trecere printr-un sistem de 3 filtre cu cărbune activ. Debitul de aer utilizat pe parcursul culturii a fost de 200-300 l/oră.

Mediul de cultură (300 g tărâțe de grâu, 150 g fasole pudră și 15 litri apă de robinet) a fost sterilizat în autoclavă de 2 ori câte o oră la 1,5 atm, la interval de 24 ore. Inoculul a constat dintr-o cultură tip 3 (vezi cap. 4.3.4.2) în flacon de 1 litru.

Mediul de cultură sterilizat a fost introdus în reactor, s-a pornit agitarea și aerarea. pH-ul mediului a fost ajustat la 5,5 cu amoniac soluție 1,5% și a fost menținut la această valoare pe tot parcursul cultivării prin adăugare de amoniac 1,5 %. A fost introdus inoculul. Pe tot parcursul cultivării temperatura a fost menținută la 30°C. Periodic s-au recoltat probe care au fost centrifugate 20 minute la 3000 rpm la 4°C. În supernatante s-a determinat conținutul în proteine și activitatea aminoacilazică.

Rezultate obținute

S-au realizat 3 asemenea culturi. Din motiv de proastă sterilizare două dintre culturi s-au infectat cu *Bacillus*. A treia cultură s-a realizat în condiții mai bune, fără infectare. După 24 ore, ciuperca a început să se dezvolte rapid și mediul de cultură s-a îngroșat considerabil. După 5 zile ciuperca a fost în faza de sporulare. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 4.14.

Tabel 4.14. Cultură submersă de *A.oryzae* în fermentator

Timp incubare ore	Proteine mg/ml	Activitate enzimatică	
		U/ml	U/mg proteină
48	1,328	-	-
74	0,805	0,005	0,006
90	0,668	0,014	0,021
110	0,332	0,060	0,181
125	1,296	0,108	0,083

Cultura în reactor se comportă asemănător cu cea în flacoane agitate. Abia după 72 ore ciuperca începe să elibereze în mediul de cultură aminoacilaza. Dar, probabil datorită aerării mai bune, activitatea specifică maximă obținută în acest caz (0,181 U/mg) este de peste 2,5 ori mai mare decât la flacoanele agitate. Peste 110 ore de cultivare cantitatea de proteine este foarte mare în mediul de cultură și ca urmare activitatea specifică aminoacilazică începe să scadă. De fapt, un timp de cultivare prea îndelungat mărește foarte mult riscul de infectare.

4.4. Concluzii

Din datele experimentale obținute se pot trage următoarele concluzii:

1. În țesuturile animale testate aminoacilaza are o activitate mare în rinichi și mai scăzută în ficat și inimă. În plămâni activitatea este mult mai mică (în cazul țesutului de porc) sau inexistentă la șoarece.
2. Tulpina producătoare de aminoacilază care a fost selectată este cea furnizată de Institutul Cantacuzino București.
3. Mediul de cultură optim pentru obținerea unui inocul este mediul Sabouraud solid.
4. Aminoacilaza este o enzimă extracelulară în cazul microorganismului *Aspergillus oryzae*.
5. Timpul optim de creștere a tulpinii de *Aspergillus oryzae* pe mediu de cultură Sabouraud solid, pentru a obține o activitate aminoacilazică maximă este de 7 zile.
6. În cazul creșterii *Aspergillus oryzae* pe mediu natural de tărâțe, timpul optim de creștere este de 5 zile, peste această perioadă nu se mai înregistrează creșteri semnificative ale activității enzimaticice.
7. Sinteza enzimei (pentru cultura de *Aspergillus oryzae*) este indusă de prezența în mediul de cultură a L-metioninei (0,2 mg/g mediu) și nu a N-acetil-D,L-metioninei, ceea ce ar putea duce la concluzia că in vivo predomină reacția de acilare și nu cea de hidroliză a produsului acilat.
8. Neintroducerea L-metioninei duce la scăderea sintezei de enzimă de la 1,18 U/mg la 0,05-0,07 U/mg.
9. Obținerea aminoacilazei în cantități mari este posibilă prin cultivarea pe mediu solid de tărâțe de grâu și coji de orez.
10. Mediu optim pentru cultura în fază submersă este alcătuit tot din componente naturale (tărâțe de grâu și făină de fasole).
11. Cultura submersă în flacoane agitate duce la obținerea unor extracte enzimaticice cu o activitate specifică asemănătoare cu cea obținută în cazul culturilor de suprafață fără L-metionină în mediul de cultură.
12. Cultura submersă în reactor, cu o aerare puternică, conduce la o activitate specifică aminoacilazică (1,2 U/mg) asemănătoare cu cea obținută în cazul culturilor de suprafață în prezența L-metioninei. Mediul de cultură conține tărâțe de grâu și făină de fasole. Activitatea specifică maximă se obține după 100-110 ore de cultivare la 30°C.

5. Purificarea aminoacilazei microbiene [335,336,338,339,,340,348]

Din culturile microbiene pe mediu solid sau submers s-au obținut extracte, conform metodologiilor prezentate la Cap. 4.1. Scopul purificării aminoacilazei din aceste extracte nu a fost de a obține o enzimă cât mai pură ci de a obține preparate printr-o metodologie cât mai simplă și cât mai ieftină și care apoi să poată fi folosite la imobilizarea enzimei cu randamente cât mai ridicate. În acest scop s-au testat:

- separarea prin precipitare fracționată
- dializa
- cromatografia de gel filtrare

5.1. Separarea prin precipitare fracționată cu săruri

Solubilitatea proteinelor este afectată major de tăria ionică a soluției. În general, pe măsură ce crește tăria ionică, solubilitatea proteinelor crește la început; procesul este denumit "salting in". Peste un anumit punct, solubilitatea începe să scadă, iar procesul este cunoscut ca "salting out".

La tării ionice mici coeficienții de activitate a grupărilor ionizabile ale proteinelor scad, astfel încât concentrațiile lor efective sunt scăzute. Acest lucru se datorează faptului că grupările ionizabile se înconjoară de contraioni, care previn interacțiunile între grupările ionizabile. Astfel, interacțiunile proteină-proteină scad și solubilitatea crește.

La tării ionice mari, coeficienții de activitate a grupărilor ionizabile din proteină cresc, astfel încât crește și concentrația lor efectivă. Acest lucru se datorează faptului că, la tării ionice mari, atât de multă apă devine legată de ionii adăugați încât nu mai rămâne suficientă apă pentru a hidrata normal proteina. Ca rezultat, interacțiunile proteină-proteină depășesc pe cele proteină-apă și solubilitatea scade.

Sulfatul de amoniu (SA) este cu deosebire utilizat pentru precipitarea fracționată a proteinelor. Este disponibil la purități mari, are o solubilitate foarte mare, permițând schimbări semnificative ale tăriei ionice și nu este scump.

Schimbările în concentrația de SA pot fi realizate fie prin adăugare de SA solid sau prin adăugarea unei soluții cu saturație cunoscută (în general se folosește o soluție SA cu saturație 100%). Formulele de calcul pentru schimbarea concentrației de SA sunt [348]:

- pentru adăugare de SA solid:

$$x = \frac{51,5(S_2 - S_1)}{100 - 0,3S_2}$$

unde 51,5 = g/100ml = saturația 100 % a SA

x = număr grame de SA solid ce trebuie adăugat la 100 ml soluție de saturație S_1 pentru a o aduce la saturația S_2

S_1 = saturația în SA a soluției inițiale

S_2 = saturația în SA a soluției finale

Ecuția se folosește când saturația este exprimată în procente

- pentru adăugarea de soluție saturată de SA:

$$y = \frac{V_1(S_2 - S_1)}{100 - S_2}$$

unde y = ml soluție inițială de SA ce trebuie adăugați la volumul inițial V_1 al unei soluții de saturație S_1 pentru a obține o soluție finală de volum V_2 cu o saturație de S_2
 S_1 și S_2 au semnificația de mai sus
 Ecuația se folosește tot pentru exprimarea saturației în procente.

În experimentele realizate s-a folosit sulfat de amoniu solid provenit de la Chimopar București și de puritate analitică.

Mod de lucru: Extractele obținute au fost răcite la 4°C, s-au adus la pH = 7,0 prin adăugare de NaOH 1M. Sulfatul de amoniu a fost adăugat în porțiuni mici, sub agitare și răcire la 4°C, cu menținerea pH-ului la valoarea 7,0. După fiecare precipitare, suspensia a fost centrifugată la 2500-3000 rpm, la 0°C, timp de 30 minute. Supernatantul s-a utilizat pentru precipitarea în continuare. Precipitatul a fost reluat într-un volum cât mai mic de apă. Dacă dizolvarea nu a fost totală, suspensia s-a centrifugat din nou în aceleași condiții.

Au fost supuse precipitării fracționate cu SA extracte obținute din culturi solide și submerse. În fiecare fracție, ca și în extractul inițial, s-au determinat concentrația în proteine cu metoda Lowry și activitatea aminoacilazică (vezi Cap.4.1)

Rezultate obținute

Rezultatele obținute la precipitarea fracționată a extractelor brute (cultură solidă și cultură submersă) sunt prezentate în Tabelele 5.1 și respectiv 5.2. S-au calculat și valorile factorilor de purificare (ca raport între activitatea specifică a fracțiunii și a extractului brut) și randamentele de regăsire ale enzimei în diferitele fracțiuni (ca raport între activitatea totală dintr-o fracțiune și cea a extractului brut).

Tabel 5.1. Precipitarea fracționată cu sulfat de amoniu a extractului aminoacilazic brut (cultură solidă)

Fracția	Volum ml	Proteine		Activitate aminoacilazică		Randam. recuper. %	Factor purificare
		mg/ml	η_{rec} (%)	U/ml	U/mg		
extract brut	100	2,72	100	0,151	0,055	100	1
0-50%	15	0,81	4,46	0,229	0,283	22,75	5,14
50-70%	12	1,50	6,62	0,917	0,611	72,87	11,11
70-90%	12	2,09	9,22	0,054	0,026	4,29	0,47

După cum se observă, prin precipitare cu sulfat de amoniu proteinele se regăsesc în fracțiile realizate doar în procent de 20%. În schimb aminoacilaza este precipitată aproape în întregime (82-99%), regăsindu-se majoritar în fracția 50-70% (72-74% din total) cu un factor de purificare de 10-11. În fracția 0-50% pentru cultura solidă se regăsește 22,75% din totalul de aminoacilază, cu un factor de purificare de 5,14. În cazul extractului de la cultura submersă, unde s-a realizat și fracționarea 0-30% și 30-50%, se observă că enzima precipită la saturații mai mari de 30%.

În concluzie, pentru o purificare mai avansată a aminoacilazei trebuie realizată fracționarea cu sulfat de amoniu în domeniul 50-70%.

Pentru purificări mai puțin avansate se poate precipita enzima pe domeniul 0-70% saturație sulfat de amoniu.

Tabel 5.2. Precipitarea fracționată cu sulfat de amoniu a extractului aminoacilazic brut (cultură submersă)

Frația	Volum ml	Proteine		Activitate aminoacilazică		Randam. recuper. %	Factor purificare
		mg/ml	η_{rec} (%)	U/ml	U/mg		
extract brut	100	1,96	100	0,101	0,051	100	1
0-30%	9,0	0,76	3,49	-	-	-	-
30-50%	7,5	0,41	1,57	0,10,1	0,246	7,50	4,82
50-70%	9,5	1,42	6,88	0,788	0,555	74,12	10,88
70-90%	10,3	1,72	9,04	-	-	-	-

Pentru trecerea la fază industrială a acestui procedeu de purificare s-ar impune utilizarea pentru precipitare a unui reactiv mai puțin scump și anume sulfat de amoniu tehnic.

Pentru a vedea efectul acestui reactiv asupra enzimei s-a efectuat comparativ o precipitare a aceluiași extract brut (cultură solidă) cu sulfat de amoniu p.a., produs Chimopar București și sulfat de amoniu tehnic, produs la Combinatul Chimic Valea-Călugărească (purtate 99%). Precipitarea și centrifugarea s-au realizat în aceleași condiții, pornind de la 1 litru extract brut pentru cele două tipuri de sulfat de amoniu, și încă un test pentru 8 l extract brut precipitat cu sulfat de amoniu tehnic. Datele obținute sunt prezentate în Tabelul 5.3.

Tabel 5.3. Influența purității sulfatului de amoniu asupra randamentului de purificare al aminoacilazei

Sulfat amoniu	Frația	Volum extract precipit. l	Volum reluare precipit. ml	Proteine		Activitate aminoacilazică		Randam. recuper. %	Factor purificare
				mg/ml	η_{rec} (%)	U/ml	U/mg		
Extract brut			14 800	3,29	100	0,168	0,051	100	1
p.a	0-70%	1,0	194	1,80	8,91	0,838	0,465	96,77	9,12
tehnic	0-70%	1,0	188	1,45	8,28	0,801	0,552	89,63	10,82
tehnic	0-70%	8,0	1316	1,68	8,40	0,911	0,542	89,20	10,63

Se observă că utilizarea de sulfat de amoniu tehnic pentru precipitarea fracționată a aminoacilazei duce la o scădere nesemnificativă a enzimei recuperate, în schimb, surprinzător, activitatea specifică acilazică este mai ridicată (aprox.18%) și se îmbunătățește puțin și factorul de purificare (cu aproximativ 1,6 unități). Randamentul de recuperare a enzimei foarte ridicat (89%) îndreptățește utilizarea sulfatului de amoniu tehnic pentru precipitarea enzimei.

5.2. Separarea prin precipitare fracționată cu solvenți organici

Precipitarea fracționată cu solvenții organici (acetonă, etanol, eter) se bazează pe efectul precipitant al solvenților cu constante dielectrice mici, miscibili cu apa. Apa, care este un dielectric bun, face ca forțele de atracție dintre sarcinile opuse ale moleculelor proteice să fie mai mici, astfel încât proteinele rămân dizolvate în soluție. Adăugarea unui solvent cu constantă dielectrică mică scade constanta dielectrică a mediului, permițând creșterea forțelor de atracție între moleculele proteice, forțe care la un moment dat devin atât de puternice încât aglomerează între ele moleculele proteice dând naștere precipitatului. În cazul unui amestec de proteine, fiecare din acestea va avea o limită a constantei dielectrice a mediului la care va precipita.

Pentru a putea fi folosit, solventul nu trebuie să aibă o acțiune inhibitoare, trebuie să fie miscibil cu apa și să aibă o constantă dielectrică suficient de mică față de cea a apei pentru a realiza un interval mare între două constante, care să permită fracționarea a cât mai multe specii proteice.

Volumul de solvent organic ce trebuie adăugat pentru a realiza o anumită concentrație în solvent a soluției se calculează cu formula [348]:

$$V = \frac{10(C_2 - C_1)}{100 - C_2}$$

unde V = ml solvent ce trebuie adăugat la 1 litru soluție

C_1 = concentrația inițială a soluției (% v/v)

C_2 = concentrația finală a soluției (% v/v)

Pentru precipitare s-a utilizat acetona care, pe lângă scăderea substanțială a constantei dielectrice, are și un puternic efect deshidratant, care face ca precipitatul obținut să poată fi uscat ușor la temperaturi care nu produc denaturarea enzimei.

Mod de lucru: S-a supus precipitării un extract brut obținut dintr-o cultură de suprafață. Acetona a fost răcită la -20°C iar precipitarea s-a efectuat la 4°C . După precipitarea unei fracții, suspensia a fost menținută la -20°C timp de o oră apoi a fost centrifugată timp de 10 minute la 5000 rpm la 0°C . Precipitatele au fost reluate cu volum minim de apă. Dacă soluția obținută nu a fost perfect limpede, s-a centrifugat din nou în aceleași condiții.

În soluția inițială și în fracțiile precipitate cu acetonă s-a determinat conținutul în proteine și activitatea aminoacilazică.

Rezultate obținute

Și în acest caz au fost calculați factorii de purificare și randamentele de recuperare. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 5.4.

După cum se observă din datele prezentate în tabel, fracția 30-60% saturație acetonă cuprinde 75% din activitatea aminoacilazică inițială, într-un volum ce reprezintă 6,67% din volumul extractului brut. Din păcate factorul de purificare este doar 3, mult mai mic decât în cazul precipitării cu sulfat de amoniu. De asemenea se folosesc volume mari de acetonă, ceea ce implică și volume mai mari de suspensie supusă centrifugării.

Tabel 5.4. Purificarea aminoacilazei prin precipitare fracționată cu acetonă

Frația	Volum ml	Proteine		Activitate aminoacilazică		Randam. recuper. %	Factor purificare
		mg/ml	$\eta_{rec.}(\%)$	U/ml	U/mg		
extract brut	300	2,40	100	0,15	0,062	100	1
0-30%	16	7,60	16,88	0,103	0,013	3,66	0,21
30-60%	20	9,14	25,39	1,693	0,185	75,24	2,98
60-90%	20	8,30	23,05	0,283	0,034	12,71	0,55

Într-un alt experiment, fracția 0-70% saturație sulfat de amoniu a fost supusă precipitării, în continuare, cu 60% saturație acetonă, folosind metoda de lucru prezentată anterior. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 5.5.

Tabel 5.5. Purificarea cu acetonă a fracției 0-70% saturație sulfat de amoniu

Frația	Volum ml	Proteine		Activitate aminoacilazică		Randam. Recuper. %	Factor purificare
		mg/ml	$\eta_{rec.}(\%)$	U/ml	U/mg		
0-70% $(NH_4)_2SO_4$	100	1,49	100	1,042	0,70	100	1
0-60% acetonă	20	4,67	62,68	3,13	0,67	60,07	0,96

Se observă că, deși activitatea aminoacilazică, exprimată în U/ml, a crescut de aproape trei ori, activitatea specifică (U/mg) nu s-a modificat, factorul de purificare fiind aproape 1, deci nu s-a realizat nici o purificare a enzimei.

Dar produsul uscat, obținut în urma purificării prin precipitare cu 60% saturație acetonă a fost obținut foarte ușor, prin simpla uscare în aer, la temperatura camerei a precipitatului. S-a obținut o pudră maronie cu o activitate de 0,11 U/mg, față de 0,49 U/mg a produsului comercializat de firma Sigma.

5.3. Desalefierea fracțiilor precipitate cu sulfat de amoniu prin dializă

Fenomenul de dializă se bazează pe diferența de concentrație dintre extractul proteic ce conține sulfat de amoniu și apa distilată, de care extractul enzimatic este separat printr-o membrană semipermeabilă. Diferența de concentrație dă naștere unei presiuni osmotice sub acțiunea căreia ionii NH_4^+ și SO_4^{2-} trec prin membrană din soluția enzimatică în apa distilată din exterior (iar apa pătrunde în interior) până la egalarea concentrațiilor. În același timp și alte molecule mici, inclusiv proteine, străbat membrana, cu condiția ca diametrul moleculelor să fie mai mic decât cel al porilor membranei. Schimbând des apa din jurul sacului de dializă în care se află soluția enzimatică se poate ajunge la o îndepărtare aproape totală a moleculelor mici din soluția enzimatică. Dezavantajul metodei constă în faptul că, datorită migrării în sens invers a apei, în soluția enzimatică, aceasta se diluează.

Reactivi utilizați: membrana semipermeabilă a fost celofanul (produs comercial); $BaCl_2$ și reactivul Nessler au provenit de la Chimopar București.

Mod de lucru: S-au supus dializei soluții obținute la precipitarea cu 0-70% saturație sulfat de amoniu. S-a lucrat la 4°C. Soluția enzimatică a fost introdusă într-o pungă confecționată din celofan și aceasta a fost imersată (până la nivelul soluției din interior) în apă distilată. Periodic s-a schimbat apa distilată până când nu s-au mai detectat în aceasta ioni sulfat (testare cu BaCl₂) și amoniu (testare cu reactiv Nessler).

Rezultate obținute

Volumele de extract enzimatic obținute după dializă au fost aproximativ duble față de cele inițiale iar îndepărtarea completă a sulfatului de amoniu a durat 60-70 ore și a necesitat volume foarte mari de apă distilată.

De asemenea, în urma dializei a avut loc o inactivare aproape totală a enzimei, așa cum, de fapt, prezintă și literatura, datorită pierderii ionului Zn²⁺ din structura enzimei. Acest lucru a făcut să se renunțe la dializă ca mijloc de desalefiere.

5.4. Purificarea aminoacilazei prin cromatografia de gel filtrare

Gel-filtrarea reprezintă o metodă cromatografică de separare a componentelor unui amestec, bazată pe mărimea și forma moleculelor. Particulele care alcătuiesc faza staționară au o porozitate foarte bine controlată. Moleculele cu masă moleculară mică, cu diametrul particulelor mai mic decât al porilor suportului solid, vor pătrunde în pori și vor fi întârziate în eluarea de pe coloana cromatografică. În cazul unei amestec de proteine, la cromatografierea prin gel-filtrare, proteinele cu masa moleculară cea mai mare vor părăsi primele coloana în urma eluției. Particulele mici, cum ar fi sulfatul de amoniu, vor părăsi coloana spre sfârșitul eluării.

5.4.1. Desalefierea prin gel-filtrare a fracțiilor precipitate cu sulfat de amoniu

Deoarece dializa nu a prezentat rezultate satisfăcătoare s-a testat desalefierea fracțiilor enzimatică prin cromatografie de gel-filtrare pe derivați de dextran de tip Sephadex G-25 coarse și fine și Sephadex G-50 fine de la firma Pharmacia Fine Chem. Institutul "Petru Poni" Iași a realizat un set de derivați de dextran similari celor produși de Pharmacia, pe care i-a denumit Filtradex R-25, respectiv Filtradex R-50. În paralel au fost testate și aceste geluri.

Tamponul fosfat (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) 0,05 M, pH 7,0 a fost preparat în laborator din reactivi de puritate analitică, proveniți de la Chimopar, București.

Mod de lucru:

a) Pregătirea gelurilor

Pulberea de Sephadex (respectiv Filtradex) a fost suspendată în apă distilată și lăsată să se îmbibe 3 ore la temperatura camerei. Prin decantare s-a îndepărtat suspensia de particule fine. Operația s-a repetat de mai multe ori până când supernatantul a fost limpede.

b) Pregătirea coloanelor cromatografice

Coloanele cromatografice din sticlă și de diferite dimensiuni au fost prevăzute la partea inferioară cu strat din vată de sticlă sau frită și cu robinete pentru reglarea debitului. Coloanele au fost umplute cu gel (strat perfect uniform) apoi au fost tamponate trecând prin coloane tampon fosfat 0,05 M pH 7,0 până când pH-ul eluentului a devenit 7,0.

c) Gel-filtrarea soluției enzimatică

Volumul de soluție enzimatică trecut prin coloană a reprezentat 20% din volumul gelului. Eluarea s-a realizat cu tampon fosfat 0,05M, pH 7,0. S-au cules fracții de câte 5 respectiv 25

ml în care s-au determinat conținutul în proteine (metoda Lowry), activitatea aminoacilazică și concentrația în ioni amoniu (metoda Nessler) (vezi Cap.4.1)

d) Regenerarea coloanei

Coloana s-a spălat în continuare cu tampon fosfat 0,05M, pH 7,0 până când în eluent nu s-au mai detectat proteine și ioni sulfat și amoniu.

Coloanele utilizate au avut dimensiunile:

- pentru Sephadex G-25 (respectiv Filtradex R-25): 2,2 x 40 cm;

- pentru Filtradex G-50 (respectiv Filtradex R-50): 2,8 x 48 cm.

Pe coloane au fost trecuți 15-25 ml soluție enzimatică cu un debit de 1 ml/ minut.

Rezultate obținute

Rezultatele obținute sunt prezentate separat pentru cele două categorii de gel (25 și 50) în Tabelele 5.6 și respectiv 5.7, de asemenea în Figurile 5.1 și respectiv 5.2.

Tabel 5.6. Desalifierea pe Sephadex G-25 respectiv Filtradex R-25 (coarse)

Frac- ția	Sephadex G-25 ^x					Filtradex R-25 ^{xx}				
	Vol. ml	Proteine mg/ml	Aminoacilaza		(NH ₄) ₂ SO ₄ mg/ml	Vol. ml	Proteine mg/ml	Aminoacilaza		(NH ₄) ₂ SO ₄ mg/ml
			U/ml	U/mg				U/ml	U/mg	
1	50	-	-	-	-	25	-	-	-	-
2	10	0,65	0,041	0,063	-	5	0,017	-	-	-
3	10	1,28	0,264	0,206	-	5	0,238	0,1180	0,756	-
4	10	1,65	0,28	0,170	-	5	0,281	0,251	0,893	-
5	10	1,45	0,34	0,234	-	5	0,320	0,316	0,987	0,023
6	10	0,83	0,45	0,542	0,2	5	0,276	0,204	0,739	0,016
7	10	0,57	0,623	1,093	7,1	5	0,170	0,203	1,194	0,332
8	10	0,46	0,585	1,272	13,2	5	0,141	-	-	0,70
9	10	0,33	0,525	1,591	24,6	5	0,105	-	-	1,58
10	10	0,38	0,510	1,342	27,4	5	0,107	-	-	0,58
11	10	0,38	0,480	1,263	25,4	5	0,088	-	-	2,73
12	10	0,33	0,220	0,666	22,8	5	0,088	-	-	2,33
13	10	0,28	-	-	8,5	5	0,96	-	-	1,44
14	10	0,13	-	-	3,6	5	0,102	-	-	3,48
15	10	0,17	-	-	0,5	5	0,057	-	-	1,49
16	10	0,06	-	-	0,6	25	0,022	-	-	0,28
17	10	0,04	-	-	-	25		-	-	0,005
18	10	0,02	-	-	-	25		-	-	-
19	10	0,02	-	-	-					
20	10	0,02	-	-	-					
Volum total : 240 ml						Volum total : 170 ml				

volum soluție enzimatică trecută prin coloană: ^x = 25 ml ; ^{xx} = 15 ml

Se observă că, în cazul separării pe Sephadex G-25 coarse, activitatea aminoacilazică se recuperează în 40 ml eluat, liber de sulfat de amoniu (diluție 1,6 față de volumul de soluție introdus pe coloană) dar enzima se mai găsește în încă 70 ml eluat în care s-a eliminat și sulfat de amoniu. Deci separarea nu este prea bună în condițiile experimentului.

În cazul separării pe Filtradex R-25 se obțin 20 ml eluat cu activitate aminoacilazică (diluție 1,33) și fără sulfat de amoniu și încă alți 30ml eluat în care, pe lângă aminoacilază a fost eluat și sulfatul de amoniu. Dar separarea în cazul acesta este mai netă decât în cazul Sephadexului G-25.

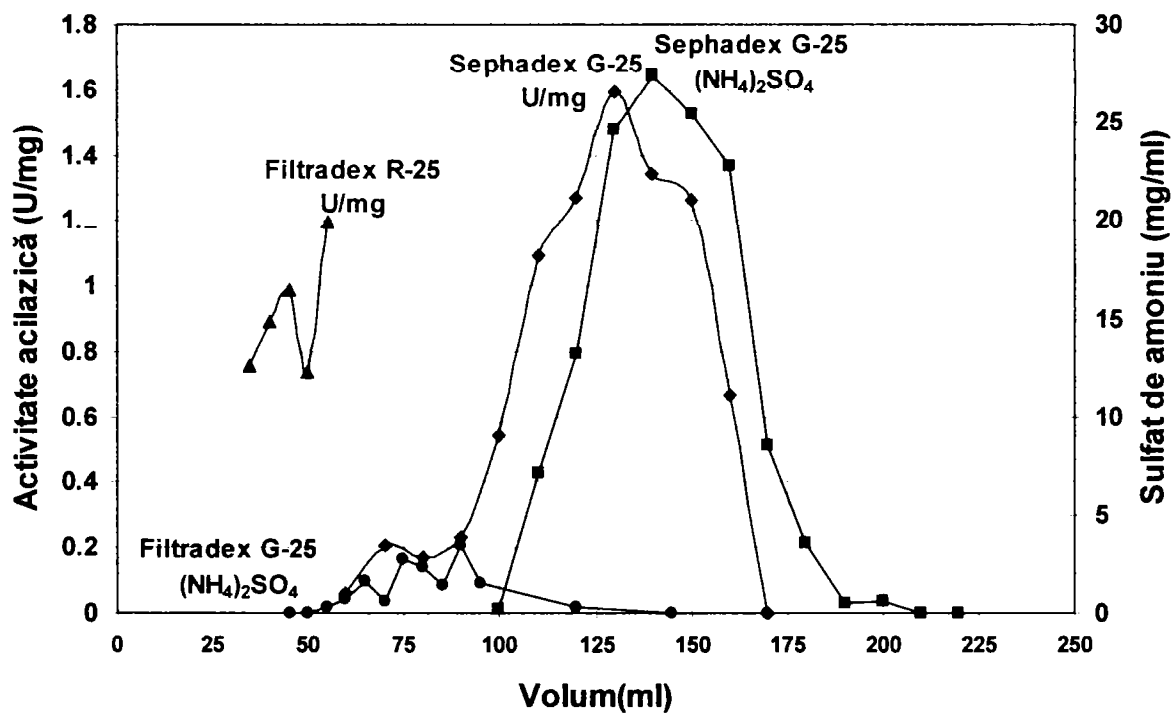


Figura 5.1. Desalefierea soluției de aminoacilază pe Sephadex G-25 (coarse), respectiv Filtradex R-25 (coarse) roșu – aminoacilază; verde – sulfat de amoniu

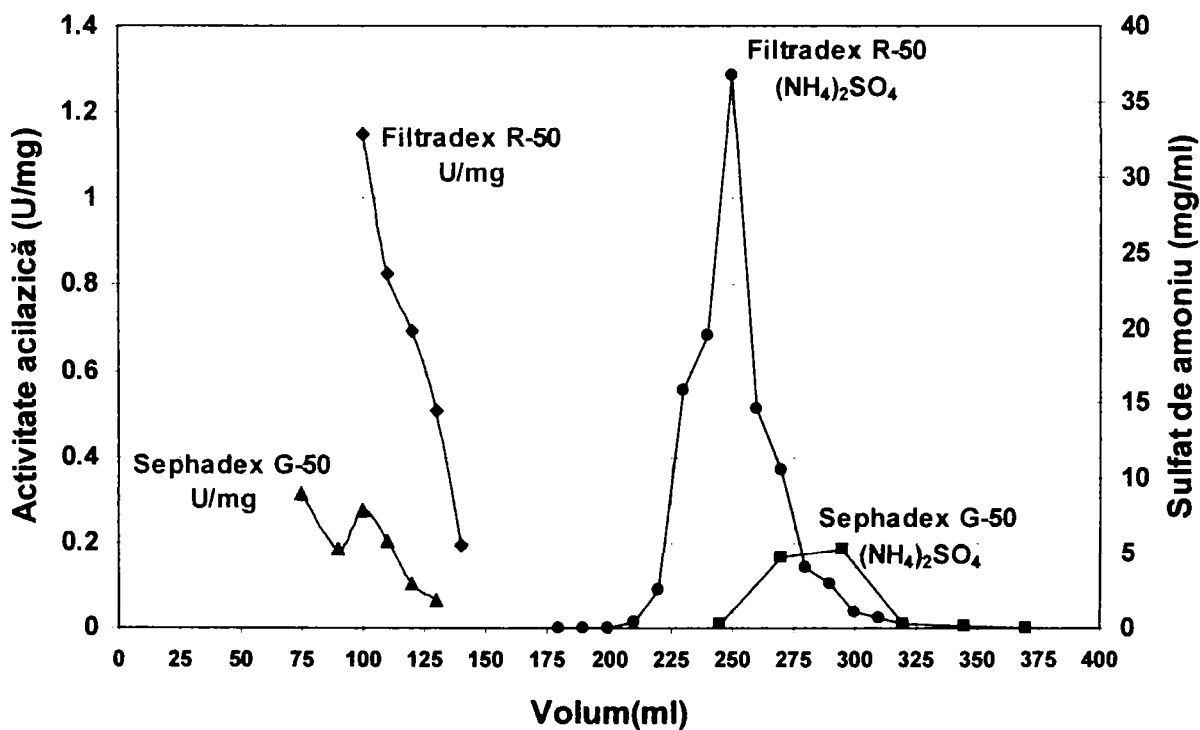


Figura 5.2. Desalefierea soluției de aminoacilază pe Sephadex G-50 (fine), respectiv Filtradex R-50 (fine)

Tabel 5.7. Desalifierea pe Sephadex G-50 fine, respectiv Filtradex G-50 fine

Frac- ție	Vol. ml	Sephadex G-50				Filtradex R-50				
		Proteine mg/ml	Aminoacilaza		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mg/ml	Vol. ml	Proteine mg/ml	Aminoacilaza		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mg/ml
			U/ml	U/mg				U/ml	U/mg	
1	75	-	-	-	-	100	-	-	-	-
2	15	0,69	0,217	0,314	-	10	0,313	0,359	1,147	-
3	10	1,56	0,287	0,184	-	10	1,048	0,868	0,828	-
4	10	1,53	0,418	0,273	-	10	1,213	0,839	0,692	-
5	10	1,29	0,262	0,203	-	10	1,009	0,515	0,510	-
6	10	1,08	0,112	0,104	-	10	0,705	0,137	0,194	-
7	10	0,63	0,041	0,065	-	10	0,504	-	-	-
8	10	0,46	-	-	-	10	0,383	-	-	-
9	10	0,39	-	-	-	10	0,317	-	-	-
10	10	0,28	-	-	-	10	0,252	-	-	-
11	10	0,22	-	-	0,02	10	0,203	-	-	-
12	10	0,14	-	-	0,02	10	0,183	-	-	-
13	10	0,15	-	-	0,03	10	0,126	-	-	-
14	10	0,08	-	-	0,42	25	0,087	-	-	0,283
15	10	0,04	-	-	2,63	25	0,165	-	-	4,678
16	10	-	-	-	15,82	25	0,213	-	-	5,263
17	10	-	-	-	19,48	25	0,165	-	-	0,220
18	10	0,199	-	-	36,7	25	0,078	-	-	0,090
19	10	0,214	-	-	14,65	25	0,048	-	-	0,010
20	10	0,26	-	-	10,62	25	0,008	-	-	-
21	10	0,22	-	-	4,05					
22	10	0,20	-	-	3,03					
23	10	0,156	-	-	1,02					
24	10	0,14	-	-	0,67					
25	10	0,12	-	-	0,3					
Volum total : 320 ml						Volum total : 395 ml				

În ambele cazuri pe coloane au fost aplicați 25 ml soluție aminoacilazică.

După cum se observă, în cazul utilizării unor geluri cu putere de separare mai mare (Sephadex G-50 fine și Filtradex R-50 fine), așa cum era de așteptat, separarea aminoacilazei de sulfatul de amoniu a fost netă. În ambele cazuri aminoacilaza este eluată în 50-60 ml eluat, realizând o diluție a soluției inițiale de 2-2,4 ori.

În cazul desalefierii soluțiilor prin gel-filtrare, durata procesului, inclusiv spălarea coloanelor, a fost de 5-8 ore, cu mult mai puțin decât timpul necesar dializei (60-70 ore).

După mai multe treceri prin coloană timpul de spălare s-a mărit datorită îmbăcșirii gelului. Pentru o spălare completă s-a scos gelul din coloană și s-a spălat în pahar Berzelius cu

NaOH 0,24 M de 3 ori, apoi cu apă distilată până când supernatantul a fost limpede și a avut pH-ul în jur de 7.

5.4.2. Influența debitului de eluție asupra desalefierii soluției acilazice pe Sephadex G 25 fine

S-a urmărit, de asemenea, influența debitului de eluție asupra separării pe o coloană umplută cu Sephadex G-25 fine. Coloana realizată a avut dimensiunile 3,3 x 54 cm; Volumul de soluție introdus în coloană = 100 ml; debitele de eluție testate au fost: 0,75 ml/min; 1,0 ml/min; 1,25 ml/min. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 5.8.

Mod de lucru: este asemănător cu cel prezentat la Cap. 5.4.1.

Se observă că la o diferență atât de mică între debite nu apare diferență în profilul eluției. Totuși la o eluție cu 1,25 ml/min, sulfatul de amoniu este eluat de pe coloană suprapus peste ultimele fracții ce conțin aminoacilază. În continuare soluțiile enzimatică au fost eluate pe coloana Sephadex G-25 fine cu un debit de 1 ml/min. S-au cules inițial 150 ml eluat care au conținut aminoacilază desalefiată. Coloana s-a spălat, în continuare, cu aproximativ 450ml tampon fosfat 0,05M, pH 7,0. Întreg procesul a durat mai puțin de 14 ore (aproximativ 12,5 ore).

Tabel 5.8. Influența debitului de eluție asupra desalefierii pe Sephadex G-25

Frac- ție	Vol. ml	Debit 0,75 ml/min.			Debit 1,0 ml/min			Debit 1,25 ml/min		
		Proteine mg/ml	Acilaza U/ml	(NH ₄) ₂ SO ₄ mg/ml	Proteine mg/ml	Acilaza U/ml	(NH ₄) ₂ SO ₄ mg/ml	Proteine mg/ml	Acilaza U/ml	(NH ₄) ₂ SO ₄ mg/ml
1	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	25	0,96	0,425	-	1,27	0,453	-	0,84	0,661	
3	25	1,11	0,744	-	1,95	0,709	-	1,66	0,636	
4	25	1,22	0,640	-	2,19	0,934	-	2,00	0,752	
5	25	2,01	0,540	-	2,05	1,018	-	1,68	0,720	
6	25	1,86	0,713	-	1,27	0,762	-	1,00	0,716	
7	25	1,07	1,00	-	0,63	0,091	-	0,49	0,250	
8	25	0,70	0,410	0,18	0,34	-	0,91	0,20	0,208	2,79
9	25	0,38	-	8,27	0,28	-	15,52	0,18	0,252	15,0
10	25	0,38	-	18,94	0,18	-	43,26	0,11	0,045	33,0
11	25	0,20	-	42,67	0,21	-	42,66	0,09	0,058	46,5
12	25		-	45,05	0,23	-	43,01	-	-	45,6
13	25		-	44,86	0,21	-	17,40	-	-	10,0
14	25		-	25,41	0,11	-	5,53	-	-	5,6
15	25		-	7,37	0,08	-	4,23	-	-	3,2
16	50		-	4,84	-	-	2,84	-	-	1,36
17	50		-	1,78	-	-	0,11	-	-	0,4
18	50		-	0,92	-	-		-	-	0,32
19	50		-	0,60	-	-		-	-	0,15

5.4.3. Desalefierea prin gel-filtrare la scară pilot

Deoarece s-a urmărit, de fapt, utilizarea unor compuși realizați în țară, s-a realizat o coloană de desalefiere cu Filtradex R-50 (a prezentat rezultate mai bune ca Filtradex R-25), de dimensiuni mari, pentru a avea apoi la dispoziție, cantități mari de aminoacilază desalefiată în vederea imobilizării.

Mod de lucru: Coloana utilizată a avut dimensiunile de 9,4 x 120 cm, cu un volum de gel tamponat cu tampon fosfat 0,1 M pH 7,0 de 8320 ml. Pe coloană s-au trecut 1670 ml soluție enzimatică (fracția 0-70% saturație sulfat de amoniu), reprezentând 20% din volumul gelului. Eluția s-a realizat cu tampon fosfat 0,1 M pH 7,0, cu debitul maxim permis de înălțimea gelului și cădere liberă (450 ml/oră). S-a cules un cap de eluție de 522 ml fără conținut în proteine, apoi o serie de fracții în care s-au determinat conținutul în proteine, sulfat de amoniu, și activitatea aminoacilazică. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 5.9.

Se observă că randamentul de recuperare al enzimei este extrem de bun (96%). Factorul de purificare nu depășește 1,54. Dacă se exclud ultimele două fracții, ce conțin activitate specifică mai mică de 0,5 U/mg se obține un randament de recuperare de aproximativ 93%, fără o diluare a volumului inițial de soluție enzimatică.

Tabel 5.9. Purificarea fracției 0-70% saturație sulfat de amoniu pe Filtradex R-50

Volum frac./eluată ml	Proteine		Activitate aminoacilazică		Randam. recuper. %	Factor purif.	(NH ₄)SO ₄ mg/ml
	mg/ml	η_{rec} (%)	U/ml	U/mg			
0-70% 1670	1,68	100	0,911	0,542	100	1	35,6
522	-	-	-	-	-	-	-
193	0,1	0,69	0,054	0,540	0,68	0,99	-
170	0,51	3,09	0,340	0,666	3,80	1,23	-
185	0,99	6,53	0,730	0,737	8,87	1,36	-
234	1,23	10,26	1,027	0,835	15,80	1,54	-
290	1,46	15,09	1,123	0,769	21,40	1,42	-
340	1,61	19,51	1,221	0,758	27,29	1,40	-
260	1,50	13,90	0,873	0,582	14,92	1,07	-
380	0,98	13,27	0,121	0,123	3,02	0,23	-
450	0,048	7,70	0,010	0,021	0,29	0,04	-
350	0,43	5,36	-	-	-	-	-
175	-	-	-	-	-	-	-
Total		94,4			96,07		-

Dacă se calculează factorul de purificare pornind de la extractul brut (0,077 U/mg) la fracția cu activitatea specifică cea mai mare (0,835 U/mg) se obține o valoare de 10,84. Dacă se face calculul pentru primele 7 fracții (volumul total 1672 ml, proteine 1,16 mg/ml și activitate specifică 0,727 U/mg), pornind tot de la extractul brut, se obține un factor de purificare de 9,44, cu doar o unitate mai mică decât valoarea precedentă.

Eluarea proteinelor de pe coloană a durat aproximativ 7,5 ore. În continuare coloana s-a spălat cu tamponul fosfat 0,1 M pH 7,0 până a fost eluat în întregime sulfatul de amoniu (11,7 litri în 26 ore).

5.4.4. Purificarea aminoacilazei prin gel-filtrare pe Sephadex G-100 și Filtradex R-100

Pentru o purificare mai avansată a aminoacilazei, fracția precipitată cu 0 N 70% sulfat de amoniu s-a cromatografiat pe Sephadex G-100 fine, respectiv Filtradex R-100, în acest caz realizându-se atât desalefierea cât și o separare mai avansată a proteinelor.

Mod de lucru: Sephadex G-100 fine (Pharmacia Fine Ch.) a fost suspendat în apă distilată timp de 3 zile, cu îndepărtarea periodică a supernatantului. Gelul obținut a fost introdus într-o coloană și s-a tamponat prin trecere pe coloană a unui tampon fosfat 0,05 M, pH 7,0. S-a obținut o coloană de gel cu dimensiunile 2,7 x 34 cm (195ml gel).

Pe coloană s-au aplicat, pentru purificare, 10 ml fracție 0-70% saturație sulfat de amoniu. Eluarea s-a realizat cu tampon fosfat 0,05 M pH 7,0, cu debitul maxim permis de înălțimea coloanei de gel, la cădere liberă (40 ml/oră). În fracții s-a determinat activitatea aminoacilazică și concentrația în proteine și sulfat de amoniu. S-au colectat fracții de câte 5 ml.

Filtradexul R-100 fine (Institutul Petru Poni Iași) a fost pregătit în același mod ca Sephadexul G-100. S-a obținut o coloană de gel cu dimensiunile 2 x 33 cm (100 ml gel). Pe coloană s-au aplicat 10 ml soluție enzimatică. Eluția s-a realizat cu tampon fosfat 0,05 M, pH 7,0, cu un debit de 40 ml/oră. S-au colectat probe de 5ml în care s-a determinat activitatea enzimatică, conținutul în proteine și sulfat de amoniu.

Rezultate obținute

S-au calculat factorii de purificare și randamentele de recuperare a enzimei pentru fracțiile colectate. Datele obținute în ambele cazuri sunt prezentate în Tabelul 5.10.

Nelucrând cu aceeași soluție inițială de enzimă și cu coloane identice este mai greu de tras concluzii comparative.

În cazul purificării pe Sephadex G-100 fine se obține un factor de purificare maxim de 21,5. Un factor mediu de purificare pentru cele 6 fracții reunite ar fi de 7,5. Dacă se calculează randamentul de recuperare al proteinelor se găsește valoarea 21,5% pentru fracțiile cu activitate aminoacilazică. În schimb randamentul de recuperare al enzimei depășește cu mult 100% (fiind de 123%). Acest lucru s-ar putea explica prin purificarea avansată a enzimei ceea ce a dus, probabil, la înlăturarea unui inhibitor aflat în soluția aminoacilazică inițială.

Pentru purificarea pe Filtradex G-100 fine rezultatele nu mai sunt atât de bune. Enzima este recuperată doar în procent de 48% pentru o recuperare a proteinelor de 47,6%. Nici factorul de purificare nu depășește valoarea 3,2. Enzima este probabil inactivată prin legare hidrofobă la gel, sau poate acesta conține impurități care inactivează aminoacilaza.

Tabel 5.10. Purificarea aminoacilazei pe Sephadex G-100 și Filtradex R-100

Saphadex G-100 fine							Filtradex R-100 fine					
Frac- ție	Vol ml	Proteine mg/ml	Aminoacilaza				Vol ml	Proteine mg/ml	Aminoacilaza			
			U/ml	U/mg	η_{rec} (%)	Fact. purif.			U/ml	U/mg	η_{rec} (%)	Fact. purif.
<u>Soluție inițială</u>												
10	1,49	0,993	0,666	100	1	10	0,77	0,63	0,826	100	1	
<u>Eluate</u>												
1	65	-	-	-	-	25	-	-	-	-	-	
2	5	0,13	0,078	0,60	3,93	0,90	5	0,014	0,01	0,714	0,78	0,86
3	5	0,18	0,394	2,189	19,84	3,28	5	0,04	0,056	1,40	4,40	1,69
4	5	0,14	0,729	5,207	36,71	7,82	5	0,12	0,320	2,67	25,16	3,23
5	5	0,05	0,717	14,34	36,10	21,53	5	0,13	0,156	1,20	12,26	1,45
6	5	0,07	0,397	5,671	19,99	8,51	5	0,14	0,040	0,286	3,14	0,34
7	5	0,07	0,136	1,943	6,85	2,92	5	0,16	0,015	0,094	1,18	0,11
8	5	-	-	-	-	-	5	0,13	0,01	0,077	0,78	0,09
9	5	-	-	-	-	-	35	0,04	-	-	-	-
10	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-
<u>Total</u>												
30	0,107⇒	21,5%		123,42		35	0,104⇒	47,6%		47,7		

Revenind la purificarea pe Sephadex G-100 fine s-au calculat randamentele de recuperare și factorii de purificare pornind de la extractul brut inițial. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 5.11.

Tabel 5.11. Purificarea avansată a aminoacilazei.

Fracția	Volum ml	Proteine			Aminoacilaza				Fact. Purif.
		mg/ml	mg tot.	η_{rec} (%)	U/ml	U/mg	U tot.	η_{rec} (%)	
extract brut	42	2,388	100,3	100	0,259	0,108	10,88	100	1
0-70% (NH ₄) ₂ SO ₄	10	1,485	14,85	14,8	0,993	0,668	9,93	91,27	6
Fracțiile 25-29 Sephadex G-100	25	0,102	2,55	2,54	0,474	4,647	11,85	108,9	43,03
Fracția 27 Sephadex G-100	5	0,052	0,26	0,26	0,717	13,788	3,58	32,90	127,6

Rezultatele obținute la purificarea aminoacilazei sunt deosebit de bune. În doar două trepte de purificare, precipitare fracționată cu sulfat de amoniu și cromatografie de gel-filtrare pe Sephadex G-100 fine s-au obținut o purificare de aproape 130 ori față de extractul enzimatic inițial, și un randament de recuperare de 33% dacă se fac calculele pentru fracția cu activitate maximă. În cazul în care s-au reunit fracțiile 25-29 de la cromatografia pe Sephadex

G-100, enzima este recuperată total, se înregistrează chiar o creștere a activității datorată purificării, iar factorul de purificare este de 43.

5.5. Obținerea unor preparate aminoacilazice solide

Având în vedere rezultatele preliminare obținute la imobilizarea aminoacilazei, care au dovedit că se obțin randamente bune de imobilizare chiar dacă enzima este doar parțial purificată, s-a procedat la obținerea unor preparate în stare solidă, care să poată fi păstrate în frigider perioade mai îndelungate, fără o pierdere semnificativă de activitate aminoacilazică.

Mod de lucru: Culturile *A. oryzae* au fost realizate în stare solidă în modul prezentat anterior. Etapele principale au fost:

- cultură pe mediu Sabouraud lichid - 5 zile
- cultură pe mediu Sabouraud solid - 7 zile
- cultură în tăvi pe mediu cu tărâțe N 5 zile

În fiecare tavă s-au introdus 400 g tărâțe de grâu, 200 g coji de orez și 400 ml apă și s-au inoculat 2 tuburi cu *A. oryzae*. Sporii au fost reluați cu câte 15 ml apă cu 3% (v/v) Tween 80 (Sigma).

Extracția enzimei s-a realizat într-un reactor cu agitare, cu 6 l apă distilată/tavă, timp de 2 ore. Suspensia a fost filtrată pe tifon pe pâlnie Buchner, sub vid la trompa de apă. Filtratul a fost răcit la 4°C, i s-a corectat pH-ul la 7,0 cu NaOH 1M, apoi a fost precipitat cu 70% saturație sulfat de amoniu. Suspensia s-a păstrat la 4°C pentru 16-18 ore apoi a fost centrifugată 20 minute la 4500 rpm și 0°C. Supernatantul s-a înlăturat iar precipitatul a fost reluat din cuvele de centrifugare cu acetonă și uscat în curent de aer, la temperatura camerei timp de 2-3 zile. Produsul uscat s-a triturat fin și a constituit preparatul aminoacilazic.

S-au determinat în extractul brut (imediat după extracție și filtrare) și în produsul solid obținut conținutul în proteine, activitatea aminoacilazică și proteazică (metoda Anson modificată).

Rezultate obținute

S-au realizat culturi de *A. oryzae* în 11 tăvi, a căror conținut a fost extras plecând de la una sau două tăvi. Rezultatele obținute în urma celor 7 extracții sunt prezentate în Tabelul 5.12.

Tabelul 5.12. Analiza extractelor brute la culturi de *A.oryzae* în tăvi (mediu solid)

Nr. Cult.	Nr. tăvi	Vol.extract ml	Proteine mg/ml	Aminoacilază		Protează	
				U/ml	U/mg	U/ml	U/mg
1	1	4890	2,706	0,127	0,047	0,369	0,136
2	2	9984	3,026	0,170	0,056	0,360	0,119
3	2	10330	3,048	0,071	0,023	0,225	0,083
4	2	10100	3,307	0,102	0,31	0,331	0,100
5	2	10400	3,648	0,140	0,038	0,142	0,040
6	1	5170	5,094	0,107	0,021	0,092	0,018
7	1	5200	4,234	0,084	0,020	0,082	0,019

Se observă că din volumul inițial de extracție s-a recuperat 80-86% sub formă de extract brut. Activitatea aminoacilazică a fost în medie de 0,114 U/ml, respectiv activitatea specifică de 0,034 U/mg. Toate culturile au conținut proteaze în extractul brut. Prezența acestor proteaze în soluțiile enzimatică este un impediment deoarece vor dezactiva enzima în scurt timp, mai ales dacă soluțiile se mențin la temperatura camerei.

Rezultatele obținute la analiza produselor aminoacilazice solide sunt prezentate în Tabelul 5.13.

Ultimele patru culturi prezintă randament de recuperare a aminoacilazei extrem de bune, 92-95% dar factorii de purificare sunt pentru 2 culturi de aproximativ 3,5 iar pentru celelalte două, 6,5. Acest lucru reflectă de fapt cantitatea de preparat solid obținut, în cazul primelor două culturi obținându-se de două ori mai mult produs solid. Deși s-a căutat ca prelucrarea să se facă în condiții cât mai apropiate, totuși probabil au apărut diferențe la fazele de precipitare.

Tabelul 5.13. Analiza produselor aminoacilazice solide

Nr. Cult.	Cantit. g	Proteine mg/mg	Proteaze		Aminoacilază		η_{rec} %	Fact. purif.
			U/mg prot.	U/mg sol.	U/mg prot.	U/mg sol.		
1	6,43	0,306	0,164	0,050	0,203	0,073	75,6	4,32
2	16,54	0,315	0,132	0,042	0,210	0,066	64,3	3,75
3	36,57	0,206	0,020	0,020	0,186	0,038	47,2	8,08
4	53,23	0,158	0,016	0,016	0,117	0,018	93,0	3,77
5	58,31	0,189	0,018	0,018	0,125	0,023	92,1	3,29
6	26,99	0,154	0,028	0,028	0,130	0,020	97,6	6,20
7	10,99	0,275	0,044	0,044	0,140	0,038	95,7	7,0

Primele trei culturi au rezultate mai slabe din punct de vedere al recuperării enzimei, dar factorii de purificare sunt asemănători cu ai celorlalte patru culturi.

Toate preparatele solide obținute conțin proteaze, ceea ce ar putea fi un impediment în utilizarea lor ulterioară.

S-au obținut preparate cu activități aminoacilazice de 0,02 - 0,07 U/mg solid, urmând doar o treaptă de purificare. Preparatele comerciale, exemplu Sigma, mai purificate, au o activitate de aproximativ 0,5 U/mg deci de aproximativ 10 ori mai mare.

5.6. Concluzii

Următoarele concluzii se pot trage din datele experimentale obținute privind purificarea aminoacilazei:

1. Aminoacilaza se regăsește în proporție de 70-75% în fracția de precipitare 50-70% saturație sulfat de amoniu. Factorul de purificare este de 10-11 și se obține o activitate specifică de 0,5-0,6 U/mg.
2. Utilizarea pentru precipitarea fracționată a unui sulfat de amoniu tehnic nu duce la inactivarea sau scăderea randamentului de recuperare a enzimei.
3. La precipitarea fracționată cu acetonă, aminoacilaza se regăsește în proporție de 75% în fracția 30-60% saturație. Factorul de purificare (3) este mai scăzut decât în cazul

precipitării cu sulfat de amoniu. La fel și activitatea specifică (0,18 U/mg) este de 3 ori mai mică.

4. Precipitarea în continuare a fracției 0-70% saturație sulfat de amoniu cu 60% saturație acetonă nu duce la purificarea mai avansată a aminoacilazei.
5. Desalefierea prin dializă a fracțiilor obținute la precipitarea cu sulfat de amoniu este de foarte lungă durată (60-70 ore), cu consum mare de apă distilată și duce la inactivarea aproape totală a enzimei.
6. Desalefierea prin gel-filtrare pe Sephadex G-25 sau Filtradex R-25 nu duce la separarea netă a enzimei de sulfatul de amoniu.
7. Desalefierea prin gel-filtrare pe Sephadex G-50 sau Filtradex R-50 duce la separarea netă a enzimei de sulfatul de amoniu. Soluția inițială este diluată de 2-2,5 ori. Ca timp, procesul este de aproximativ de 5 ori mai scurt ca desalefierea prin dializă.
8. Debitul de eluare de pe coloana de desalefiere poate influența eficiența separării.
9. Dacă se realizează o purificare în două trepte a aminoacilazei (precipitare cu 70% saturație sulfat de amoniu și gel-filtrare pe Filtradex R-50), se obține o purificare de maximum 1,5 ori față de fracția precipitată cu sulfat de amoniu și de 10 ori față de extractul brut inițial.
10. Gel-filtrarea pe Sephadex G-100 duce la o purificare de 21,5 ori a aminoacilazei, cu un randament de recuperare a enzimei de 36%.
11. Purificarea pe Filtradex R-100 duce la rezultate mult mai slabe ca în cazul utilizării Sephadexului G-100; un factor de purificare doar de 3, cu o recuperare a enzimei de 25%.
12. Purificarea unui extract brut aminoacilazic în două trepte (precipitare cu 70% saturație sulfat de amoniu și gel-filtrare pe Sephadex G-100) duce la o purificare de aproape 130 de ori, cu un randament de recuperare al enzimei de 33%.
13. S-au obținut produse aminoacilazice solide (activitate specifică 0,02-0,07 U/mg) prin precipitarea cu 70% saturație sulfat de amoniu a unor extracte brute din culturi solide de *A. oryzae*, centrifugare, reluarea precipitatelor cu acetonă și uscare în curent de aer la temperatura camerei. Randamentele de recuperare au fost de 92-97% la 60% din experimente.

6. Imobilizarea aminoacilazei

Datele de literatură privind imobilizarea aminoacilazei (ACY) prezintă testări realizate utilizând diferite metode (Cap. 3):

- fixare chimică prin legături covalente
- imobilizare prin legare ionică de schimbători de ioni
- entrapare în rețea de gel de poliacrilamidă

Scopul cercetărilor efectuate a fost testarea unor suporturi indigene sau străine pentru imobilizarea aminoacilazei, în vederea utilizării ei pentru obținerea de L-aminoacizi. S-a urmărit obținerea unor preparate insolubile aminoacilazice cu activitate enzimatică ridicată, stabile în timp, și cu un randament de imobilizare cât mai mare.

S-au realizat imobilizări ale ACY prin legare covalentă și legare ionică pe diferite suporturi.

6.1. Determinarea activității aminoacilazei imobilizate

Activitatea ACY imobilizată se definește drept cantitatea de enzimă imobilizată pe 1ml de suport solid umed (sau 1g suport solid uscat) care determină eliberarea unui micromol de L-aminoacid (de exemplu metionină), într-un minut, în condiții date, utilizând drept substrat N-acetil-L-aminoacidul (N-acetil-L-metionină).

$$\text{Activitate} = \frac{\mu\text{moli L - aminoacid}}{\text{minut} \times \text{ml ACY imob.}} \quad (\text{U/ml})$$

sau

$$\text{Activitate} = \frac{\mu\text{moli L - aminoacid}}{\text{minut} \times \text{g ACY imob.}} \quad (\text{U/g})$$

Determinarea activității ACY imobilizate se realizează astfel: unui volum de soluție de N-acetil-D,L-aminoacid (metionină), cu concentrație cunoscută, aflată în anumite condiții de temperatură și pH, i se adaugă un volum definit de ACY imobilizată. După o perioadă de timp stabilită (30 minute), în care ACY a hidrolizat o parte din legăturile amidice din substrat, reacția este stopată și se determină cantitativ L-aminoacidul (metionina) eliberat.

Reactivii utilizați pentru determinări au fost:

- soluție N-acetil-D,L-aminoacid (metionină) 0,1M, pH 7,0 cu 1,5 mM CoCl₂ - preparată în laborator din reactivi de puritate analitică (Sigma, respectiv Chimopar, București);

- soluție tampon fosfat 0,1M, pH 7,0 preparată în laborator din reactivi de puritate analitică (Chimopar, București);

- reactivi pentru determinarea L-aminoacidului (metioninei) - identici cu cei prezentați la Cap. 4.1.

Modul de lucru: Într-un vas conic de 50 ml se introduc:

- 5 ml soluție tampon,

- 5 ml soluție N-acetil-D,L-metionină. Amestecul se termostatează la 37⁰C. Se adaugă apoi

- 5 ml ACY-imobilizată,

Adăugarea enzimei se consideră ca fiind timpul zero. Amestecul se incubează la 37°C cu agitare continuă. După exact 30 minute se filtrează. L-aminoacidul (metionina) eliberat se determină prin reacția cu ninhidrină. Pentru fiecare probă s-a realizat în paralel și o probă martor, în aceleași condiții, cu diferența că imediat după amestecarea celor trei componente s-a realizat filtrarea, fără incubarea la 37°C.

Activitatea ACY-immobilizată (A) s-a calculat cu una din relațiile:

$$A = \frac{(C_p - C_m) \times 10^3 \times 3}{M \times t \times V_{ACY} \times V_P} \quad (\text{U/ml})$$

sau

$$A = \frac{(C_p - C_m) \times 10^3 \times 3}{M \times t \times g \times V_P} \quad (\text{U/g})$$

unde: A - activitate enzimatică

C_p - cantitatea de L-aminoacid (metionină) eliberată în probă (mg)

C_m - cantitatea de L-aminoacid (metionină) eliberată în martor (mg)

10³ - factor de transformare în μg

M - masa moleculară a aminoacidului (metioninei)

t - timp de incubare (minute)

V_{ACY} - volum de ACY immobilizată (ml)

V_P - volum de filtrat luat pentru reacția cu ninhidrină (ml)

g - cantitatea de ACY immobilizată (g)

3 N factor de diluție

Activitatea aminoacilazei native și conținutul în proteine s-au determinat conform metodelor prezentate la Cap.4.1

6.2. Immobilizarea aminoacilazei prin legare covalentă

Pentru cuplarea covalentă a unei proteine (enzime) la un suport insolubil se pot utiliza mai multe tehnici:

- activarea suportului în vederea reacției cu grupări din proteină,
- utilizarea unui reactiv de cuplare pentru legarea proteinei la matricea suportului,
- activarea proteinei pentru cuplarea la suport.

Este important ca enzima să își mențină conformația după procedura de cuplare covalentă; să nu fie afectat centrul activ al enzimei prin antrenarea în cuplare a unor resturi de aminoacizi implicați în centrul activ; procedurile de cuplare (reactivi, pH, temperatură) să nu denatureze ireversibil proteina.

Resturile aminoacidice active, reactive pentru o cuplare covalentă sunt: amino din Lis sau aminoacidul N-terminal; sulfhidril din Cis; carboxil din Asp și Glu; fenolic din Tyr; guanidino din Arg; imidazol din His; indol din Trp; hidroxil din Ser; disulfidic din cistină [1].

Reacțiile specifice de cuplare utilizate sunt [341]:

- activarea cu bromcian a grupărilor hidroxil din policarbohidrați. Proteina va fi legată la suport prin intermediul resturilor aminice din Lis sau aminoacidul N-terminal;
- activarea suporturilor cu resturi carboxil prin legare de derivați de carbodiimidă apoi cuplarea cu enzima la nivelul resturilor amino;
- diazotarea suportului ce conține resturi fenilaminice apoi cuplarea la nivelul resturilor de Tyr, Lis, Arg;

- legarea enzimei (prin resturi de Lis, Cis, Tyr, His) la nivelul unor grupări tip anhidridă de pe suportul solid;
- legarea enzimei (prin resturi Cis, Lis, Ser) la grupări acilazidice de pe suportul solid;
- utilizarea de clorocian, sau derivați diclorurați ai suportului;
- suporturi cu resturi izotiocianat.

Pentru imobilizarea covalentă s-au utilizat câteva din procedurile amintite, utilizând aminoacilaza microbiană obținută în laborator. Soluțiile de aminoacilază s-au realizat, funcție de concentrația dorită, în apă, respectiv tampon.

a) Imobilizarea aminoacilazei pe Biozan R

Reactivii utilizați au fost:

- Biozan R - este un derivat celulozic saturat produs de firma Reanal - Ungaria.
- Agentul de cuplare a fost N,N-diciclohexil-carbodiimida (DCC) dizolvat în tetrahidrofuran (SIGMA).
- Tampon acetat 0,2 M, pH 4,5 (acetatul de sodiu și acidul acetic de la Chimopar București).
- Acetonă, utilizată ca reactiv precipitant al Biozanului (Chimopar București).

Reacția de cuplare a enzimei s-a realizat prin procedeul în baie, cu agitare magnetică, la temperatura de 4-8⁰C.

Modul de lucru: 0,3 g Biozan R s-au suspendat în 20 ml soluție apoasă ACY. S-au dizolvat 0,1 g DCC în 6 ml tetrahidrofuran și soluția obținută s-a adăugat la suspensia de Biozan R - enzimă. S-a agitat magnetic 8 ore la temperatură mai mică de 8⁰C. Deoarece la pH 7,0 Biozanul este sub formă de gel și nu s-a putut separa de soluția enzimatică, s-au adăugat 20 ml tampon acetat 0,2 M, pH 4,5. Biozanul nu a precipitat nici în aceste condiții. S-a realizat apoi precipitarea cu un amestec de acetonă : apă (70:30, raport volumetric). Precipitarea nu a fost completă. Precipitatul a fost separat prin centrifugare 20 minute la 4000 rpm și spălat cu apă (25 ml) apoi recentrifugat. În toate aceste faze separarea nu a fost netă, pierzându-se o parte din produs.

Precipitatul rămas a fost reluat cu apă și suspensia s-a utilizat pentru determinarea activității aminoacilazice.

Biozan R a avut greutatea specifică de 0,0034 g/ml.

b) Imobilizarea aminoacilazei pe carboximetilceluloză (CM-celuloză)

CM-celuloza a fost furnizată de Catedra de Compuși Macromoleculari a Facultății de Chimie Industrială Iași. Legarea enzimei s-a realizat tot prin intermediul DCC.

Modul de lucru: 0,5g CM-celuloză s-au dizolvat sub agitare în 25 ml tampon acetat 0,2 M pH 4,5. S-au adăugat 20 ml soluție apoasă ACY. 0,1 g DCC s-au dizolvat în 1 ml tetrahidrofuran și soluția obținută s-a adăugat la cea de CM-celuloză - enzimă. S-a agitat 8 ore la temperatură mai mică de 10⁰C. S-au adăugat 5 ml tetrahidrofuran sub agitare. A precipitat preparatul CM-celuloză - ACY care a fost separat prin centrifugare 10 minute la 4000 rpm. Precipitatul a fost spălat în cuvele de centrifugare de mai multe ori (234 ml în total) cu tampon acetat apoi s-a reluat cu apă.

c) Imobilizarea aminoacilazei pe CM-celuloză cloracetilată

CM-celuloza poate fi activată prin transformare în clorură acidă ce reacționează puternic cu grupările aminice din lanțul proteic. În acest caz nu este necesar un reactiv de cuplare.

CM-celuloza cloracetilată (CM-cel-Cl-Ac) a fost furnizată de către Catedra de Compuși Macromoleculari a Facultății de Chimie Industrială Iași. Fosfații monosodic și disodic, necesari preparării soluției tampon au fost de puritate analitică (Chimopar București).

Modul de lucru: 0,2g CM-cel-Cl-Ac s-au suspendat în 20 ml soluție apoasă ACY apoi s-au adăugat 20 ml tampon fosfat 0,1M, pH 7,0. Amestecul s-a agitat 2,5 ore la 3-5°C. Suspensia s-a centrifugat 10 minute la 4000 rpm. Precipitatul a fost spălat în cuvele de centrifugare cu 30 ml tampon fosfat. Precipitatul separat a fost uscat la temperatura camerei.

d) Imobilizarea aminoacilazei pe N-(4-carboxifenil)-carboximetil-celulozamidă (CCA)

CCA a fost preparată la Catedra de Compuși Macromoleculari a Facultății de Chimie Industrială Iași, prin condensarea CM-Celuloză-clorură acidă cu acid 4-aminobenzoic. Gruparea carboxilică nouă introdusă, fiind legată de un nucleu benzenic, are o constantă de aciditate de trei ori mai mare decât gruparea carboxilică din CM-celuloză. În consecință, cu acest derivat se obține mult mai ușor activarea cu derivatul carbodiimidic (DCC).

Modul de lucru: 0,2 g CCA s-au suspendat în 10 ml soluție apoasă ACY. La suspensie s-au adăugat 0,125 g DCC dizolvat în 10 ml tampon fosfat 0,1M, pH 7,0 și 1 ml tetrahidrofuran pentru asigurarea unei dizolvări complete a DCC. Suspensia s-a agitat magnetic 6 ore la 7-10°C apoi s-a lăsat în repaus 17 ore la 4°C. În continuare s-a centrifugat 10 minute la 5000 rpm. Precipitatul obținut a fost spălat în cuva de centrifugare, de mai multe ori, cu un volum total de 200 ml tampon fosfat. După separare precipitatul a fost uscat la temperatura camerei.

Rezultate obținute [342]

Imobilizarea aminoacilazei prin legare covalentă s-a realizat pe cele patru tipuri de suporturi conform modului de lucru prezentat. Soluția ACY s-a obținut prin dizolvarea în apă distilată a preparatelor ACY obținute în laborator din culturi microbiene de *A. oryzae*. S-a determinat activitatea aminoacilazică a soluției enzimatică inițiale și a apelor, respectiv a tampoanelor de spălare, conform metodei prezentate la Cap. 4.1. În aceste soluții s-a determinat și conținutul în proteine cu metoda Lowry.

Spălarea preparatului imobilizat s-a realizat în fiecare caz până în momentul în care în apa de spălare nu s-au mai detectat proteine.

S-au calculat, pentru fiecare determinare:

a) Încărcarea suportului: reprezintă numărul de unități enzimatică aminoacilazice raportat la un ml (sau 1g) suport luat la imobilizare. Unitățile enzimatică totale s-au calculat multiplicând activitatea aminoacilazică a soluției (U/ml) cu volumul (ml) de soluție luat în lucru;

b) Activitatea produsului imobilizat - s-a determinat conform metodei prezentate la Cap.6.1.

c) Randamentul de fixare a proteinelor - reprezintă raportul:

$$\eta_{\text{fixare proteine}} = \frac{\text{mg proteine totale fixate pe suport solid}}{\text{mg proteine totale initiale}} \times 100 \quad (\%)$$

unde mg proteine totale fixate pe suport se calculează ca diferență între mg proteine totale a soluției enzimatică inițiale și mg proteine totale determinate în soluțiile de spălare.

d) Randamentul de imobilizare reprezintă raportul:

$$\eta_{\text{imobilizare}} = \frac{\text{unitati enzimatice totale fixate pe suport}}{\text{unitati enzimatice totale in solutia ACY initiala}} \times 100 \quad (\%)$$

Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 6.1.

Tabel 6.1. Imobilizare prin legare covalentă a aminoacilazei

Suport	Activare	Încărcare U/ml	Activitate imobilizat U/ml	η fixare prot. %	η imobil. %
Biozan R	DCC	1,89	0,19	35,20	10,06
CM-celuloză	DCC	1,09	0,137	42,64	12,64
CM-celuloză-Cl-acetilată	-	42 U/g	0,28 U/g	1,30	0,66
CCA	DCC	28,54 U/g	4,16 U/g	26,5	11,74

DCC = N,N'-diclohexil carbodiimidă

CCA = N-(4-carboxifenil)-carboximetil-celulozamidă

Se observă că în toate cele trei cazuri în care s-a utilizat DCC pentru fixarea covalentă s-au obținut randamente de imobilizare de 10-12 %. Valori atât de mici se datorează, probabil, denaturării enzimei pe parcursul procesului de imobilizare covalentă, sau implicarea în legarea la suport a unor grupări funcționale din centrul activ al enzimei. De asemenea, pierderile pe parcursul separării produsului solid au fost mari, fie că suportul s-a prezentat sub forma unui gel greu centrifugabil (în cazul Biozan R), o parte rămânând în suspensie.

În cazul legării covalente directe enzimă-suport (CM-celuloză cloracetilată) randamentul de imobilizare este sub 1%, total necorespunzător scopului urmărit.

6.3. Imobilizarea aminoacilazei prin legare ionică

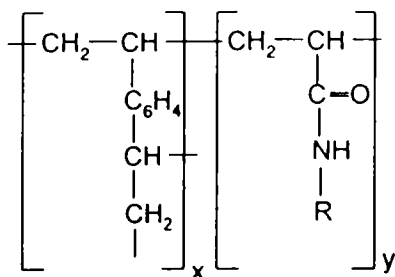
Metoda se bazează în principal pe legarea ionică a enzimei la suportul solid ce conține grupări funcționale schimbătoare de ioni. În practică legarea proteinei se face, de fapt, atât prin legături ionice cât și prin legături van der Waals. Ca și în cazul adsorbției, imobilizarea enzimei se realizează ușor, în condiții blânde, comparativ cu cele mult mai drastice necesare unor legături covalente.

În unele situații, cum ar fi schimbarea pH-ului și/sau a tăriei ionice, poate avea loc o desprindere a enzimei de pe suport.

Datorită condițiilor blânde de legare, modificarea conformațională a enzimei este mult mai redusă, deci și pierderea de activitate. În plus, nefiind o legare covalentă, în cazul pierderii activității, fie prin desprinderea enzimei de pe suport fie prin inactivare, complexul imobilizat se poate regenera, nepierzându-se, o dată cu enzima, și suportul.

6.3.1. Imobilizarea aminoacilazei prin legare ionică pe suporturi tip Ponilex AS [344,345]

Ponilex AS sunt schimbători de ioni de tip anionic, furnizați de Institutul "Petru Poni" Iași. Au formula generală:



Diferențele între tipurile de Ponilex se datorează substituentului (grupării funcționale) NR, a raportului x/y și a gradului de reticulare.

Pregătirea suportului - constă în trecerea în bază liberă și apoi tamponare. Pentru aceasta suportul s-a introdus într-o coloană cromatografică. S-a trecut prin coloană, pentru purificare, o soluție HCl 4 % (300 ml/10 ml suport), urmată de o spălare cu apă (aproximativ 150 ml/10 ml suport). S-a trecut apoi prin coloană o soluție de NaOH 4 % (300 ml/10 ml suport) cu o încărcare specifică 20, unde:

$$\text{incarcare specifica} = \frac{\text{Volum NaOH}}{\text{Volum suport} \times 1 \text{ ora}}$$

S-a spălat apoi coloana cu apă distilată (tot cu încărcarea specifică 20) până ce efluentul nu a mai dat reacție pozitivă cu fenolftaleina. Suportul a fost trecut astfel în bază liberă. Tamponarea a constat în trecerea prin coloană a unui tampon fosfat 0,3M de pH dorit, până ce efluentul a prezentat pH-ul tamponului. S-a spălat, în continuare, coloana cu tampon fosfat 0,03M, de același pH (aproximativ 150 ml/10 ml suport). Suportul astfel pregătit s-a utilizat pentru imobilizarea enzimei.

a) Imobilizarea aminoacilazei pe suporturi tip Ponilex AS - procedeul în baie

Procedeul constă în punerea în contact a enzimei cu suportul solid într-un vas conic, cu agitare, fără, sau combinat.

Reactivii utilizați au fost:

- diferite suporturi schimbătoare de ioni (slab anionice) de tip Ponilex AS - furnizate de Institutul "Petru Poni" - Iași, cu caracteristicile prezentate în Tabelele 6.2 și 6.3.
- tampon fosfat pH 7,5, cu concentrații 0,3 M; 0,2 M; 0,03 M; 0,02 M (Na₂HPO₄ și NaH₂PO₄ - reactivi pentru analiză - Chimopar București)
- soluții HCl 4 % și NaOH 4 % (HCl și NaOH - reactivi pentru analiză - Chimopar București, respectiv Lachema)
- soluție aminoacilază, de diferite activități (aminoacilază obținută și purificată în laboratorul propriu din culturi microbiene de *A. oryzae*)
- reactivi pentru determinarea activității aminoacilazice (Cap. 4.1, respectiv 6.1.)
- reactivi pentru determinarea conținutului în proteine (Cap. 4.1.).

Imobilizarea: Pentru suporturile Ponilex AS 57 și 73: suportul tamponat la pH 7,4 și 0,03 M s-a suspendat în soluția ACY și s-a agitat magnetic timp de 6 ore la 8 - 10°C. S-a lăsat apoi în contact timp de 16 ore la 4°C. S-a filtrat și s-a spălat pe filtru cu tampon fosfat 0,03M pH 7,4 până când în soluția de spălare nu s-au mai detectat proteine.

Pentru suporturile Ponilex AS 98, 106, 108, ASH 13 și 14: suportul tamponat la pH 7,5 s-a suspendat în soluția ACY și s-a lăsat în contact, fără agitare și la temperatura camerei timp de 24 de ore. Apoi s-a filtrat și s-a spălat pe filtru cu tampon fosfat 0,02M, pH 7,5 până când în soluția de spălare nu s-au mai detectat proteine.

b) Imobilizarea aminoacilazei pe suporturi tip Ponilex AS N procedeul în coloană

Procedeul constă în punerea în contact a enzimei cu suportul prin trecerea, cu un anumit debit, a soluției enzimatică printr-o coloană umplută cu suportul tamponat.

Reactivii utilizați au fost:

- diferite suporturi schimbătoare de ioni (slab anionice) de tip Ponilex AS - furnizate de Institutul "Petru Poni" - Iași, cu caracteristicile prezentate în Tabelul 6.3.

- reactivii prezentați la paragraful a)

Imobilizarea: Suportul tamponat la pH 7,4; 0,03 M s-a introdus în coloana cromatografică (10 x 1,2 cm), suspendat în tampon fosfat 0,03 M, pH 7,4. S-a scurs tamponul până la nivelul suportului. S-a trecut apoi prin coloană soluția ACY cu un debit de 25 ml/oră. Coloana a fost spălată cu tampon fosfat 0,03M pH 7,4 până când în efluent nu s-au mai detectat proteine.

Rezultate obținute

Imobilizarea aminoacilazei prin legare ionică pe suporturi tip Ponilex-AS s-a realizat conform modului de lucru prezentat. În toate cazurile s-au determinat activitatea aminoacilazică și conținutul în proteine a soluției ACY inițiale și a tamponelor de spălare după procedura de imobilizare, precum și activitatea produsului imobilizat. S-au calculat încărcarea suportului, randamentul de fixare al proteinelor și randamentul de imobilizare. Rezultatele obținute în cazul imobilizării ACY pe Ponilex AS - procedeul în baie sunt prezentate în Tabelul 6.2. iar pentru procedeul în coloană în Tabelul 6.3.

Tabel 6.2. Imobilizare pe geluri tip Ponilex - procedeul în baie

Nr. crt.	Suport	Grupare funcțională	Încărcare U/ml	Activitate imobilizat U/ml	η fixare proteine %	η imobil. %
1	AS 57 ret. 2 %	etilenamină	0,54	0,300	74,70	55,00
2	Idem	Idem	0,91	0,072	67,83	7,88
3	Idem	Idem	1,01	0,272	68,60	27,01
4	Idem	Idem	2,35	0,257	25,75	10,92
5	AS 57 ret. 3 %	Idem	0,96	0,178	64,00	18,47
6	AS 63 ret. 3 %	etilendiaminoetil amină	2,65	0,476	67,70	7,88
7	AS 98 7,46 meq/g	etilamină	0,94	0,5	53,12	61,54
8	AS 106 4,48 meq/g	N,N-dimetilamino-propilamină	1,42	1,38	96,57	69,23
9	AS 106 4,48 meq/g	Idem	2,78	3,78	98,47	42,50
10	AS 108 6,04 meq/g	etilenamină - N,N-dimetil-propilamină	7,85	1,02	12,90	73,00
11	ASH 13 1,95 meq/g	hidrazină	0,64	0,50	78,04	48,65
12	ASH 14 2,07 meq/g	Idem	1,63	0,73	44,8	40,87

Testările efectuate au urmărit găsirea unui suport care să dea atât un randament bun de imobilizare cât și o enzimă imobilizată cu activitate ridicată.

Comparând rezultatele obținute se observă că pentru gruparea funcțională etilamină activitatea preparatului obținut crește o dată cu încărcarea gelului, în schimb randamentul de imobilizare scade, de la 69 % pentru încărcare 0,94 U/ml la 10 % pentru o încărcare de 2,35%.

În cazul radicalului N,N-dimetilamină-propilamină rezultatul este asemănător, randamentul de imobilizare scade iar activitatea enzimei imobilizate crește, variație ce se respectă și în cazul substituentului hidrazinic. Acest lucru este valabil atât pentru imobilizarea prin procedeul în baie, cât și în cazul procedeului în coloană.

Prin urmare există o încărcare optimă a suportului cu enzimă, lucru explicabil prin depășirea capacității de schimb a suportului peste o anumită concentrație a enzimei.

Comparând rezultatele obținute pentru o încărcare a suportului asemănătoare, se observă că rezultate bune, atât în ce privește activitatea imobilizatului cât și a randamentului de imobilizare, se obțin atât pentru radical etilenamină cât și N,N-dimetilaminopropilamină.

Tabel 6.3. Imobilizare pe geluri tip Ponilex - procedeul în coloană

Nr. crt.	Suport	Grupă funcțională	Încărcare U/ml	Activitate imobilizat U/ml	η fixare prot. %	η imobil. %
1	AS 57 ret. 2 %	Etilenamină	0,54	0,30	54,71	54,78
2	AS 73 ret. 6 %	etilendiaminoetilamină	4,00	0,221	18,25	5,93
3	AS 74 ret. 6 %	N,N-dimetilamino-propil-amină	2,87	1,241	62,12	43,76
4	AS 74 ret. 3 %	Idem	1,86	0,922	64,48	49,50
5	AS 83 ret. 3 %	idem	0,96	0,087	19,37	9,02
6	Idem	Idem	1,31	0,098	9,66	7,50
7	Idem	Idem	1,56	0,081	25,68	5,19

În cazul suportului Ponilex AS 108, cu funcțiune mixtă, randamentul de imobilizare este foarte bun, peste 70 %; randamentul de fixare a proteinelor fiind doar de 12 %, se poate trage concluzia că, în acest caz, o dată cu imobilizarea enzimei a avut loc și o purificare a sa. Totuși, pentru o încărcare de 7,85 U/ml, activitatea obținută pentru imobilizat este relativ mică, de doar 1,02 U/ml.

Comparând cele două procedee, în baie și în coloană, rezultatele sunt destul de apropiate ca să se prefere procedeul în coloană, mult mai ușor de realizat, cu o mai mică manipulare a suportului, ceea ce duce la micșorarea pierderilor în timpul procedurii de imobilizare.

6.3.2. Imobilizarea aminoacilazei prin legare ionică pe suporturi tip Sephadex și Filtradex [346,347]

Gelurile de tip Sephadex (produse de Pharmacia Fine Chemicals) respectiv Filtradex (produse de Institutul "Petru Poni" Iași) au la bază un polizaharid natural N dextran - produs de *Leuconostoc mesenteroides*. În stare naturală este un produs ușor solubil în apă. Prin reticulare cu epichelorhidrină se obține un compus cu rețea tridimensională, total insolubil în

apă. Schimbătorii de ioni de tipul Sephadexului, respectiv Filtradexului, sunt obținuți prin introducerea de grupări funcționale în structura de bază.

Reactivii utilizați au fost:

- DEAE-Sephadex A25, cu următoarele caracteristici:
 - anionit slab bazic
 - grupări funcționale - dietilaminoetil (DEAE)
 - ion interschimbabil - Cl^{N}
 - capacitate totală $3,5 \pm 0,5$ meq/g, respectiv 0,5 meq/ml
 - DEAE-Sephadex A50 - are caracteristici identice cu cele ale DEAE-Sephadex A25, diferă doar prin capacitatea totală raportată per mililitru gel (0,175 meq/ml)
 - DEAE-Filtradex R50 - are proprietăți similare cu DEAE-Sephadex A50
 - NaOH 0,1 N
 - tampon fosfat pH 7,0 cu concentrații 0,1 M; 0,2 M; 0,4 M; 0,7 M; 1,0 M
 - acetat de sodiu 0,2 M
 - soluție ACY de diferite concentrații (respectiv activități) S-a utilizat enzima obținută în laborator.
 - reactivi utilizați la determinarea activității aminoacilazice (Cap 4.1. și 6.1.)
 - reactivi utilizați la determinarea conținutului în proteine (Cap 4.1.).
- Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , CH_3COONa au fost reactivi pentru analiză - Chimopar București.

Pregătirea suportului: 1 g DEAE-Sephadex sau DEAE-Filtradex s-a suspendat în 10 ml apă distilată apoi la suspensie s-au adăugat 50 ml NaOH 0,1 N. S-a agitat magnetic 3 ore apoi s-a filtrat. Gelul s-a spălat pe filtru cu apă distilată până când filtratul a fost neutru. Gelul s-a reluat cu 50 ml tampon fosfat 0,1 M, pH 7,0 și s-a agitat magnetic 3 ore. S-a lăsat în repaus 16 ore la 4°C , apoi s-a filtrat. Suportul astfel activat și tamponat s-a utilizat în continuare pentru imobilizare.

Imobilizarea aminoacilazei: Suportul tamponat s-a reluat cu soluția ACY și s-a agitat magnetic 3 ore, apoi s-a filtrat. Gelul s-a reluat cu 50 ml acetat de sodiu 0,2 M și s-a agitat magnetic o oră, apoi s-a filtrat. S-a spălat pe filtru cu apă distilată până când în filtrat nu s-au mai detectat proteine.

6.3.2.1. Influența caracteristicilor tamponului asupra imobilizării aminoacilazei

a) Influența concentrației tamponului asupra imobilizării

Studiul s-a realizat pentru imobilizarea ACY pe DEAE-Sephadex A50 și DEAE-Filtradex R50.

Reactivii utilizați au fost cei prezentați anterior.

Mod de lucru: Gelurile au fost tamponate cu tampon fosfat pH 7,0 și cu concentrații între 0,1 M și 1 M, conform metodei prezentate, pornindu-se de la 0,1 g material solid. Peste gelurile obținute s-au adăugat câte 3 ml soluție ACY (0,64 U/ml), s-au agitat timp de 15 minute după care s-au filtrat.

b) Influența concentrației tamponului asupra desorbției aminoacilazei de pe suport

Studiul s-a realizat pentru aminoacilaza imobilizată pe DEAE-Filtradex R50, cu o activitate de 0,194 U/ml.

Reactivii utilizați au fost cei prezentați anterior.

Mod de lucru: Într-un reactor termostatat la 37°C s-au introdus 10 ml DEAE-Filtradex R50 - ACY (0,194 U/ml) și 10 ml tampon fosfat pH 7,0 și cu concentrații între 0,2M și 1M. Suspensia a fost agitată magnetic 15 minute la 20°C respectiv 30 minute la 37°C . Apoi s-a filtrat.

Rezultate obținute

Concentrația tamponului utilizat la tamponarea gelului are importanță în ceea ce privește imobilizarea enzimei. În testările realizate s-au determinat activitatea aminoacilazică a soluției inițiale și a filtratului rămas în urma imobilizării. S-a calculat un randament de regăsire al enzimei în filtratul rămas la imobilizare cu formula:

$$\eta_{\text{regasire}} = \frac{U \text{ totale in filtrat}}{U \text{ totale initiale}} \times 100 \quad (\%)$$

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 6.4.

Tabel 6.4. Influența concentrației tamponului asupra imobilizării aminoacilazei

Concentrație tampon M	DEAE - Sephadex A50 $\eta_{\text{regasire}} (\%)$	DEAE - Filtradex R50 $\eta_{\text{regasire}} (\%)$
0,1	0,32	0,36
0,2	0,31	1,04
0,3	1,03	2,19
0,4	1,73	4,39
0,5	2,84	12,82
0,7	11,72	13,55
1,0	15,38	17,88

Restul de activitate enzimatică, negăsită în filtrat, s-a considerat a fi imobilizată. Deoarece nu s-a determinat activitatea imobilizatei, nu se poate preciza dacă enzima reținută pe suport a fost în formă activă sau nu.

Totuși datele obținute sunt destul de evidente, permițând să se tragă concluzia că, o dată cu creșterea concentrației tamponului utilizat la pregătirea gelului, scade cantitatea de enzimă reținută pe gel. Având în vedere că imobilizarea se realizează prin legare ionică, o concentrație salină prea ridicată aduce fie suportul, fie enzima (sau amândouă) într-o stare de ionizare neadecvată cuplării. Deci, pentru imobilizarea aminoacilazei pe geluri schimbătoare de ioni, este recomandat să se utilizeze tamponuri cu concentrații sub 0,1 M.

Concentrația tamponului are influență și asupra desorbției enzimei de pe substrat, lucru absolut normal de vreme ce enzima este imobilizată prin legare ionică. S-au determinat, în acest caz, activitatea aminoacilazică a preparatului imobilizat (DEAE - Filtradex R50 - ACY) și a filtratului obținut în urma contactului imobilizatului cu tamponuri fosfat de diferite concentrații. S-a calculat un randament de desorbție al enzimei de pe suport.

$$\eta_{\text{desorbție proteine}} = \frac{U \text{ totale in filtrat}}{U \text{ totale ale imobilizatului initial}} \times 100 \quad (\%)$$

Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 6.5.

Tabel 6.5. Influența concentrației tamponului asupra desorbției aminoacilazei de pe DEAE-Filtradex R-50

Conc. tampon M	$\eta_{\text{desorbție}}$ (%) 15 minute, 20°C	$\eta_{\text{desorbție}}$ (%) 30 minute, 37°C
0,2	2,89	6,47
0,4	15,20	8,34
0,7	20,27	22,22
1,0	22,52	42,83

După cum era de așteptat, prelungirea timpului de contact imobilizat - tampon (de la 15 min la 30 min) ca și creșterea temperaturii mărește gradul de desorbție al enzimei de pe suport. La 37°C și timp de 30 min aproape 50 % din enzimă este desorbită.

Din acest studiu rezultă că la concentrații ale tamponului mai mari de 0,2 M desorbția aminoacilazei de pe DEAE - Filtradex R50 este inevitabilă. Pentru desorbția totală a aminoacilazei, în scopul regenerării și refolosirii suportului se recomandă concentrații ale tamponului de eluare mai mari de 2M.

6.3.2.2. Influența încărcării suportului asupra imobilizării aminoacilazei

Studiul s-a realizat pe suporturile DEAE-Sephadex A25 și A50 și DEAE-Filtradex R50.

Reactivii utilizați și procedura de imobilizare au fost cele prezentate la Cap. 6.3.2, variind numărul de unități enzimatică luate în imobilizare, raportate la 1 ml de gel.

S-au determinat activitatea și conținutul în proteine al soluției ACY inițiale, a soluțiilor de spălare și a preparatelor imobilizate obținute.

S-au calculat încărcarea gelului (U/ml), randamentul de fixare al proteinelor și randamentul de imobilizare.

Rezultate obținute

Pentru imobilizarea pe DEAE-Sephadex A25 rezultatele sunt prezentate în Tabelul 6.6.

Tabel 6.6. Imobilizare pe DEAE-Sephadex A-25 (cap.tot. = 0,5 meq/ml)

Nr. crt.	Încărcare Enzimă/suport U/ml	Activitate ACY imobil. U/ml	η fixare proteine %	η imobil %
1	8,66	1,858	35,22	21,45
2	11,80	3,224	57,78	27,32
3	12,48	2,412	63,25	19,32

Se observă că randamentul de imobilizare ca și activitatea preparatului depind clar de încărcarea suportului. O încărcare peste 12 U/ml duce la scăderea randamentului de imobilizare sub 20 % față de 27 % maxim obținut, capacitatea de legare a suportului fiind, probabil, depășită.

Pentru DEAE-Sephadex A50 rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 6.7.

Tabel 6.7. Imobilizare pe DEAE-Sephadex A-50 (cap. tot. = 0,175 meq/ml)

Nr. crt.	Încărcare Enzimă/suport U/ml	Activitate ACY imobil. U/ml	η fixare proteine %	η imobil. %
1	4,31	2,380	82,42	55,15
2	4,60	1,933	79,93	42,24
3	6,49	3,201	74,21	49,35
4	7,30	2,772	72,65	37,95

Datele obținute sunt mai puțin concludente, apărând o scădere la încărcare de 4,60 U/ml. Totuși, o încărcare a suportului peste 6,5 U/ml duce și în acest caz la o scădere a activității imobilizatorului și a randamentului de imobilizare.

Pentru imobilizarea pe DEAE - Filtradex R50, rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 6.8.

Tabel 6.8. Imobilizare pe DEAE-Filtradex R-50 (cap.tot. = 0,175 meq/ml)

Nr. crt.	Încărcare Enzimă/suport U/ml	Activitate ACY imobil. U/ml	η fixare proteine %	η imobil %
1	2,57	1,21	58,08	47,08
2	3,32	1,16	58,09	34,84
3	6,61	2,00	44,13	30,65
4	10,31	2,37	44,20	22,89

În acest caz activitatea imobilizatului crește cu creșterea încărcării gelului, în schimb randamentul de imobilizare scade net la o încărcare de peste 2,5 U/ml.

Comparând cele trei tipuri de gel se observă că DEAE-Sephadex A25 prezintă randamente de imobilizare de aproape 2 ori mai mici decât cele obținute în cazul DEAE-Sephadex A50 respectiv DEAE-Filtradex R50. Deci o capacitate de schimb ionic mai mare are influență negativă asupra procesului de imobilizare, probabil o parte din enzimă fiind inactivată prin legarea ionică în mai multe puncte la suportul solid. Produsul românesc DEAE - Filtradex R50 este aproape la fel de performant în ceea ce privește activitatea imobilizatului obținut (2 U/ml față de 3,2 U/ml la aceeași încărcare a gelului) și randamentul de imobilizare (maxim de 47 % față de 55 %).

6.3.3. Imobilizarea aminoacilazei pe DEAE-Filtradex R50 la scară semipilot

Deoarece s-a urmărit, în continuare, utilizarea ACY imobilizată pentru obținerea L-metioninei și a D-fenilglicinei, s-au realizat o serie de imobilizări la scară mare.

Reactivii utilizați și procedura de imobilizare au fost cele prezentate la Cap. 6.4, mărind corespunzător cantitățile, respectiv volumele de reactanți luați în lucru.

S-au determinat activitatea aminoacilazică și conținutul în proteine pentru enzima nativă, apele de spălare și preparatul imobilizat.

Modalitatea de calcul este identică cu cea prezentată anterior.

Rezultatele pentru cele trei imobilizări realizate sunt prezentate în Tabelul 6.9.

Tabel 6.9. Imobilizarea aminoacilazei pe DEAE-Filtradex R50 la scară semipilot

Nr. Crt.	Volum suport ml	Încărcare Enzimă/suport U/ml	Activitate ACY imobil. U/ml	η fixare proteine %	η imobilizare %
1	241	3,32	1,16	40,8	34,9
2	1200	2,51	0,98	41,6	40,3
3	7580	2.02	0,90	47,2	44,5

Și în acest caz activitatea imobilizatului crește cu creșterea încărcării suportului. Randamentul de fixare a proteinelor, respectiv de imobilizare a enzimei se situează în aceleași limite ca la experimentele anterioare.

Imobilizatele astfel obținute s-au folosit, în continuare, pentru studiile cinetice, respectiv pentru hidroliza stereoselectivă a N-acetil-D,L-aminoacizilor.

6.4. Concluzii

În urma testelor realizate pentru imobilizarea aminoacilazei pe diferite suporturi și prin diferite metode se pot trage următoarele concluzii:

1. Dintre cele două procedee testate, imobilizare prin legare covalentă și prin legare ionică, mult mai simplă, ca procedură și ca reactivi utilizați, este imobilizarea prin legare ionică.
2. Suportul celulozic Biozan R, utilizat pentru legarea covalentă a aminoacilazei prin cuplare cu N,N-diciclohexil-carbodiimidă s-a separat foarte greu din mediul de reacție, prezentându-se sub formă de gel. Activitatea imobilizatului a fost sub 0,2 U/ml, la un randament de imobilizare de 10%.
3. CM-celuloza și N-(4-carboxifenil)-carboximetil-celulozamida au legat covalent aminoacilaza cu randament de imobilizare asemănător, de 11 N 12%, dar, comparând randamentele de legare a proteinei, mai mic în cazul celui de-al doilea suport, s-ar putea spune că se face o legare preferențială a aminoacilazei din totalul de proteine prezente. Deci acest gel se pare că realizează și o oarecare purificare a enzimei.
4. Legarea aminoacilazei la CM-celuloză-cloracetilată este total necorespunzătoare scopului urmărit, randamentul de imobilizare fiind sub 1%.
5. La imobilizarea prin legare ionică pe suporturi tip Ponilex, prin cele două procedee, în baie și pe coloană, s-au obținut randamente de imobilizare asemănătoare (pentru geluri identice), dar procedeul în coloană este mult mai simplu de realizat din punct de vedere practic, necesitând o mai simplă manipulare a suportului, deci și pierderile sunt mai reduse.
6. Tipul de Ponilex cu rezultatele cele mai bune este AS 106 care are gruparea funcțională, N,N-dimetilaminopropilamină. Randamentele de imobilizare sunt între 40% și 70%, iar activitățile între 0,9 și 3,8 U/ml. Activitatea imobilizatului crește cu încărcarea gelului și cu gradul de reticulare al acestuia, dar randamentul de imobilizare scade.

7. Cele două suporturi schimbătoare de ioni, DEAE-Sephadex și DEAE-Filtradex utilizate pentru legarea ionică a aminoacilazei, au prezentat rezultate asemănătoare din punct de vedere al randamentului de imobilizare (40 N 50%). Cât privește activitatea aminoacilazică a imobilizatului, rezultate mai bune s-au obținut în cazul DEAE-Sephadex A-50 (maximul de 3,2 U/ml, față de 2,37 U/ml în cazul DEAE-Filtradex R-50).
8. Valori crescătoare ale încărcării enzimă/suport duc la creșterea activității imobilizatului, dar cu o scădere a randamentului de imobilizare, fapt ce se menține și la imobilizarea la scară mare pe suportul românesc.
9. Creșterea concentrației tamponului utilizat în timpul exploatării aminoacilazei imobilizate pe DEAE-Sephadex A-50 și DEAE-Filtradex R-50 peste 0,2 M duce la desorbția avansată a enzimei de pe suport. Procesul este accelerat și de temperatură, dar de două ori mai mult în cazul suportului românesc.

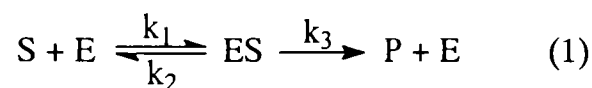
7. Influența parametrilor de reacție asupra activității aminoacilazei solubile și imobilizate [233,246]

Reacțiile enzimaticе sunt influențate de o serie de parametri cum sunt tipul și concentrația enzimei utilizate, concentrația inițială a substratului (și tipul acestuia), pH-ul, temperatura, prezența unor activatori sau inhibitori și concentrația acestora, etc. Pentru a putea studia influența acestor parametri asupra vitezei reacției enzimaticе se poate determina activitatea enzimei. Dar aceasta reprezintă, de fapt, valoarea vitezei de reacție la un moment dat (în cazul sistemului studiat la 30 minute). Pentru studiarea influenței pH-ului, temperaturii, a ionilor asupra vitezei de reacție s-a recurs la această metodă. Dar pentru studiul influenței concentrației de substrat asupra vitezei de reacție (și determinarea parametrilor cinetici K_m și V_{max}), ca și a concentrației de enzimă, acest tip de studiu nu mai dă, în toate cazurile, rezultate credibile. După cum s-a prezentat și în datele de literatură, vitezele reacțiilor enzimaticе se modifică în timp, și anume scad. Acest fenomen se datorează unor factori cum sunt denaturarea enzimei în timp, inhibiția de produs, scăderea saturației enzimei pe măsură ce substratul se consumă, inactivarea coenzimei (dacă este cazul), creșterea vitezei inverse, de transformare a produsului în substrat, pe măsură ce crește concentrația produsului. Este critic, astfel, să se determine viteza inițială de reacție, adică la momentul zero al reacției, când factorii amintiți anterior sunt ne semnificativi. Variația vitezei de reacție în timp este, în acest caz, liniară.

7.1. Influența concentrației inițiale a substratului asupra vitezei de reacție și determinarea parametrilor cinetici K_m și V_{max}

În cazul majorității reacțiilor enzimaticе, curba cinetică corespunde unei relații matematice de tip ecuație Michaelis-Menten. Graficul variației vitezei de reacție cu concentrația de substrat are forma unei hiperbole rectangulare.

Hidroliza N-acetil-L-aminoacizilor în cataliza aminoacilazei I poate fi considerată ca o reacție cu un singur substrat deoarece se lucrează la diluții mari ale substratului. Schematic, reacția enzimatică se poate reprezenta astfel:



Viteza inițială de reacție este dată de formula Michaelis-Menten:

$$v_i = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

în care

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (3)$$

V_{max} și K_m se pot calcula prin procedeul lui Lineweaver-Burke care inversează expresia ecuației de viteză pentru a obține o dreaptă:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4)$$

Având în vedere că viteza reacției crește o dată cu creșterea concentrației substratului, este mai avantajos, din punct de vedere industrial, să se lucreze la concentrații cât mai mari, dar acest lucru este limitat de concentrația de saturație, când se ajunge la valoarea maximă a vitezei de reacție. Valoarea K_m , care exprimă afinitatea enzimei pentru un anumit substrat, este, de asemenea, important de cunoscut, în funcție de aceasta se va putea decide dacă procesul cercetat la scară de laborator, se poate aplica, din punct de vedere economic, la scară industrială.

Avantajele utilizării enzimelor imobilizate au fost prezentate anterior în Cap. 2. Informațiile privind modificarea proprietăților enzimatică cauzate de imobilizarea enzimei (sau a celulelor) sunt utile nu numai pentru aplicarea industrială a sistemului imobilizat, dar și pentru elucidarea relațiilor structură N funcție și a mecanismelor de reacție.

Se consideră că modificările proprietăților enzimatică sunt cauzate, în cazul imobilizării, de doi factori. Unul este modificarea enzimei însăși iar al doilea proprietățile fizice și chimice ale suportului utilizat pentru imobilizare. Primul implică modificarea resturilor de aminoacizi din centrul activ al enzimei, modificările conformaționale ale enzimei-proteină și ionizării acesteia. Al doilea implică formarea unor straturi de difuziune în jurul enzimei imobilizate, efecte de împiedicare sterică și interacțiuni electrostatice între suport și substrat. Ceea ce se observă în modificarea proprietăților enzimei este un rezultat al interacțiunilor complicate dintre acești factori [254].

Determinarea lui K_m (care reflectă afinitatea dintre enzimă și substrat) este importantă și imobilizarea poate duce la creșterea sau descreșterea valorii K_m . O descreștere a valorii K_m duce la o viteză de reacție mai rapidă comparativ cu enzima liberă. Invers, o creștere a valorii K_m după imobilizare implică utilizarea unei concentrații de substrat mai mari pentru a atinge aceeași viteză de reacție ca cea obținută cu enzima liberă. Acest lucru nu este întotdeauna posibil, unele substraturi având o solubilitate mai redusă.

K_m aparent al enzimei imobilizate va descrește dacă sarcinile de pe substrat și de pe suport sunt opuse. Când sunt prezente efecte de difuzie internă sau externă în timpul condițiilor de operare, valoarea K_m aparentă scade deoarece particulele de enzimă sunt înconjurată de un strat static (stratul Nernst) de solvent în care concentrația de substrat va fi mai mică decât în restul soluției. Acest efect poate fi redus prin scăderea particulelor de imobilizat enzimatic sau prin creșterea vitezei liniare a fluidului.

Efectele de difuzie internă sunt foarte importante când enzima este imobilizată într-o structură poroasă - de exemplu la legarea enzimei pe suportul poros sau prin entrapare.

Modificările conformaționale ale moleculei enzimatică și împiedicările sterice duc, de obicei, la creșterea valorii K_m , datorită scăderii afinității dintre enzimă și substrat. Aceste efecte sunt mai pronunțate la tehnicile de legare covalentă, în care enzima este modificată chimic.

Studiul realizat a urmărit determinarea valorilor K_m și V_{max} ale aminoacilazei I nativă (obținută din culturi de *A. oryzae*) și imobilizată prin legare ionică pe DEAE-Filtradex R-50, pentru două substraturi, N-acetil-D,L-metionina, respectiv N-acetil-D,L-fenilglicina.

Determinarea parametrilor cinetici s-a realizat prin studiul influenței concentrației substratului asupra vitezei inițiale de reacție.

S-a lucrat cu următoarele concentrații de substrat în mediul de reacție:

- 8,3 și 50 mM N-acetil-D,L-metionină, pentru acilaza nativă (0,75 U/ml);
- 25,0 și 75,0 mM N-acetil-D,L-metionină pentru acilaza imobilizată (0,87 U/ml);
- 3,33 și 16,67 mM N-acetil-D,L-fenilglicină pentru acilaza imobilizată (0,18 U/ml).

Reactivii utilizați sunt identici cu cei prezentați la Cap. 4 și 6.

Mod de lucru: S-a utilizat un reactor de 50 ml, prevăzut cu manta pentru termostatare și posibilitate de agitare magnetică. În acest reactor s-au introdus:

- 10 ml soluție N-acetil-D,L-aminoacid, de diferite concentrații, pH 7,5 (pentru enzima solubilă) sau 7,0 (pentru enzima imobilizată), cu 1,5 mM CoCl₂
- 10 ml tampon fosfat, 0,1 M, pH 7,5 (pentru enzima nativă) și 7,0 (pentru enzima imobilizată)
- 10 ml soluție apoasă aminoacilazică sau 10 ml aminoacilază imobilizată pe DEAE-Filtradex R-50, măsurați sub tampon fosfat. Determinarea activității enzimatică s-a realizat în condițiile standard, prezentate la Cap. 4.1, respectiv 6.1.

Amestecul s-a incubat la 37°C, cu agitare magnetică. S-au prelevat probe din două în două minute și s-a determinat concentrația L-aminoacidului eliberat prin reacția cu ninhidrină. Metoda s-a folosit pentru determinarea vitezei inițiale de reacție, v_i . Pentru aceasta s-a corelat liniar concentrația L-aminoacidului cu timpul de reacție, panta drepte reprezentând viteza inițială de hidroliză, exprimată în $\mu\text{moli L-aminoacid/min}$.

Rezultate obținute

Variațiile concentrațiilor de aminoacizi eliberați în timp, pentru cele trei cazuri, sunt prezentate în Tabelele 7.1, 7.2 și 7.3. Aceste variații sunt prezentate grafic în Figurile 7.1, 7.2 și 7.3. Din corelările liniare s-au determinat vitezele inițiale de reacție, v_i , care sunt prezentate în aceleași tabele.

Tabel 7.1. Hidroliza N-acetil-D,L-metioninei la diferite concentrații inițiale, la 37°C și pH 7,5, în prezența aminoacilazei native (0,75 U/ml)

Nr. det.	Conc. AcMet mM	Timp min.	Conc. L-Met $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$	v_i $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$	$1/[S]$ M^{-1}	$1/v_i$ $\text{min}\cdot\text{ml}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$
1	8,3	5	0,467	0,133	120	7,52
		10	0,916			
		15	1,115			
		20	1,383			
		30	1,600			
		40	1,882			
		50	2,200			
		60	2,250			
2	16,6	5	0,667	0,177	60	5,65
		10	1,082			
		15	1,516			
		20	1,715			
		30	2,283			
		40	2,584			
		50	2,681			
		60	2,916			
3	25,0	5	0,915	0,250	40	4,0
		10	1,483			
		15	1,767			
		20	2,065			
		30	2,616			
		40	2,883			
		50	3,217			
		60	3,382			

Tabel 7.1 continuare						
Nr. det.	Conc. AcMet mM	Timp min.	Conc. L-Met $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$	v_i $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$	$1/[S]$ M^{-1}	$1/v_i$ $\text{min}\cdot\text{ml}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$
4	33,0	5	1,050	0,253	30	3,95
		10	1,616			
		15	1,950			
		20	2,332			
		30	2,816			
		40	3,181			
		50	3,384			
		60	3,650			
5	50,0	5	1,000	0,258	20	3,87
		10	1,500			
		15	1,995			
		20	2,334			
		30	2,733			
		40	3,217			
		50	3,516			
		60	3,682			

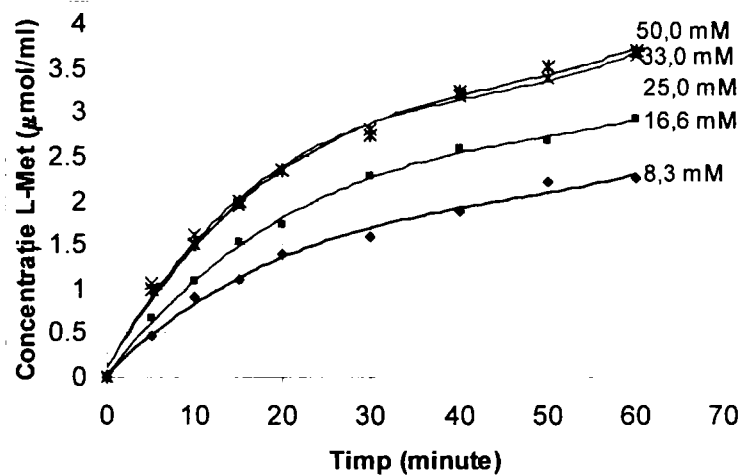


Figura 7.1 Graficul variației concentrației L-metioninei în timp, pentru diferite concentrații de N-acetil-D,L-metionină, la hidroliza catalizată de aminoacilaza nativă (0,75 U/ml), la 37°C

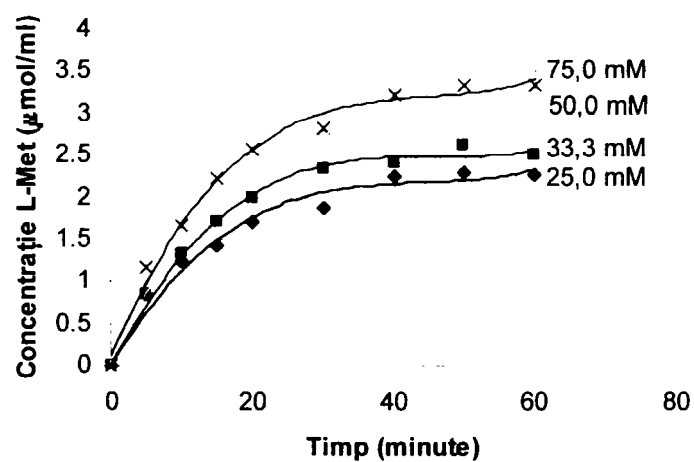


Figura 7.2 Graficul variației concentrației L-metioninei în timp, pentru diferite concentrații de N-acetil-D,L-metionină, la hidroliza catalizată de aminoacilaza imobilizată pe DEAE-Filtradex R-50, la 37°C

Tabel 7.2. Hidroliza N-acetil-D,L-metioninei la diferite concentrații inițiale, în prezența aminoacilazei immobilizate pe DEAE Filtradex R50 (0,87 U/ml), la 37°C și pH 7,0

Nr. Det.	Conc. AcMet mM	Timp min.	Conc. L-Met $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$	v_i $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$	$1/[S]$ M^{-1}	$1/v_i$ $\text{min}\cdot\text{ml}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$
1	25,0	5	0,850	0,215	40	4,65
		10	1,250			
		15	1,416			
		20	1,715			
		30	1,867			
		40	2,250			
		50	2,500			
		60	2,466			
2	33,3	5	0,667	0,262	30	3,82
		10	1,082			
		15	1,516			
		20	1,715			
		30	2,283			
		40	2,584			
		50	2,681			
		60	2,916			
3	50,0	5	1,000	0,290	20	3,45
		10	1,500			
		15	2,033			
		20	2,165			
		30	2,717			
		40	2,966			
		50	3,081			
		60	3,250			
4	75,0	5	1,164	0,344	13,3	2,90
		10	1,650			
		15	2,216			
		20	2,584			
		30	2,833			
		40	3,067			
		50	3,450			
		60	3,415			

Tabel 7.3. Hidroliza N-acetil-D,L-fenilglicinei la diferite concentrații inițiale, în prezența aminoacilazei imobilizate pe DEAE-Filtradex R50 (0,18 U/ml) la 37⁰C și pH 7,0

Nr. Det.	Conc. AcPheGly mM	Timp min.	Conc. L-PheGly $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$	v_i $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$	$1/[S]$ M^{-1}	$1/v_i$ $\text{min}\cdot\text{ml}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$
1	3,33	5	0,032	0,0088	300	113,51
		10	0,058			
		15	0,079			
		20	0,085			
		30	0,110			
		40	0,134			
		50	0,144			
		60	0,147			
2	5,00	5	0,039	0,011	200	90,50
		10	0,060			
		15	0,097			
		20	0,116			
		30	0,137			
		40	0,161			
		50	0,185			
		60	0,203			
3	8,33	5	0,069	0,016	120	61,60
		10	0,100			
		15	0,141			
		20	0,150			
		30	0,190			
		40	0,230			
		50	0,256			
		60	0,268			
4	16,67	5	0,085	0,023	60	42,57
		10	0,135			
		15	0,160			
		20	0,190			
		30	0,246			
		40	0,288			
		50	0,320			
		60	0,331			

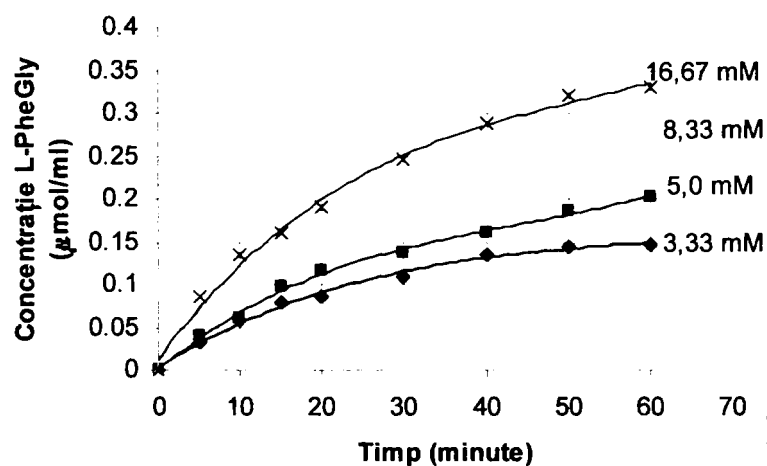


Figura 7.3. Graficul variației concentrației L-fenilglicinei în timp, pentru diferite concentrații de N-acetil-D,L-fenilglicină, la hidroliza catalizată de aminoacilaza imobilizată pe DEAE-Filtradex R-50

Datele obținute s-au utilizat pentru trasarea curbelor Michaelis-Menten pentru cele trei cazuri (variația vitezei inițiale funcție de concentrația substratului), care sunt prezentate în Figura 7.4.

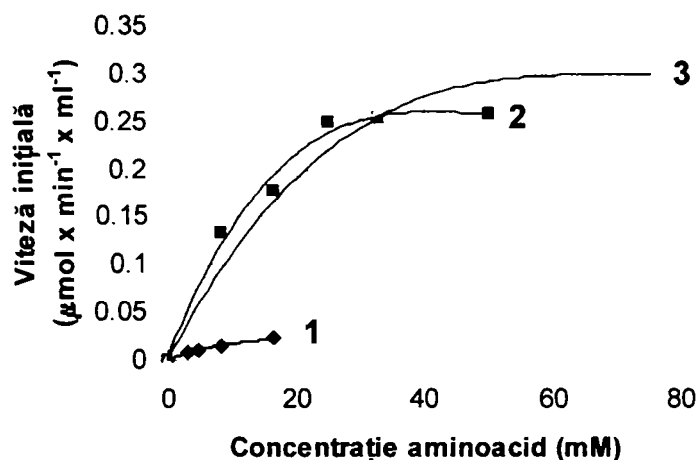


Figura 7.4. Graficele variației vitezei inițiale de reacție funcție de concentrația substratului: 1 - N-acetil-D,L-fenilglicină; acilază imobilizată
2 - N-acetil-D,L-metionină; acilază nativă
3 - N-acetil-D,L-metionină; acilază imobilizată

După cum se observă din grafice, pentru substratul N-acetil-D,L-metionină, atât în cazul enzimei native, cât și a celei imobilizate, reacția urmează o cinetică tipic Michaelis-Menten. Pentru sistemul N-acetil-D,L-fenilglicină / acilază imobilizată graficul nu poate fi interpretat.

Pentru determinarea parametrilor cinetici K_m și V_{max} s-a folosit liniarizarea Lineweaver-Burke. S-au calculat valorile $1/[S]$ și $1/v_i$ (Tabelele 7.1 – 7.3) și s-au reprezentat grafic $1/v_i$ funcție de $1/[S]$ (Figurile 7.5 și 7.6). Din intersecțiile cu axele s-au determinat valorile $1/V_{max}$ și $1/K_m$ și s-au calculat valorile corespunzătoare V_{max} și K_m .

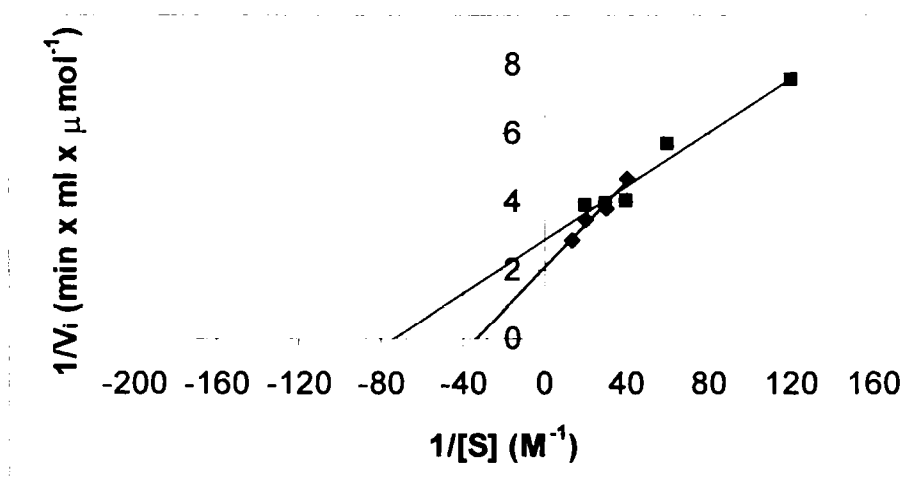


Figura 7.5. Liniarizarea Lineweaver- Burke pentru sistemele:
violet - N-acetil-D,L-metionină / acilază nativă
albastru - N-acetil-D,L-metionină / acilază imobilizată

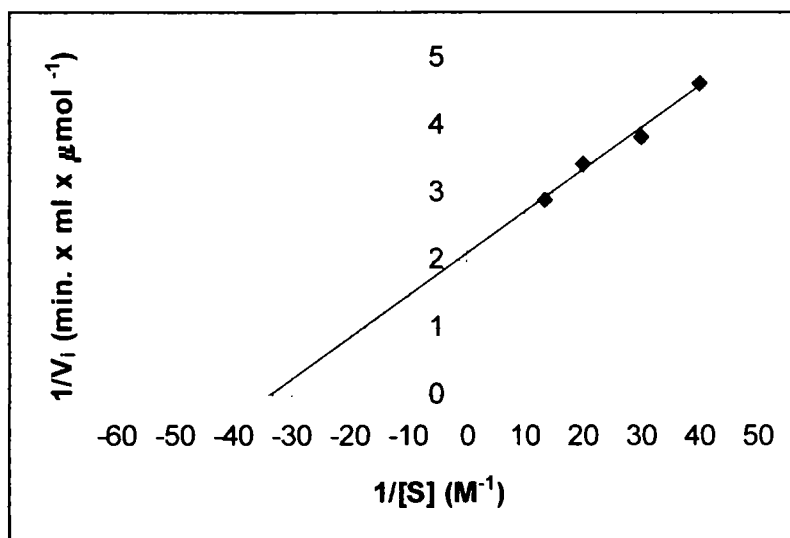


Figura 7.6. Liniarizarea Lineweaver- Burke pentru sistemul: N-acetil-D,L-fenilglicină / acilază immobilizată

Valorile K_m și V_{max} obținute pentru cele trei cazuri cercetate, ca și cele prezentate de Chibata și colab. [261] sunt prezentate în Tabelul 7.4.

Tabel 7.4. Valorile K_m și V_{max} ale aminoacilazei native și immobilizate

Substrat	Enzimă	K_m mM	V_{max} $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1}$
N-acetil-D,L-metionină	acilază nativă [261]	5,7	1,52
N-acetil-D,L-metionină	acilază imobil. [261]	8,7	3,33
N-acetil-D,L-metionină	acilază nativă	18	144
N-acetil-D,L-metionină	acilază immobilizată	31	28
N-acetil-D,L-fenilglicină	acilază immobilizată	14,3	2,7

Având în vedere că studiul realizat s-a efectuat în condiții foarte asemănătoare cu cele ale colectivului Chibata (substrat N-acetil-D,L-metionină, pH 7,5 pentru enzima nativă și 7,0 pentru cea immobilizată, temperatură 37°C), se poate face o comparație între datele obținute. Valoarea K_m pentru enzima nativă este de aproximativ trei ori mai mare pentru enzima studiată, comparativ cu cea japoneză, ambele produse de *A. oryzae*, dar tulpini diferite. Acest lucru relevă faptul că acilaza studiată are afinitate mai scăzută pentru N-acetil-D,L-metionină. Viteza maximă de reacție, în schimb, este mult mai mare (de aproximativ 95 de ori) ceea ce semnifică o putere catalitică mai mare.

În urma immobilizării prin legare ionică, atât pe DEAE-Filtradex R50, suportul românesc, cât și pe DEAE-Sephadex A50 (utilizat de japonezi), valorile K_m cresc nesemnificativ (de 1,5 – 1,7 ori), ceea ce denotă că immobilizarea acilazei prin legare ionică nu modifică decât în foarte mică măsură afinitatea enzimei pentru N-acetil-D,L-metionină. Apare însă o diferență mare în ceea ce privește V_{max} . Dacă immobilizatul japonez a prezentat o V_{max} puțin crescută față de cea a enzimei native, în cazul suportului românesc capacitatea catalitică a immobilizatului scade destul de mult (de 5 ori), semnaland, probabil, o modificare conformațională a enzimei în urma immobilizării.

Dacă se compară valorile K_m și V_{max} pentru cele două substraturi studiate, N-acetil-D,L-metionina și N-acetil-D,L-fenilglicina, afinitatea acilazei immobilizate este ceva mai ridicată față de N-acetil-D,L-fenilglicină, dar capacitatea catalitică este mai mare pentru N-

acetil-D,L-metionină (K_m mai mic, respectiv V_{max} mai scăzut). Diferența dintre fenilglicină și fenilalanină este de doar o grupare metilenică pe catena laterală, iar studiile cu aceeași enzimă din *A. oryzae* au prezentat pentru fenilalanină o afinitate mai mare chiar decât pentru metionină [226] (Tabel 1.9); acest fapt sugerează că este necesară o catenă hidrocarbonată mai lungă pentru o fixare adecvată la centrul activ al enzimei și o mai rapidă transformare. Datele de literatură prezintă o creștere a afinității pentru substrat o dată cu creșterea catenei laterale hidrocarbonate (Cap. 1.5.2).

Totuși, afinitatea și capacitatea catalitică nu sunt foarte diferite, comparativ cu cele pentru metionină, iar exploatarea imobilizatului pentru separarea racemicului de D,L-fenilglicină a dovedit acest lucru (Cap.8.1).

7.2. Influența concentrației de enzimă asupra vitezei inițiale de reacție

Studiul s-a efectuat folosind aminoacilaza solubilă (nativă) obținută în laborator din culturile de *Aspergillus oryzae*, având o activitate specifică de 0,74 U/mg proteină. Determinările au fost efectuate folosind drept substrat N-acetil-D,L-metionina, a cărei concentrație inițială în mediul de reacție a fost de 0,033 M.

Reactivii utilizați au fost cei prezentați în studiile anterioare, și anume soluție de N-acetil-D,L-metionină 0,1 M, cu 1,5 mM $CoCl_2$, adusă la pH 7,5; tampon fosfat 0,1 M, pH 7,5 și soluția apoasă de aminoacilază la care s-a variat concentrația prin diluare cu apă distilată între 0,1 - 0,8 g proteină per litru.

Modul de lucru. S-a determinat viteza inițială de reacție pentru fiecare concentrație de enzimă conform modului de lucru prezentat la Capitolul 7.1.

Rezultate obținute

Concentrațiile, respectiv activitățile enzimice corespunzătoare și vitezele de reacție obținute în urma studiului efectuat sunt prezentate în Tabelul 7.5.

Tabel 7.5. Hidroliza N-acetil-D,L-metioninei la 37°C, pH 7,5 și diferite concentrații de enzimă

Nr. crt.	Conc. enzimă g proteină·l ⁻¹	Activitate enzimă U·l ⁻¹	$v_i \times 10^3$ mol·l ⁻¹ ·min ⁻¹
1	0,1	0,074	0,069
2	0,2	0,148	0,121
3	0,4	0,396	0,253
4	0,6	0,444	0,338
5	0,8	0,592	0,485

Reprezentarea grafică a variației vitezei inițiale de reacție, funcție de activitatea aminoacilazică este prezentată în Figura 7.7

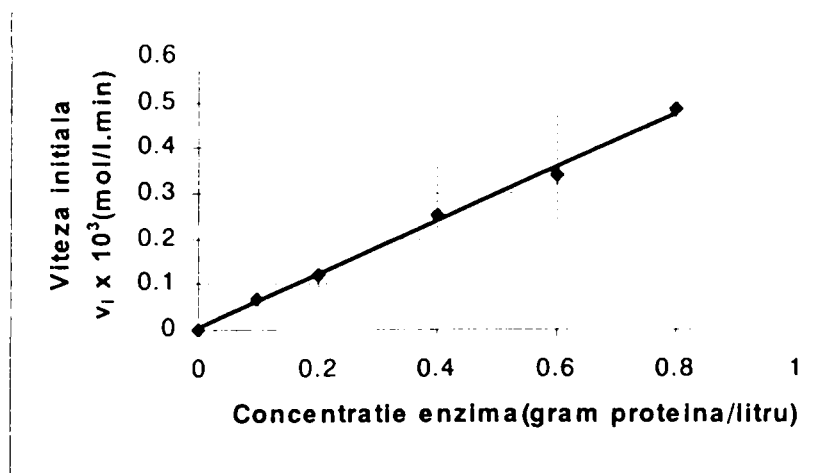


Figura 7.7. Graficul variației vitezei inițiale de reacție funcție de activitatea aminoacilazică

După cum se observă, în limitele studiate, viteza inițială a reacției de hidroliză crește liniar cu cantitatea de enzimă prezentă în mediul de reacție. Rezultă că, pentru studiile ulterioare, pentru a avea rezultate veridice, trebuie luate în lucru concentrații identice de enzimă raportate la concentrația inițială de substrat; dacă se variază acest raport este necesară corectarea rezultatelor, ținând cont de influența concentrației de enzimă, conform Figurii 7.7.

7.3. Influența pH-ului asupra activității aminoacilazei

Activitatea enzimatică este marcată în mod deosebit de condițiile de mediu, în special de pH în mediile apoase. Modificarea concentrației de protoni duce la modificarea ionizării grupărilor funcționale de pe catenele laterale ale aminoacizilor, consecința fiind formarea de noi tipuri de legături între aceste resturi și ca atare, modificarea, mai mult sau mai puțin pronunțată, a conformației proteinei. Acest lucru este însoțit și de modificarea activității biologice a proteinei respective, în cazul enzimelor a activității catalitice. Și anumite substraturi, care prezintă grupări funcționale ionizabile, sunt influențate de pH-ul mediului de reacție. Doar o anumită stare de ionizare va fi favorabilă legării la centrul activ al enzimei și transformării substratului. Ca atare, fiecare enzimă va prezenta un pH anumit, pH-ul optim, sau un interval de pH, la care activitatea este maximă.

În cazul imobilizării enzimelor s-au observat atât modificarea cât și nemodificarea pH-ului optim. Modificarea curbei de dependență pH-activitate ca și a pH-ului optim depinde de încărcarea electrică a moleculei enzimă și/sau de a suportului folosit pentru imobilizare. La metodele de imobilizare tip legare de suport, când matricea este încărcată electric, comportarea cinetică a enzimei imobilizate poate diferi de cea a enzimei libere, chiar și în absența efectelor de transfer de masă. Această diferență este atribuită efectelor de partiție care cauzează apariția de concentrații diferite ale speciilor încărcate electric (exemplu substraturi, produși, ioni de hidrogen, ioni hidroxil, etc.) în apropierea enzimei imobilizate față de restul soluției datorită interacțiunilor electrostatice cu sarcinile fixe de pe suport. Una dintre cele mai importante consecințe ale acestei partiții este modificarea pH-ului optim, cu o deplasare a lui pentru enzima imobilizată spre un domeniu mai alcalin sau mai acid pentru suporturile încărcate negativ sau, respectiv pozitiv [254]; dar poate să apară, în același timp și modificarea pH-ului optim și a profilului dependenței activității de pH.

Studiile efectuate s-au realizat atât pentru enzima solubilă, având ca substrat N-acetil-D,L-metionina, cât și pentru aminoacilaza imobilizată pe DEAE-Filtradex R 50, cu substraturi N-acetil-D,L-metionină și N-acetil-D,L-fenilglicină.

Reactivii utilizați, alții decât cei prezentați la experimentele anterioare, au fost acidul dietilbarbituric și dietilbarbituratul de sodiu, ambii fiind reactivi p.a. de la Sigma.

Modul de lucru a fost cel prezentat la Cap. 4.1 pentru enzima solubilă, cu excepția faptului că amestecul de reacție a constat în 1 ml soluție N-acetil-D,L-aminoacid 0,1 M, adusă la pH-ul dorit, 1 ml soluție enzimatică apoasă și 6 ml tampon de diferite pH-uri. Amestecul a fost incubat 30 minute la 37°C apoi s-a luat cotă parte pentru determinarea aminoacidului cu ninhidrină. Pentru enzima imobilizată s-a folosit metoda prezentată la Capitolul 6.1, cu excepția pH-ului soluțiilor. S-a lucrat cu următoarele tamponane:

- pe domeniul de pH 4,6 -5,2 - tampon acetat 0,1 M.
- pe domeniul de pH 5,8 - 8,0 - tampon fosfat 0,1 M
- pe domeniul de pH 8,5 - 9,0 - tampon barbiturat 0,1 M.

Rezultate obținute

Datele obținute pentru cele trei tipuri de determinări sunt prezentate în Tabelul 7.6.

Tabel 7.6. Dependența de pH a activității aminoacilazei solubile și imobilizate

pH	Acy solubilă* U/ml	Acy imobil. (AcMet)** U/ml	Acy imobil. (AcPheGly)*** U/ml
4,6	0	0,050	-
5,2	0,123	0,143	0,456
5,8	0,143	0,260	0,480
6,1	0,273	0,315	0,489
6,4	0,306	0,420	0,500
6,7	0,600	0,735	0,514
7,2	0,606	0,806	0,532
7,4	0,655	0,785	0,521
8,0	0,460	0,630	0,442
8,5	0,105	0,337	0,428
9,0	0,030	0,103	0,396

*Substratul folosit a fost N-acetil-D,L-metionina, 0,1 M cu 1,5 mM CoCl₂

**Substratul folosit a fost N-acetil-D,L-metionina, 0,1 M cu 1,5 mM CoCl₂

***Substratul folosit a fost N-acetil-D,L-fenilglicina, 0,1 M cu 1,5 mM CoCl₂

Reprezentarea grafică a dependenței activității aminoacilazice de pH este dată în Figura 7.8.

Valorile obținute prezintă pentru aminoacilaza solubilă un pH optim la valoarea 7,4 iar pentru cea imobilizată prin legare ionică pe DEAE-Filtradex R 50 la un pH ușor mai scăzut, adică 7,2 pentru ambele substraturi utilizate. Datele obținute confirmă rezultatele obținute de către alți cercetători (prezentate în Cap1.6.1) pentru diferitele aminoacilaze din fungi, atât pentru enzima liberă cât și pentru cea imobilizată. De asemenea, legarea ionică pe un cationit (deci încărcat pozitiv) a dus la deplasarea pH-ului optim spre valori mai acide. Deși catena laterală a celor doi aminoacizi utilizați ca substraturi este foarte diferită dar cu o hidrofilicitate asemănătoare, enzima imobilizată se pare că nu face diferență între ei în ceea ce privește pH-ul optim de acțiune. Totuși, în cazul fenilglicinei, activitatea enzimei imobilizate diferă foarte puțin în domeniul testat (pH 4,5 N 9). Pentru substratul acetilmetionină, enzima imobilizată

prezintă un domeniu de pH mult mai îngust (6,7 – 7,4), ceea ce denotă că fenilglicina, cel puțin în cazul acestui imobilizat, stabilizează enzima față de pH.

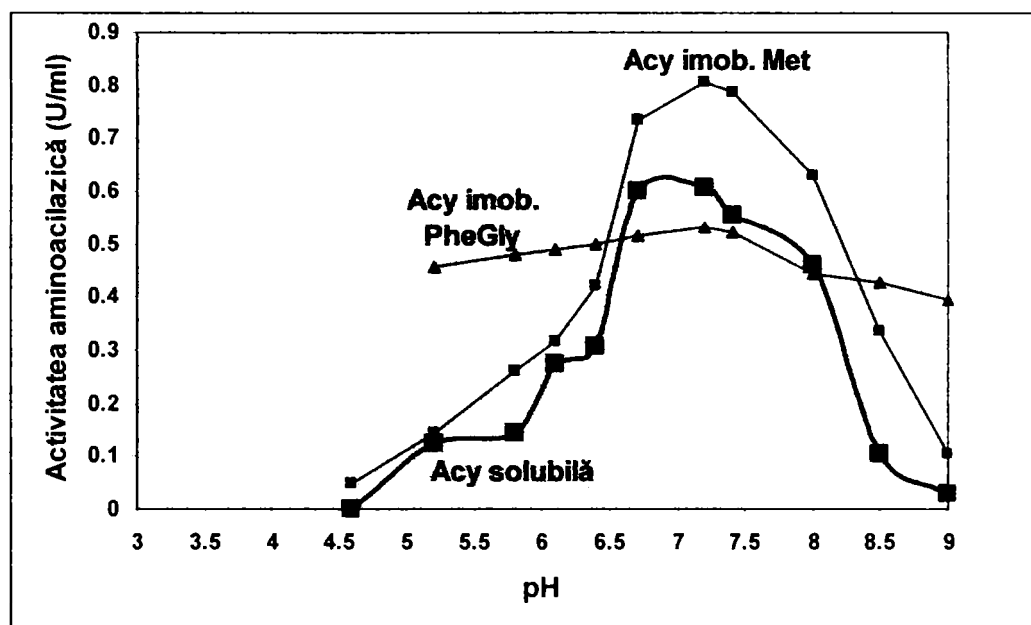


Figura 7.8. Influența pH-ului asupra activității aminoacilazei solubile și imobilizate

S-a testat și influența pH-ului direct asupra aminoacilazei, adică a soluției enzimatică tamponată la diferite pH-uri, timp de 10 minute, înainte de determinarea activității. Pentru aceasta 1ml soluție enzimatică s-a diluat cu tamponare 0,1M de pH-uri diferite. După 10 minute la temperatura camerei, din aceste soluții enzimatică s-a luat câte 1ml pentru testarea activității, conform metodei prezentate la Cap. 4.1. S-a determinat activitatea aminoacilazei solubile și în condițiile standard, adică fără menținerea în prealabil la pH-ul respectiv. Datele obținute sunt prezentate în Tabelul 7.7.

Tabelul 7.7. Influența tamponării aminoacilazei înainte de determinarea activității

Nr. crt.	pH tampon	Activitate U/ml	% de regăsire a activ. enzimatică
1	5	0,488	60,2
2	5,6	0,502	62,0
3	6	0,515	63,6
4	7	0,784	96,8
5	7,5	0,803	99,1
6*	7,5	0,810	100

* Pentru aminoacilază în condiții standard

Se observă clar din datele obținute că și în acest caz pH-ul optim de acțiune al aminoacilazei din *A.oryzae* este tot 7,4 - 7,5, scăderea de pH la valoarea 5 ducând la o pierdere de activitate de 40%.

7.4. Influența temperaturii asupra activității aminoacilazei

Creșterea temperaturii favorizează reacțiile chimice prin creșterea vitezei de reacție. În cazul reacțiilor enzimatiche, acestea au loc la temperatura caracteristică dezvoltării organismului respectiv. În majoritatea cazurilor această temperatură este cea apropiată de a mediului ambiant. Creșterea temperaturii peste o anumită valoare determină inactivarea enzimei prin denaturarea proteinei. Fiecare enzimă va avea, deci, o temperatură optimă de lucru, la care activitatea este maximă. Această temperatură optimă poate fi chiar mai ridicată decât temperatura la care trăiește organismul, dar, în cele mai multe cazuri, menținerea pentru o perioadă de timp mai lungă la această temperatură duce la scăderea activității datorită denaturării proteinei-enzimă.

După imobilizarea enzimei poate avea loc, în unele cazuri, o modificare a temperaturii optime. Aceasta este, în cazul imobilizării prin entrapare în geluri și în unele cazuri și prin legare ionică sau covalentă, mai mare decât cea a enzimei native. Acest lucru se poate datora efectelor de difuziune în cazul entrapării sau imobilizării pe suporturi poroase, care protejează enzima față de denaturare. Temperatura efectivă în apropierea enzimei este mai mică decât cea a soluției. Această toleranță la căldură poate să apară și la imobilizarea prin legături ionice sau covalente. În acest caz, un rol important în creșterea toleranței la denaturarea prin încălzire pot să joace modificările conformaționale ale enzimei datorate legării la suport sau împiedicării sterice. S-a observat, în unele cazuri, scăderea temperaturii optime în urma imobilizării.

Cercetările efectuate au urmărit efectul temperaturii atât asupra activității enzimei native, solubile, cu substrat N-acetil-D,L-metionină, cât și asupra aminoacilazei imobilizate pe DEAE-Filtradex R50, cu substrat N-acetil-D,L-metionină, respectiv N-acetil-D,L-fenilglicină.

Modul de lucru: Pentru determinarea activității aminoacilazice s-au folosit metodele prezentate la Capitolul 4.1 pentru enzima solubilă și respectiv Capitolul 6.1 pentru enzima imobilizată. S-a variat temperatura de incubare între 20°C și 80°C.

Rezultate obținute

Activitățile aminoacilazice obținute în urma varierii temperaturii de incubare sunt prezentate în Tabelul 7.8.

Tabel 7.8. Influența temperaturii asupra activității aminoacilazei native și imobilizate

Temperatură °C	Activitate Acy solubilă (AcMet) U/ml	Activitate Acy imobil. (AcMet) U/ml	Activitate Acy imobil. (AcPheGly) U/ml
20	0,148	0,241	-
30	0,292	0,441	0,418
37	0,416	0,489	0,459
50	0,626	1,095	0,594
60	1,250	1,369	0,667
70	1,168	1,266	0,652
80	0,125	0,503	0,482

Reprezentarea grafică a datelor obținute este dată în Figura 7.9.

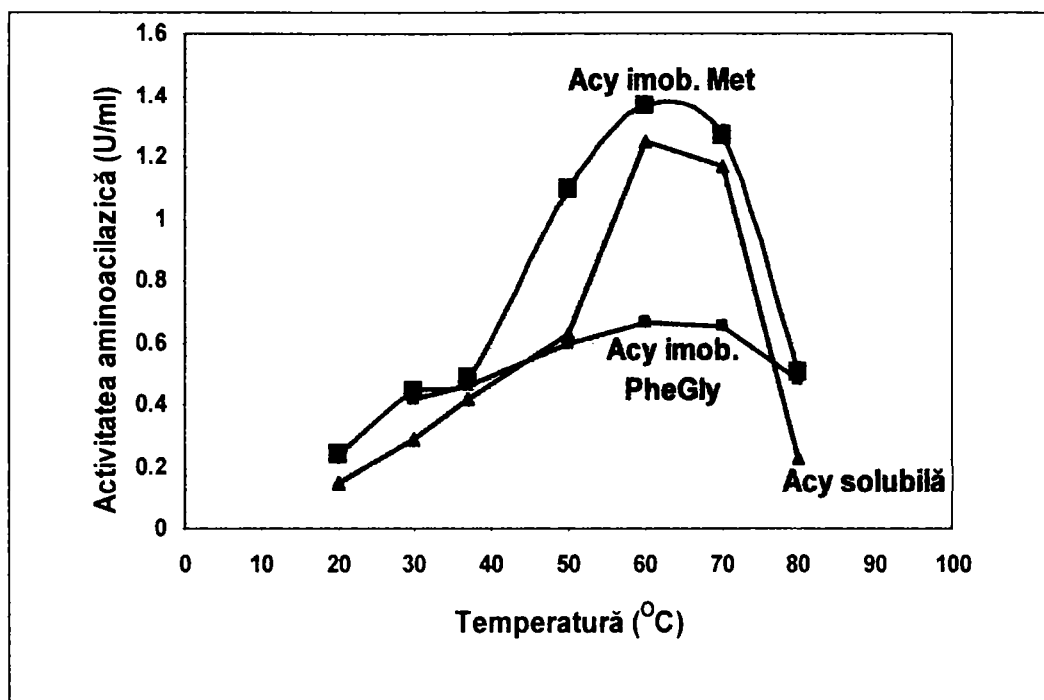


Figura 7.9. Influența temperaturii asupra activității aminoacilazei native (pH 7,5) și imobilizate (pH 7,0) pentru două substraturi, N-acetil-D,L-metionină și N-acetil-D,L-fenilglicină, 0,1 M

Se observă că enzima nativă începe să fie denaturată la temperaturi peste 60°C ceea ce dovedește o bună rezistență la temperatură a aminoacilazei din tulpina de *A. oryzae* studiată. Enzimele de natură animală sunt denaturate, în general, la temperaturi peste 40°C, deci această enzimă fungică, având temperatura optimă mai ridicată, va duce la viteze mai mari de reacție, deoarece poate fi utilizată la temperatură mai ridicată. Imobilizarea aminoacilazei prin legare ionică nu a dus la ameliorarea temperaturii optime de acțiune, fapt valabil în cazul ambelor substraturi folosite.

Pentru enzima nativă, creșterea temperaturii de la 37°C la 60°C duce la o creștere a activității de 3 ori. Pentru enzima imobilizată creșterea este ceva mai mică, de 2,8 ori în cazul substratului N-acetil-D,L-metionină și de numai 1,45 ori în cazul N-acetil-D,L-fenilglicinei. Nu s-a realizat și un studiu separat al rezistenței enzimei la temperatură în timp, dar utilizarea aminoacilazei imobilizate prin procedeul în coloană, la temperatură de 50°C, studiu prezentat la Cap. 8, a dus la rezultate foarte bune.

7.5. Influența ionilor metalici asupra activității aminoacilazei

Se știe din datele de literatură că aminoacilaza este o zinc enzimă, dar prezența ionului Co^{2+} duce la mărirea activității enzimatice. De asemenea prezența altor ioni poate influența pozitiv sau negativ activitatea.

Studiul realizat a urmărit influența a 10 ioni metalici și a EDTA asupra aminoacilazei obținută în laborator din culturile de *A. oryzae* (enzima nativă), cât și asupra enzimei imobilizate pe DEAE Filtradex R50. Substratul folosit a fost N-acetil-D,L-fenilglicina.

Reactivii utilizați, în afară de cei folosiți la studiile anterioare, au fost clorurile metalelor respective și EDTA, toate substanțele fiind p.a. și furnizate de Chimopar, respectiv Reanal.

Modul de lucru: S-au preparat soluții tampon fosfat 0,1 M, pH 7,0 cu 10^{-3} M concentrație în diferiți ioni metalici, respectiv EDTA și soluția de N-acetil-D,L-fenilglicină, 0,1 M și pH 7,0.

Pentru determinarea activității s-au folosit metodele prezentate la Capitolele 4.1, respectiv 6.1. S-a determinat, pentru comparare, activitatea aminoacilazei și în cazul unui tampon ce nu a conținut nici un ion metalic, în afară de cel de sodiu, adus de sărurile fosfat, respectiv de NaOH utilizat pentru aducerea la pH a soluției de substrat.

Rezultate obținute

Datele obținute în urma experimentelor făcute, prezentate în Tabelul 7.9, confirmă și în cazul acestei aminoacilaze fungice faptul că ionul de cobalt este un activator al aminoacilazei. S-a calculat și activitatea relativă, luând ca 100% activitatea în cazul neutilizării a nici unui ion metalic (în afara Na^+).

Tabel 7.9. Influența ionilor metalici asupra activității aminoacilazei, la 37°C și pH 7,0

Ion	Activitate Acy nativă U/ml	Activitate Acy imobil. U/ml	Act. relativă Acy nativă %	Act. relativă Acy imobil. %
-	0,877	0,458	100	100
Fe^{2+}	0,633	0,370	72,2	80,7
Fe^{3+}	0,521	0,405	59,4	88,4
Cd^{2+}	0,464	0,295	52,9	64,4
Ni^{2+}	0,450	0,361	51,3	78,8
Cu^{2+}	0,211	0,371	24,1	81,0
Zn^{2+}	0,951	0,426	108,4	93,0
Co^{2+}	1,343	0,528	153,1	115,8
Mg^{2+}	1,290	0,340	147,1	74,2
Mn^{2+}	0,894	0,348	115,7	76,0
Sn^{2+}	0,534	0,312	60,9	68,1
EDTA	0,299	0,346	27,3	75,5

Ioni inhibitori pentru enzima nativă sunt: Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} . În prezența EDTA activitatea enzimatică scade drastic (sub 28%), ceea ce confirmă faptul că ionul Zn^{2+} , chiar dacă nu este situat în centrul activ al enzimei, joacă un rol important în menținerea conformației enzimei într-o formă activă.

Ionii metalici cu acțiune favorabilă activității aminoacilazei native sunt: Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} și în mai mică măsură Zn^{2+} . Ionul Co^{2+} prezintă o activare a aminoacilazei cu peste 50%, substanțial mai mare decât ceilalți ioni. De aceea se recomandă folosirea ionului Co^{2+} la reacția de hidroliză enzimatică a N-acetil-aminoacizilor.

În cazul enzimei imobilizate, având ca substrat N-acetil-D,L-fenilglicina, singurul ion activator este Co^{2+} . În schimb ceilalți ioni inhibă enzima imobilizată, dar într-o măsură mult mai mică decât în cazul celei native. Având în vedere că suportul folosit pentru imobilizare a fost un cationit, se poate presupune că sarcinile pozitive ale acestuia nu au permis concentrarea ionilor pozitivi metalici în imediata vecinătate a enzimei, ca în cazul celei native. EDTA are o acțiune inhibitoare de aproape 2,8 ori mai mică la enzima imobilizată, comparativ cu cea nativă, ceea ce marchează o stabilizare a enzimei, în urma imobilizării, față de anumiți ioni

7.6. Influența concentrației ionului Co^{2+} asupra activității aminoacilazei

Având în vedere rezultatele obținute anterior, s-a studiat influența concentrației de Co^{2+} asupra activității aminoacilazice pentru a determina concentrația optimă de activare. S-a studiat din nou comportamentul aminoacilazei native cât și a celei imobilizate pe DEAE Filtradex R50. Substratele folosite au fost N-acetil-D,L-metionina pentru enzima nativă și N-acetil-D,L-metionina, respectiv N-acetil-D,L-fenilglicina pentru enzima imobilizată.

Reactivii utilizați au fost cei prezentați în studiile anterioare.

Modul de lucru: S-au preparat o serie de tampoane fosfat 0,1 M, pH 7,0, cu concentrații variabile de CoCl_2 , între 0, luat ca martor, și 10^{-2} M. Pentru determinarea activității s-au folosit metodele prezentate la Capitolele 4.1, respectiv 6.1.

Rezultate obținute

Activitățile aminoacilazice obținute în acest studiu sunt prezentate în Tabelul 7.10.

Tabel 7.10. Influența concentrației ionului Co^{2+} asupra activității aminoacilazei native și imobilizate, la 37°C și pH 7,0

Conc. Co^{2+} mM	$\frac{1}{-\log[\text{Co}^{2+}, \text{M}]}$	Activ. Acy nativă (AcMet) U/ml	Activ. Acy imob. (AcMet) U/ml	Activ. Acy imob. (AcPheGly) U/ml
0	-	0,331	0,391	0,326
10^{-6}	0,16	0,332	0,403	0,341
10^{-5}	0,2	0,354	0,428	0,378
10^{-4}	0,25	0,382	0,440	0,408
10^{-3}	0,33	0,580	0,484	0,545
10^{-2}	0,5	0,358	0,555	0,406

Reprezentarea grafică a datelor din tabelul anterior este dată în Figura 7.10.

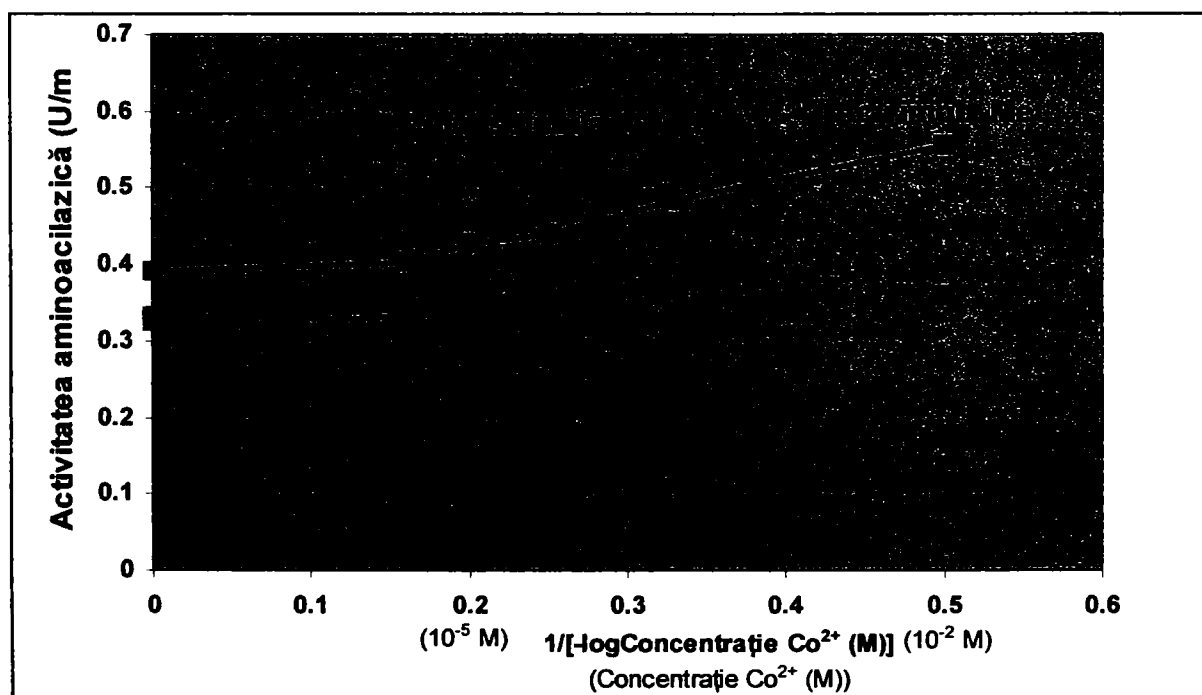


Fig. 7.10. Influența concentrației Co^{2+} asupra activității acilazice

Se observă că pentru enzima solubilă concentrația optimă este de 10^{-3} M CoCl_2 . Din acest motiv studiile asupra activității aminoacilazei s-au realizat în prezența $1,5 \times 10^{-3}$ M CoCl_2 .

Pentru enzima imobilizată pe DEAE Filtradex R50 și cu substrat N-acetil-D,L-fenilglicină, concentrația optimă de Co^{2+} este tot de 10^{-3} M. În schimb, dacă se utilizează drept substrat N-acetil-D,L-metionina, enzima imobilizată, pe domeniul cercetat, prezintă o creștere continuă a activității. Studiul a fost reluat și la exploatarea enzimei imobilizate pentru separarea racemicurilor de metionină și fenilglicină prin procedeul în coloană (Cap. 8). Dar, având în vedere că se dorește obținerea unor aminoacizi nu numai optic dar și chimic puri, înlăturarea cobaltului devine absolut necesară din produsul final, ceea ce ar necesita proceduri de purificare suplimentare. De aceea se preferă utilizarea unor concentrații mai mici de CoCl_2 .

7.7. Concluzii

Studiile efectuate privind proprietățile aminoacilazei din *Aspergillus oryzae*, nativă și imobilizată pe DEAE-Filtradex R50, permit următoarele concluzii:

1. Cinetica reacției de hidroliză a N-acetil-D,L-metioninei și a N-acetil-D,L-fenilglicinei, catalizată de aminoacilaza I, atât în cazul enzimei native cât și imobilizate, este de tip Michaelis - Menten.
2. Afinitatea enzimei pentru cele două substraturi, exprimată prin constanta Michaelis (K_m) este foarte apropiată, și ceva mai scăzută decât cea a enzimei obținută de Chibata [261] tot din *A. oryzae*. Imobilizarea prin legare ionică duce la scăderea valorilor K_m , în cazul N-acetil-D,L-fenilglicinei (deci crește afinitatea pentru acest substrat), dar pentru N-acetil-D,L-metionină afinitatea scade. Capacitatea catalitică (V_{max}) scade la imobilizat pentru ambele substraturi.
3. Viteza reacției de hidroliză este direct proporțională cu concentrația enzimei în sistem.
4. Domeniul pH-ului optim de acțiune a aminoacilazei native este de 7,0-7,5; pentru enzima imobilizată, pH-ul optim scade cu aproximativ 0,5 unități. Comparând valorile optime de pH pentru cele două substraturi, N-acetil-D,L-fenilglicina duce la o stabilizare a enzimei imobilizate la pH-uri mai acide, activitatea variind foarte puțin în intervalul 5,5 -7,5.
5. Temperatura optimă de acțiune a aminoacilazei native este de 50-55°C; imobilizarea duce la o creștere a temperaturii optime cu 5 N 10^0 C, deci o stabilizare ușoară a enzimei.
6. Ionii metalici care activează aminoacilaza nativă sunt, în ordine descrescătoare: Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} . Au acțiune inhibitoare ionii Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Sn^{2+} și EDTA. Inhibiția EDTA-ului confirmă faptul că ionul de zinc este implicat în activitatea enzimatică. Pentru enzima imobilizată, singurul ion activator este Co^{2+} . În schimb, ionii inhibitori pentru enzima nativă au o acțiune mai scăzută asupra aminoacilazei imobilizate, incluzând și EDTA.
7. Ionul Co^{2+} are acțiune activatoare maximă la o concentrație de 10^{-3} M pentru enzima solubilă, ca și pentru cea imobilizată în cazul N-acetil-D,L-fenilglicinei. Pentru N-acetil-D,L-metionină, în domeniul 10^{-6} N 10^{-2} M, activitatea enzimei imobilizate crește continuu.

8. Obținerea D-fenilglicinei și L-metioninei

8.1 Obținerea D-fenilglicinei prin hidroliza enzimatică a N-acetil-D,L-fenilglicinei

8.1.1. Generalități privind obținerea D-fenilglicinei [30,355]

După descoperirea lui Alexander Fleming în 1928 că tulpina de *Penicillium notatum* prezenta activitate antibacteriană, a trecut mai mult de o decadă până când Florey și Chain au izolat penicilina G în 1940. Acest fapt a fost urmat rapid de caracterizarea și aplicarea medicală a penicilinei G. Din păcate un număr tot mai mare de tulpini microbiene au devenit rezistente la penicilină G, care a fost astfel scoasă din uzul medical la sfârșitul anilor 1960. Din fericire, acilarea nucleului penicilinei G, acidul 6-aminopenicilanic (6-APA) cu diferite catene laterale poate duce la noi peniciline semisintetice. Cele mai importante dintre acestea sunt ampicilina și amoxicilina în care catena laterală este D-fenilglicina, respectiv D-p-hidroxifenilglicina. Pe lângă acestea, cefalosporinele semisintetice corespunzătoare, (cefalexina și cefadroxilul) derivate de la nucleul acidului 7-aminodeacetocefalosporanic (7-ADCA), au fost introduse în practica medicală (Figura 8.1).

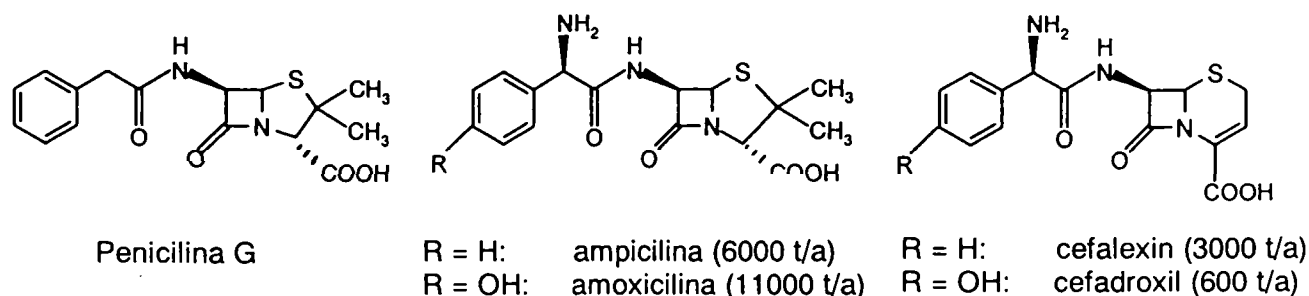


Figura 8.1. Patru dintre cele mai importante peniciline și cefalosporine semi-sintetice și compusul lor de bază

Până în anii 1985 aceste peniciline și cefalosporine semisintetice, ca și antibioticele β -lactamice înrudite, au fost obținute prin procedee chimice, cu excepția materiei prime, penicilina G, care a fost obținută prin fermentație (*Penicillium chrysogenum*). Ulterior restul de fenilacetil al penicilinei G a fost îndepărtat și 6-APA rezultată a fost protejată și condensată cu restul dorit, protejat și activat. Intermediarul pentru semisinteza cefalosporinelor, 7-ADCA, a fost obținut din penicilina G prin expansiunea chimică a ciclului. Chiar și astăzi, după mai bine de 15 ani, aceste procese chimice convenționale încă domină producerea de antibiotice β -lactamice la scară industrială, deși sinteza chimică implică formarea unei cantități mari de produși secundari. De exemplu, sinteza cefalexinei, cea mai vândută cefalosporină pe piața antibioticelor (3000 tone/an), generează 30 N 40 kg materiale secundare per kg de produs finit [30].

A devenit astfel clar ca sunt necesare noi proceduri, mai eficiente, pentru obținerea de antibiotice β -lactamice, care să reducă materialele secundare și care să evite, atunci când este posibil, utilizarea unor reactivi periculoși sau a solvenților organici. Acest lucru a început să se realizeze prin îmbinarea sintezelor chimice cu cele enzimatiche.

Deoarece subiectul studiului realizat se referă la obținerea izomerilor optic puri ai aminoacizilor, în acest caz D-fenilglicina, se va trata doar această parte din întregul proces de obținere a antibioticelor semisintetice, derivate cu fenilglicină.

Océ-Andeno (acum DSM Fine Chemicals) a realizat în anii 1970 un proces pentru obținerea D-fenilglicinei prin cristalizarea sării diastereoizomerice a racematului său. Acesta din urmă se poate obține din benzaldehidă prin reacție Strecker, urmată de hidroliza nitrilului. Ca agent de separare optică se utilizează acid (+)camfor-8-sulfonic optic pur, în mediu apos. L-fenilglicina este racemizată într-un proces separat și reutilizată [30,356].

T. Shiraiwa și colab. [357,366,367] separă racemicul de N-acetil-D,L-fenilglicină prin precipitare selectivă a izomerului R sub formă de sare cu 1-metilbenzilamina, cu randamente de 92 N 96% și puritate optică de 92 %. Egusa [40] realizează o precipitare selectivă cu L-efedrină.

La nivel de laborator, Righetti [371] propune un reactor cu membrană, cu o tehnică specială de a menține enzima, în acest caz penicilin G acilaza, în spațiul intramembranar și anume prin crearea unui câmp electric cu un pH identic cu pH-ul izoelectric al enzimei. Aceasta este menținută astfel într-o formă insolubilă, reactanții și produșii deplasându-se sub influența câmpului electric. A reușit să obțină D-fenilglicină pură dintr-un amestec racemic, prin intermediul unei reacții de acilare la un cosubstrat (esterul metil-4-hidroxifenil acetat), catalizată de penicilin G acilază.

Kanegafuchi (astăzi Kaneka Corporation) (Figura 8.2) a realizat o procedură mult mai elegantă, luând ca exemplu obținerea D-p-hidroxifenilglicinei. Acest proces implică hidroliza enantioselectivă a 5-fenilhidantoiniei în cataliza enzimatică a D-hidantoinazei. 5-Fenilhidantoina se prepară din benzaldehidă, HCN și uree. 5-L-fenilhidantoina se racemizează în mediu alcalin blând. Se obține în final N-carbamoil-D-fenilglicină cu randament 100%. Gruparea N-carbamoil se îndepărtează prin tratare cu acid azotos [30].

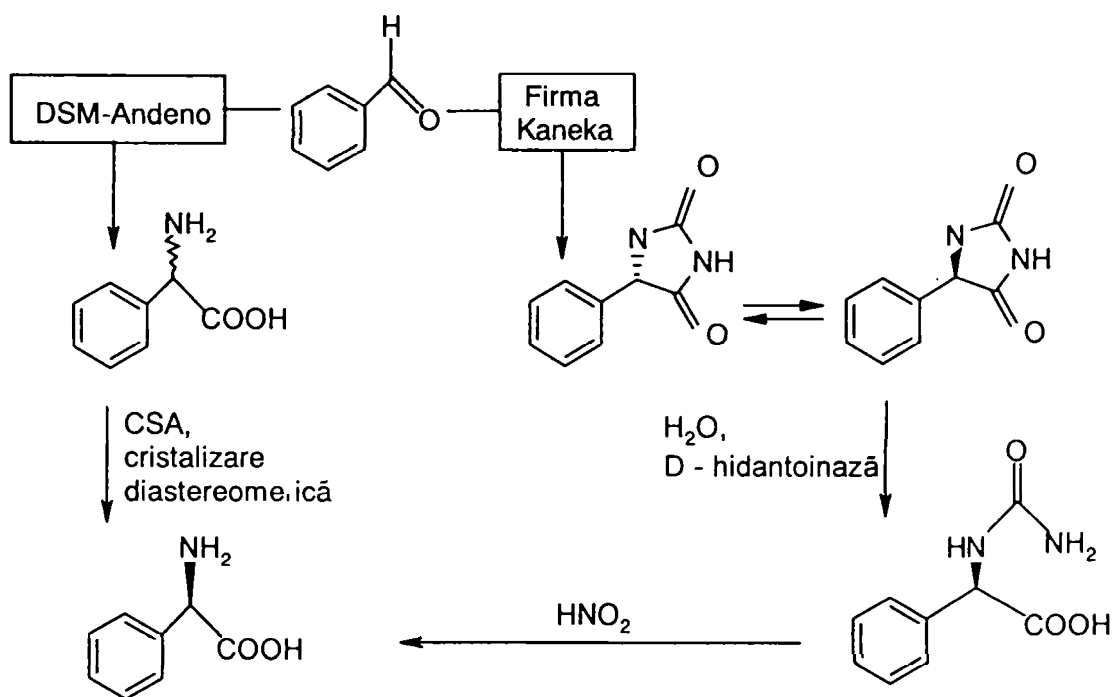


Figura 8.2. Căile de sinteză a D-fenilglicinei [30]
CSA : acid (+)camfor-8-sulfonic

Intermediarul cheie în cuplarea chimică la nucleul β -lactamic este D-fenilglicina care este mai întâi supusă unei activări. Cuplarea enzimatică necesită, de asemenea, un donor de catenă laterală activat, cum ar fi un ester, o amidă, o anhidridă.

Activarea D-fenilglicinei s-a realizat prin transformarea sa într-o anhidridă Dane sau în clorura sa acidă. Aceasta din urmă se poate obține în două trepte, cu HCl și respectiv PCl₅ într-un solvent clorurat.

S-a preparat, de asemenea, direct derivatul activat în loc de aminoacid. Și este preferată amida D-fenilglicinei în locul esterului, care presupune sinteza aminoacidului urmată de esterificare. A fost deja raportat la începutul anilor 1970 un procedeu de sinteză a D-fenilglicinamidei prin hidroliza enantioselectivă a racemicului obținut din sinteza Strecker în prezența unei L-amidaze [358,359]. S-a realizat apoi un procedeu care utilizează o L-aminopeptidază din *Pseudomonas putida* ATCC 12633. [35,294,360] (Figura 8.3)

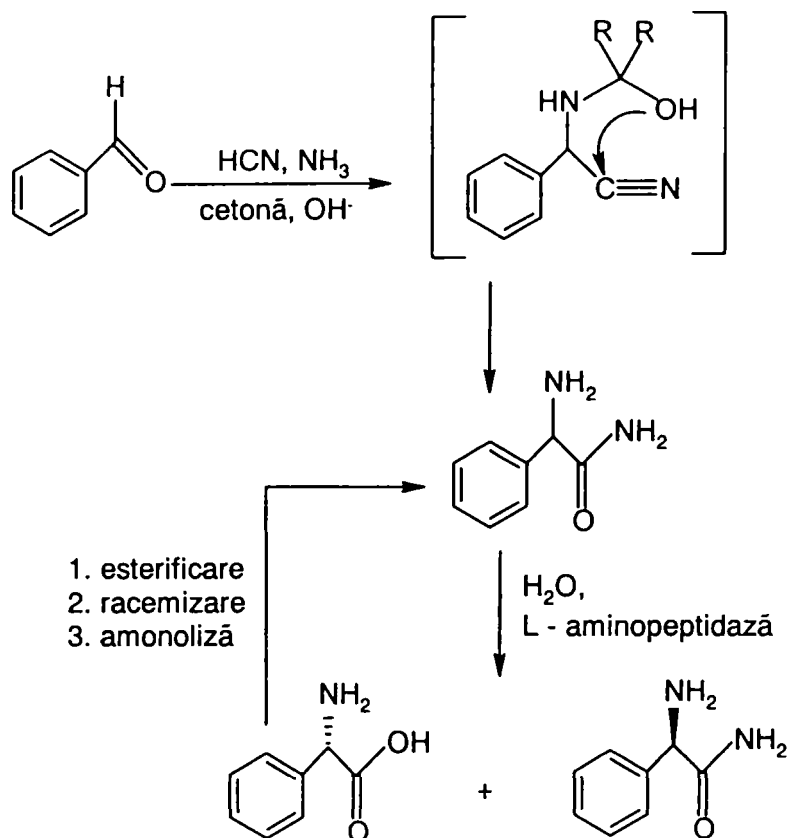


Figura 8.3. Sinteza D-fenilglicinamidei prin procedeu cu aminopeptidază [30]

Dezavantajul inerent al acestor procese de rezoluție optică este că produsul dorit este obținut cu un randament de maxim 50%. Reciclarea L-fenilglicinei (nedorită), prin transformarea ei în D,L-fenilglicinamidă, se realizează convențional în trei trepte esterificare, racemizare, amonoliză [361]. Acest procedeu generează cantități mari de săruri, deoarece esterificarea α -aminoacizilor necesită o cantitate stoichiometrică de acid, atât reactantul cât și produsul fiind bazici. Astfel că un asemenea procedeu este neatractiv atât din punct de vedere economic cât și energetic. Soluția mai scurtă este de a racemiza L-fenilglicina și adăugarea racematul la procedeu existent de rezoluție prin cristalizarea sării diastereoizomerice.

Un procedeu catalitic, care să nu implice sarea, pentru reactivarea L-fenilglicinei ar necesita o metodologie pentru o reacție în cataliză acidă care să aibă loc într-un mediu bazic. Această problemă a fost rezolvată prin utilizarea unui catalizator acid solid, zeolitul H-USY, în care accesul la centrele acide este restricționat (împiedicat). Reacția este acompaniată de racemizare datorită mediului bazic [30].

Lipaza B produsă de *Candida antarctica* catalizează amonoliza enantioselectivă a esterului fenilglicinei la D-fenilglicinamidă [362]. Combinând acest procedeu cu racemizarea in situ a esterului L-fenilglicinei, mediată de o aldehydă aromatică (ex. piridoxal) se obține o rezoluție cu o cinetică dinamică. Enantioselectivitatea amonolizei catalizată de lipază, care la început a fost relativ scăzută [363] a fost îmbunătățită prin realizarea reacției la -20°C , D-fenilglicina obținându-se cu un randament de 85%, cu puritate optică de 88%, după 70 ore

[364] (Figura 8.4). Pentru ca procedeul să devină fezabil economic este necesară o îmbunătățire atât a timpului de reacție cât și a enantioselectivității.

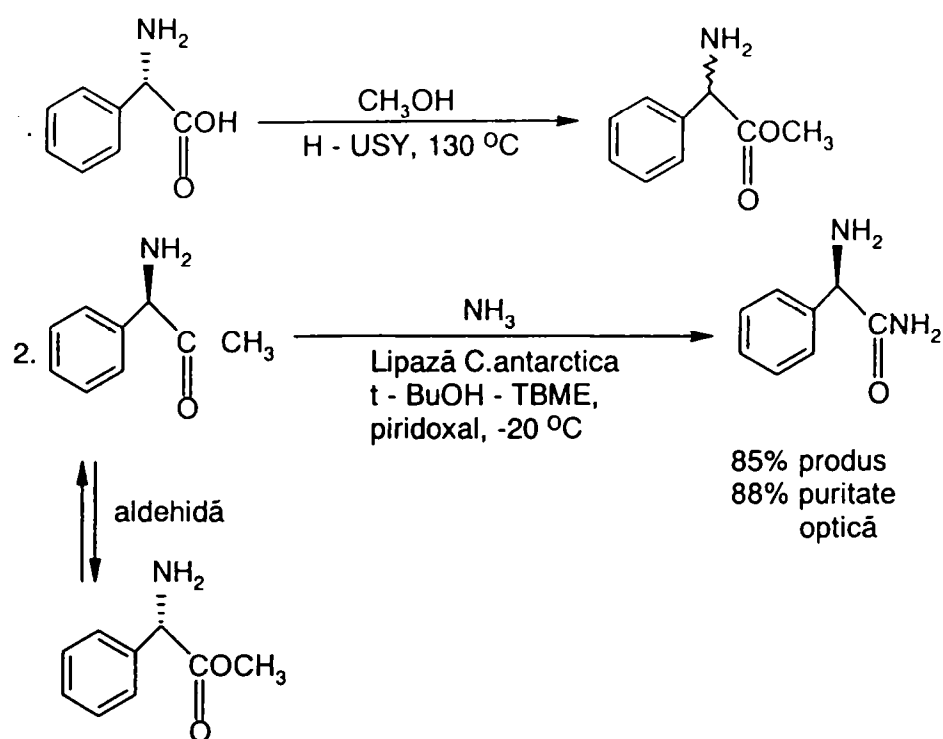


Figura 8.4. Obținerea D-fenilglicinamidei printr-o esterificare fără obținere de sare [30]

DSM a realizat o rezoluție dinamică a fenilglicinamidei prin combinarea elegantă a cristalizării diastereoizomerice a sării acidului L-mandelic cu D,L-fenilglicinamida cu racemizarea in situ, catalizată de benzaldehidă, a L-amidei [365] (Figura 8.5). D-fenilglicinamida este obținută aproape cantitativ și cu puritate optică foarte bună. Acidul L-mandelic poate fi reciclat după desprinderea din sare, dar reciclarea unei cantități stoichiometrice de agent optic rămâne încă treapta limitativă a acestui procedeu.

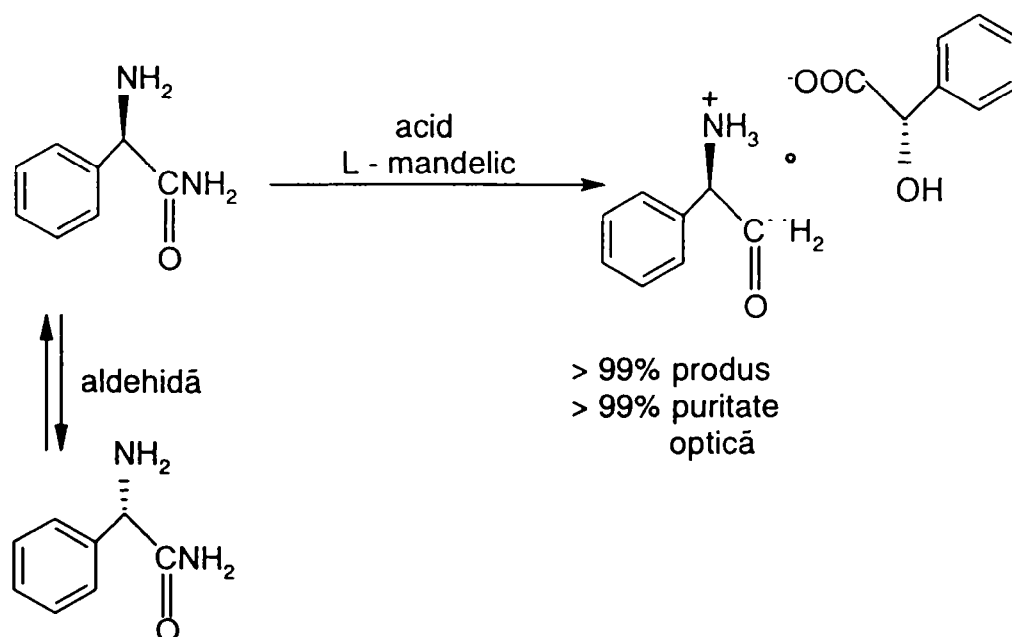


Figura 8.5. Rezoluția dinamică a D-fenilglicinamidei prin cristalizare diastereoizomerică [30]

Net superioară tuturor acestor procedee ar fi conversia directă a racemicului nitrilului fenilglicinei (2-amino-2-fenilacetonitril) în D-fenilglicinamidă, folosind o nitril hidratază D-selectivă într-un proces de rezoluție cu o cinetică dinamică (se cunoaște că nitrilul racemizează ușor) (Figura 8.6).

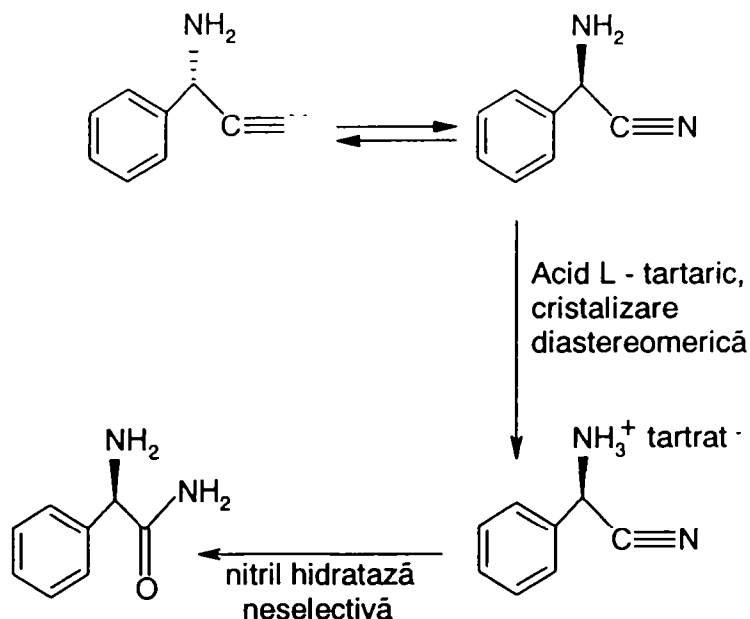


Figura 8.6. Calea nitril hidratazei pentru obținerea D-fenilglicinamidei [30]

Acest procedeu a fost mai mult sau mai puțin avut în vedere datorită unei lipse de nitril hidratază enantioselectivă [368]. S-au testat mai mult de 60 de tulpini producătoare de nitril hidratază, găsiindu-se 5 care să convertească D,L-fenilglicinnitrilul. Nici una dintre acestea nu a fost enantioselectivă. Enantioselectivitatea observată s-a datorat unei amidaze, așa cum este cazul de obicei.

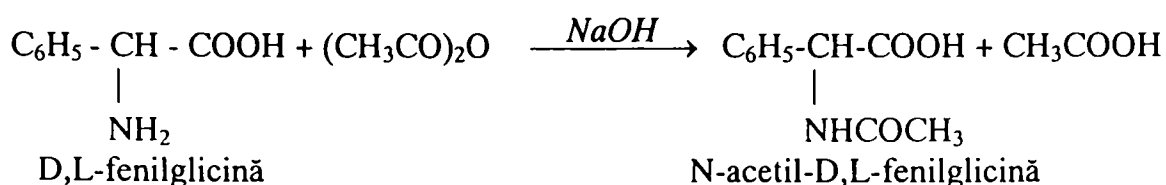
O altă propunere, mai puțin atractivă dar totuși interesantă ar fi hidratarea stereoselectivă a D-fenilglicinnitrilului, mediată de nitril hidrataza. D-nitrilul este accesibil printr-o transformare asimetrică a sării acidului L-tartric cu nitrilul racemic [369]. A fost necesară o optimizare atentă pentru a minimaliza racemizarea ușoară și degradarea printr-o retro-reacție Strecker. Aceasta din urmă are loc ușor la pH ~ 7, condiție care este optimă pentru reacția enzimatică. S-a găsit că retro-reacția Strecker poate fi ușor evitată prin realizarea reacției printr-un procedeu baie cu alimentare continuă (pentru a menține o concentrație scăzută a nitrilului), la pH 7 și 5°C. S-a obținut D-fenilglicinamida cu o concentrație 0,1 M, cu randament de > 95% și cu o puritate optică de > 95%, în prezența speciei Rhodococcus sau Novo SP361. Enantioselectivitatea poate fi și mai mult îmbunătățită, cu ceva pierdere în randament, dacă se prelungește timpul de reacție.

Cercetările efectuate experimental și prezentate în studiul actual, au constatat în separarea D-fenilglicinei din amestecul racemic prin metoda cu aminoacilază imobilizată.

Etapele procesului de obținere a D-fenilglicinei au fost:

a) Acetilarea D,L-fenilglicinei

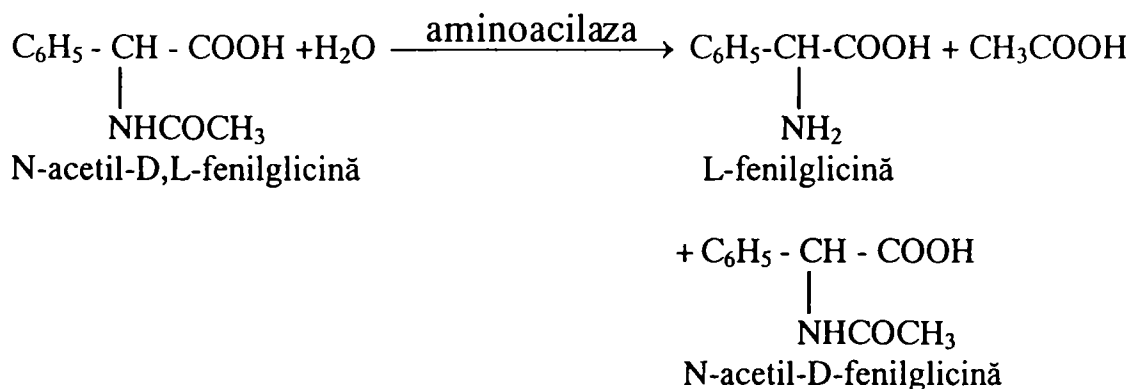
Are loc conform următoarei reacții:



Acetilarea s-a realizat cu anhidridă acetică, în soluție apoasă slab alcalină, la temperaturi cuprinse între 5-10°C. Aminoacidul acetilat s-a separat din mediul de reacție prin acidulare la pH 1,5-2,0.

b) Hidroliza enzimatică asimetrică a N-acetil-D,L-fenilglicinei

N-acetil-L-fenilglicina din amestecul racemic este hidrolizată selectiv în prezența aminoacilazei:



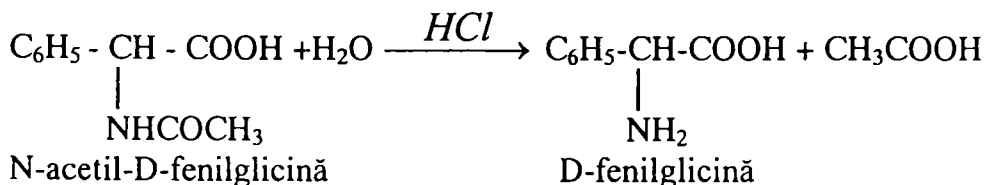
Hidroliza s-a realizat în soluție apoasă, la pH 7,0 și 50°, în prezență de CoCl₂ ca activator al aminoacilazei.

Soluția rezultată în urma hidrolizei s-a concentrat sub vid la 50°C până la 20% din volumul inițial, când a precipitat L-fenilglicina, care s-a separat prin filtrare.

Prin acidularea filtratului la pH 2 s-a separat N-acetil-D-fenilglicina.

c) Hidroliza acidă a N-acetil-D-fenilglicinei

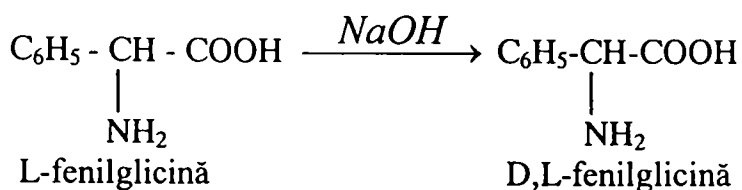
Reacția are loc în prezența acidului clorhidric la reflux:



D-fenilglicina obținută s-a separat prin precipitare la pH izoelectric (pH 5,6), care s-a realizat prin adăugare de soluție NaOH.

d) Racemizarea L-fenilglicinei

L-fenilglicina separată se racemizează cu scopul de a o reintroduce în proces. Racemizarea are loc în cataliză bazică (NaOH), la reflux:



Racemicul obținut s-a separat prin precipitare la pH 5,6 cu acid clorhidric.

În continuare sunt prezentate pe larg cele patru etape.

8.1.2. Acetilarea D,L-fenilglicinei [354]

D,L-fenilglicina se acetilează cu anhidridă acetică, în mediu apos slab alcalin. În mediu bazic solubilitatea fenilglicinei (PheGly) este mai mare; aminoacidul este deprotonat, perechea de electroni neparticipanți de la azot fiind accesibilă atacului electrofil din partea anhidridei acetice. Acetilfenilglicina precipită din soluție prin acidulare.

Reactivii utilizați au fost:

- D,L-fenilglicină, puritate 98,2% (Terapia Cluj)
- anhidridă acetică p.a. (Sigma)
- hidroxid de sodiu p.a. (Lachema)
- acid clorhidric concentrat 30% (Chimopar București)

Mod de lucru: Într-un balon prevăzut cu agitare și răcire s-a suspendat D,L-fenilglicina în apă. Suspensia densă obținută a fost răcită sub agitare la 5°C și s-au introdus alternativ, în porțiuni mici, anhidrida acetică și soluția de NaOH astfel încât pH-ul mediului să fie slab bazic, iar temperatura amestecului să se mențină între 5 și 15°C. Masa de reacție s-a fluidizat pe măsura adăugării reactivilor. Acetilarea a durat 2-3 ore. Spre sfârșitul adăugării reactanților, amestecul de reacție s-a îngroșat. S-a continuat agitarea încă 30 minute pentru perfectarea reacției. Apoi masa de reacție s-a acidulat cu HCl conc. menținând temperatura la 5-15°C. Când soluția a atins pH = 3,5 produsul a început să precipite. S-a acidulat în continuare până la pH = 2,0, după care amestecul de reacție a fost lăsat la 4°C timp de o oră pentru perfectarea precipitării. Suspensia s-a filtrat, precipitatul s-a spălat cu apă rece apoi s-a uscat pe baie de aer și la etuvă, la 50-55°C. Acetilfenilglicina obținută s-a caracterizat prin punct de topire, spectru IR, cromatografie în strat subțire, puritate (analiză cu ninhidrină, titrare potențiomtrică).

Metode de analiză utilizate

1) Determinarea fenilglicinei cu ninhidrină

Metoda utilizată este cea prezentată anterior (vezi Cap.4.1)

2) Titarea potențiomtrică

Deoarece aminoacizii sunt substanțe amfotere, titrarea directă a grupării carboxil cu NaOH nu duce la rezultate de mare precizie. Este necesară o scădere a caracterului bazic, ce se poate realiza prin titrare în prezența alcoolului.

Aparatura utilizată a fost pH-metru digital (Radelkis OP-910), biuretă automată (Radelkis), înregistrator potențiomtric (Radelkis OH.0.814/1), agitator magnetic.

Mod de lucru: 0,05g Acetilfenilglicină (sau fenilglicină), cântărită cu precizie de 0,0001g, s-au dizolvat în 50 ml apă distilată. Proba s-a titrat cu NaOH 0,1N utilizând instalația automată de titrare. Din curba de titrare s-a determinat volumul de echivalență V_e . Cantitatea de acetilfenilglicină (respectiv fenilglicină) s-a determinat cu relația:

$$g = V_e \cdot F \cdot M / 10\,000 \text{ (g)}$$

unde V_e = volumul de echivalență
 F = factorul soluției de NaOH 0,1N
 M = masa moleculară

Metoda a fost folosită pentru determinarea purității D-fenilglicinei, L-fenilglicinei, N-acetil-D-fenilglicinei, etc.

Eroarea metodei este de maxim 0,3%.

3) Spectroscopia de infraroșu

Spectrul IR poate fi folosit atât pentru identificarea fenilglicinei și a acetilfenilglicinei, cât și ca un criteriu de puritate a substanței.

Spectrele IR ale fenilglicinei și acetilfenilglicinei au fost înregistrate în pastilă de KBr, la un spectrofotometru tip Specord 75 IR. Benzile IR caracteristice fenilglicinei și acetilfenilglicinei sunt prezentate în Tabelele 8.1, respectiv 8.2.

Tabel 8.1. Benzile caracteristice ale fenilglicinei în spectrul IR

Număr de undă, cm^{-1}	Grupare specifică
2900-3000 (i,l)	-NH ₃ ⁺ valență, -OH valență, -CH ₃ valență,
1600-1620 (i)	-C=O valență, asimetrică
1275-1600 (i)	-NH ₃ ⁺ deformare, asimetrică
1500-1520 (i)	-NH ₃ ⁺ deformare, asimetrică
1400 (i)	-C=O valență, asimetrică
1270 (m)	-C-N valență
1220 (s)	-C-C valență
1070 (s)	-C-O valență
920 (s)	-OH deformare
3050(s), 1600(i), 1500(i),700(l), 500(i)	benzi caracteristice sistemului aromatic

Tabel 8.2. Benzile caracteristice ale acetilfenilglicinei în spectrul IR

Număr de undă, cm^{-1}	Grupare specifică
2350 (l)	-NH valență
3090 (m)	-CH asociere
2970 (m)	-CH ₃ valență
2600(l), 2450(m)	-NH valență
1950 (l)	-C=O valență în acizi
1615 (l)	-C=O valență în amidă
1650 (l)	-NH deformare în amidă
1420 (m)	-OH deformare în plan
1195 (l)	-CN valență
960 (m)	-CH deformare în plan
660 (l)	-C-C valență
3050(s), 1600(m)	benzi caracteristice sistemului aromatic

4) Analiza polarimetrică

Metoda polarimetrică de analiză se bazează pe proprietatea unor substanțe de a roti planul luminii polarizate, însușire care este legată fie de asimetria rețelei cristaline fie de asimetria moleculei. Substanțele cu asimetrie moleculară - numite optic active rotesc planul luminii polarizate în orice stare de agregare și sunt dextrogire sau levogire, după cum rotația se face spre dreapta sau spre stânga. Rotația specifică, fiind o însușire particulară a fiecărui compus optic activ, este folosită drept criteriu de caracterizare a acestei categorii de compuși și pentru determinarea purității optice. Impurificarea cu substanțe inactive, cu antipodul substanței cercetate, sau în general cu substanțe având activitatea mult diferită, duce la variații mari ale rotației specifice aparente.

Fenilglicina și acetilfenilglicina fiind substanțe optic active, metoda polarimetrică a fost folosită pentru caracterizarea și determinarea purității optice a L-fenilglicinei, D-fenilglicinei, N-acetil-D-fenilglicinei obținute, cât și pentru urmărirea reacției de racemizare a L-fenilglicinei.

S-a folosit un polarimetru tip Polamat A cu cuvă termostabilă cu lungimea de 20 cm.

Eroarea de măsurare este de 3%.

Mod de lucru: S-a preparat o soluție de D-fenilglicină, respectiv N-acetil-D-fenilglicină în HCl 1 N, respectiv în apă distilată, cu o concentrație de 1 g la 100 ml, respectiv 0,5 g la 100 ml. Soluția s-a introdus în cuva termostată la 25°C a polarimetrului și s-a citit unghiul efectiv de rotație α_{ef} , la lungimea de undă $\lambda = 5893$ nm (linia D a sodiului).

În scopul eliminării influenței grosimii de strat și densității, se calculează rotația specifică:

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{100 \cdot \alpha_{ef}}{l \cdot c}$$

unde: α_{ef} = unghiul de rotație citit la polarimetru;

l = lungimea stratului de lichid, (dm);

c = concentrația substratului, exprimată în grame de substanță în 100 ml solvent.

și pentru rotația moleculară:

$$[\alpha]_M = \frac{\alpha \cdot M}{100}$$

unde: M = masa moleculară a substanței.

Metoda polarimetrică poate fi utilizată și pentru determinarea concentrației L-fenilglicinei în soluțiile rezultate la hidroliza enzimatică a N-acetil-D,L-fenilglicinei, și a conversiei reacției de hidroliză.

Soluțiile obținute la hidroliza enzimatică au conținut N-acetil-D-fenilglicină, L-fenilglicină și N-acetil-L-fenilglicină nehidrolizată și s-au caracterizat printr-un anumit unghi de rotație ce depinde de concentrația fiecărui component din soluție. Pentru determinarea relației existente între unghiul efectiv de rotație al soluției și concentrația L-fenilglicinei din soluție, respectiv conversia reacției de hidroliză, s-au măsurat valorile unghiului de rotație al unor soluții sintetice cu concentrații de N-acetil-D-fenilglicină și L-fenilglicină cunoscute, ce corespund unor concentrații ale reacției de hidroliză enzimatică exprimate între 0-100%.

S-a obținut o dependență liniară între unghiul de rotație α_{ef} al probei și concentrația L-fenilglicinei din probă, ce a permis determinarea conversiei reacției de hidroliză enzimatică a N-acetil-D,L-fenilglicinei. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 8.3. și Figura 8.7.

Tabel 8.3. Unghiurile de rotație ale unor soluții sintetice de N-acetil-D-fenilglicină și L-fenilglicină

N-acetil-D-fenilglicină mol/l	L-fenilglicină mol/l	Conversie %	α_{ef} grade
0,050	0,050	100	-2,63
0,045	0,045	90	-2,37
0,040	0,040	80	-2,10
0,030	0,030	60	-1,58
0,025	0,025	50	-1,31
0,020	0,020	40	-1,07
0,015	0,015	30	-0,80
0,010	0,010	20	-0,53
0,000	0,000	0	0,00

Obs. Diferența până la 0,1 mol/l este reprezentată de amestecul racemic de N-acetil-D,L-

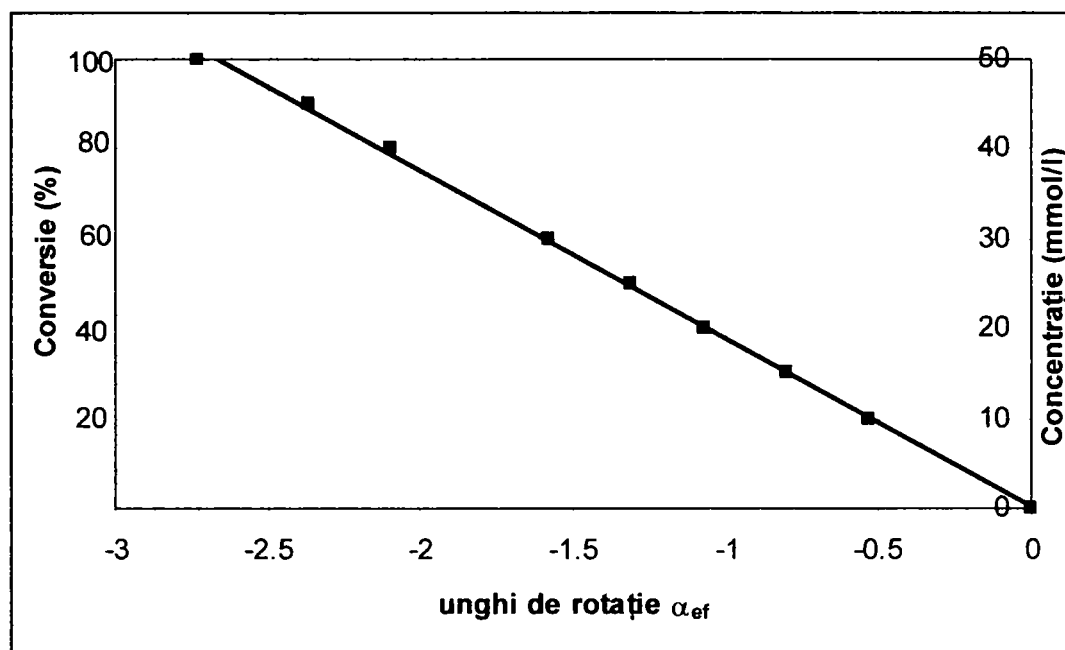


Figura 8.7. Dependenta unghiului de rotație α_{ef} de compoziția amestecului de N-acetil-D-fenilglicină și L-fenilglicină

5) Determinarea punctului de topire

Determinarea punctului de topire s-a folosit pentru caracterizarea fenilglicinei și acetilfenilglicinei. Punctul de topire s-a determinat la microscopul Boetius.

Fenilglicina topește cu descompunere la 300°C, iar acetilfenilglicina la 191-192°C.

6) Cromatografia în strat subțire

Cromatografia în strat subțire este o cromatografie de adsorbție și se bazează pe echilibrul de distribuție al moleculelor unui component între două faze nemiscibile, una mobilă iar cealaltă staționară.

Reactivi utilizați au fost:

- fenilglicină
- N-acetil-D,L-fenilglicină
- eluent : butanol: acid acetic: apă, 60:20:20 (volum) (reactivi Chimopar București)
- reactivi de culoare:

a) amestec soluție A+B în raport 9:1

- soluția A: 0,075 g verde de bromcresol (reactiv Sigma)
0,025 g albastru de bromfenol (reactiv Sigma)
100 ml alcool etilic absolut (reactiv Chimopar București)
- soluția B: 0,25 g bicromat de potasiu (reactiv Chimopar București)
0,50 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (reactiv Chimopar București)
100 ml apă

b) soluție de ninhidrină: 0,2 g ninhidrină (reactiv Loba Feinchemie) în
100 ml alcool etilic

- plăci de silicagel T - 6670 Sigma, grosimea stratului 0,25 mm.

Probele de analizat s-au dizolvat în apă și cu ajutorul unei capilare s-a aplicat un spot cât mai mic din fiecare probă pe linia de start a plăcii cromatografice.

În cuva de dezvoltare (6x15x26 mm) căptușită cu hârtie de filtru s-au introdus aproximativ 100 ml din eluentul preparat. S-a închis cuva etanș și s-a lăsat în repaus aproximativ o oră pentru saturarea atmosferei. S-a imersat placa cromatografică în cuvă, având grijă ca spoturile să nu intre în solvent, și s-a închis cuva. Placa s-a scos când frontul solventului a migrat aproximativ 10 cm.

S-a uscat cromatograma la aer, apoi în etuvă până la îndepărtarea completă a solventului, apoi s-a pulverizat reactivul de culoare pe placă. În cazul amestecului de soluție A+B colorația a apărut imediat (spoturi galbene pe fond albastru) pe când în cazul ninhidrinei placa a trebuit încălzită în etuvă pentru dezvoltarea culorii (spoturi roșii pe fond alb).

S-au calculat valorile R_f ca fiind raportul dintre X_s (distanța de la start până la punctul de concentrație maximă a unei zone de substanță) și X_d (distanța parcursă de frontul eluentului, în același timp).

Rezultate obținute

Sintezele efectuate au avut ca scop reducerea raportului molar fenilglicină : anhidridă acetică și a consumurilor de soluție de hidroxid de sodiu și acid clorhidric concentrat.

Păstrându-se constant raportul molar fenilglicină:NaOH:H₂O de 1:7:40, s-a redus raportul molar fenilglicină:anhidridă acetică de la 1:2,5 la 1:1, obținându-se următoarele rezultate (Tabelul 8.4).

Tabel 8.4. Acetilarea fenilglicinei la rapoarte molare variabile de fenilglicină:anhidridă acetică

Nr. Sint.	PheGly		Raport molar				Caracteristici		
	g	moli	PheGly	Anh. ac.	NaOH*	H ₂ O	AcPheGly g	η reacție %	Puritate %
1	15	0,1	1	2,5	7	40	15,5	77,5	99,7
2	30	0,2	1	2,0	7	40	27	67,5	99,98
3	15	0,1	1	1,5	7	40	16	80,0	99,90
4	15	0,1	1	1,2	7	40	17	85,0	99,99
5	15	0,1	1	1,0	7	40	15	75,0	98,30

* S-a folosit o soluție de NaOH 35%

PheGly N fenilglicină; Anh.ac. N anhidridă acetică; AcPheGly N acetilfenilglicină;
η - randament

În cazul în care acetilarea fenilglicinei s-a realizat la rapoarte molare fenilglicină:anhidridă acetică de 1:1,2 până la 1:2,5, acetilarea produsului a fost totală. N-acetil-D,L-fenilglicina obținută a avut o puritate de 99,7-99,9%. La raportul molar fenilglicină:anhidridă acetică de 1:1 în produsul de reacție au fost decelate urme de fenilglicină neacetilată (analiza cromatografică în strat subțire și cea cu ninhidrină).

Randamentele de reacție au fost între 67 și 85%.

S-a considerat de aceea necesar ca acetilarea să se efectueze cu un ușor exces de anhidridă acetică, considerându-se raportul molar optim fenilglicină:anhidridă acetică de 1:1,2.

La acest raport molar s-au efectuat o serie de sinteze, având ca scop reducerea consumurilor de NaOH și HCl folosite. Rezultatele experimentale sunt prezentate în Tabelul 8.5.

Din datele experimentale obținute rezultă că scăderea consumului specific de NaOH față de fenilglicină de la 7:1, conform rețetei inițiale, la 2,5:1 și scăderea corespunzătoare a cantității de HCl conc. necesară aducerii pH-ului la valoarea de precipitare a acetilfenilglicinei nu influențează randamentul reacției.

Tabel 8.5. Determinarea necesarului optim de NaOH și HCl la acetilarea fenilglicinei

Nr. sint.	PheGly		NaOH ml	HCl conc ml	Raportul molar			AcPheGly g	η_{reactie} %
	g	moli			PheGly	NaOH	HCl		
1	15	0,10	20	30	1	1,76	3,75	17	84,9
2	90	0,59	165	151	1	2,47	2,67	105	91,3
3	180	1,17	342	370	1	2,56	3,16	194	85,8
4	180	1,17	195	344	1	2,20	3,00	200	88,5
5	30	0,20	57	77	1	2,51	3,95	30	79,7

S-a utilizat soluție NaOH 35%

PheGly N fenilglicină; AcPheGly N acetilfenilglicină; η - randament

Acetilfenilglicina obținută a fost caracterizată prin:

- punct de topire, cuprins între 192-195°C, la toate probele;
- cromatografie în strat subțire;
- analiza cu ninhidrină - negativă;
- spectru IR;
- titrare potențiomtrică

Concluzii

- Acetilarea fenilglicinei se face cu anhidridă acetică în mediu slab bazic, la temperatură de 5-15°C;
 - Raportul molar optim fenilglicină:anhidridă acetică:NaOH este de 1:1,2:2,5;
 - Separarea acetilfenilglicinei se face prin acidulare cu HCl conc. până la pH 2, la temperatură de 5-15°C;
 - Randamentele de reacție sunt peste 85%, mai ales dacă se lucrează cu cantități mari;
- Deoarece acetilfenilglicina obținută din sinteză a avut o puritate avansată (peste 99%), ea s-a folosit ca atare la hidroliza enzimatică, fără o altă purificare mai avansată.

8.1.3. Hidroliza racemicului de N-acetil-D,L-fenilglicină cu aminoacilază imobilizată [350,351,352,353,370]

Prin reacția de hidroliză enzimatică a N-acetil-D,L-fenilglicinei în prezența aminoacilazei se obține L-fenilglicina și N-acetil-D-fenilglicina, conform reacțiilor prezentate.

Studiul hidrolizei s-a efectuat cu aminoacilază imobilizată pe DEAE - Filtradex R 50 prin procedeul în coloană.

Reactivii utilizați au fost:

- soluție de N-acetil-D,L-fenilglicină (reactivul obținut conform Cap. 8.1.2) 0,1M, pH 7,0, cu 5×10^{-4} M CoCl_2 ;
- hidroxid de sodiu 1 N;
- aminoacilază imobilizată pe DEAE - Filtradex R 50, de diferite activități, obținută conform Cap.5.

S-au realizat două tipuri de studii:

- la scară semipilot, când s-a utilizat o coloană de sticlă, prevăzută cu manta pentru termostatare, cu dimensiunile 2,5 x 100 cm. Pentru suportarea gelului s-au folosit inele de sticlă 5x5 mm;
- la scară pilot, când s-a utilizat o coloană de sticlă prevăzută cu manta pentru termostatare, cu dimensiunile 12 x 120 cm. Pentru suportarea gelului s-au folosit inele de

sticlă 5x25 mm.

Aminoacilaza imobilizată a fost tamponată cu tampon fosfat 0,1M, pH 7,0, apoi a fost introdusă în coloane, suportată pe inele de sticlă pentru a evita fenomenele de compactare în timpul funcționării coloanei. După umplere, prin coloană a fost trecut tampon fosfat 0,1M, pH 7,0, până la stabilizarea înălțimii gelului. Coloana a fost termostată la 50°C.

Apoi prin coloana cu aminoacilaza imobilizată s-a trecut soluția de N-acetil-D,L-fenilglicină, adusă la 50°C, cu ajutorul unei pompe dozatoare, cu diferite debite de alimentare. La ieșirea din coloană s-au cules probe în care s-a determinat concentrația de L-fenilglicină prin metoda cu ninhidrină și polarimetric. S-au calculat conversia, capacitatea coloanei, constanta de dezactivare și timpul de înjumătățire.

Conversia, X , se exprimă prin raportul dintre concentrația de fenilglicină determinată în efluent, în regim staționar, și concentrația de fenilglicină corespunzătoare transformării totale a substratului (N-acetil-L-fenilglicină) în produs.

$$X = \frac{c_p}{c_t} \cdot 100 \quad (\%)$$

unde: c_p - concentrația de fenilglicină în probă (M);

c_t - concentrația teoretică a fenilglicinei (M).

Capacitatea catalitică a coloanei, K_c , se calculează în U/ml catalizator și se determină cu relația:

$$K_c = \frac{C_p \cdot 10^6 \cdot Q}{60 \cdot V} \quad (\mu \text{ moli L-fenilglicină/min/ml catalizator} = \text{U/ml})$$

unde: Q - debit de alimentare (ml/h);

V - volumul de enzimă din coloană.

Capacitatea totală a coloanei, K_t , se exprimă în U și se determină cu relația:

$$K_t = K_c \cdot V \quad (\text{U})$$

Activitatea dinamică a coloanei, a_{din} , se calculează plecând de la coeficientul de umplere al coloanei cu lichid și timpul de contact dintre soluția de substrat și catalizator.

Coeficientul de umplere, f , este raportul dintre volumul de lichid din coloană (stabilit din date de echilibru), V_l , și volumul total al umpluturii (catalizator + lichid), V_t :

$$f = \frac{V_l}{V_t}$$

$$V_t = \frac{\pi d^2}{4} \cdot h \quad (\text{cm}^3)$$

unde: d - diametrul coloanei (cm);

h - înălțimea umpluturii (cm).

Timpul de contact, τ , s-a calculat pornind de la un volum V_0 de soluție de substrat. Acest volum se află în contact cu enzima imobilizată la un debit de alimentare Q (ml/h), timp de:

$$\tau = \frac{V_l}{Q} \quad (\text{h})$$

Acest volum de soluție, V_0 , va ocupa în coloană un volum V_1 de:

$$V_1 = \frac{V_0}{f} \text{ (ml)}$$

Considerând că G_0 este cantitatea totală de enzimă imobilizată (în grame) care ocupă în coloană un volum V_1 (ml), în volumul V_1 se vor găsi G_1 grame de enzimă:

$$G_1 = \frac{V_1}{V_0} \cdot G_0 \text{ (g)}$$

Activitatea dinamică a enzimei se calculează atunci cu relația:

$$a_{\text{din}} = V_0 \frac{c_p}{1000} \cdot 10^6 \cdot \frac{1}{\tau \cdot 60} \cdot \frac{1}{G_1} \text{ (\mu mol/min/g catalizator = U/g cat)}$$

Constanta de dezactivare, K_d se determină cu relația:

$$K_d = \frac{2,303}{t} \cdot \log \frac{E_0}{E_f}$$

unde: t - timp de funcționare a coloanei (ore);
 E_0 - activitatea inițială a enzimei (U/ml);
 E_f - activitatea finală a enzimei (U/ml).

Timpul de înjumătățire, $t_{1/2}$, este timpul necesar pentru reducerea la jumătate a activității coloanei și se calculează cu formula:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{K_d} \text{ (ore)}$$

Viteza spațială, VS (h^{-1}) se definește ca volumul de soluție trecut prin catalizatorul imobilizat într-un anumit timp, raportat la volumul de catalizator.

În primul experiment în care s-a folosit coloana micropilot, aminacilaza imobilizată pe DEAE-Filtradex R50 a avut o activitate $a = 0,89$ U/ml, activitate totală $a_{\text{tot}} = 311,5$ U și un volum $V = 350$ ml.

Rezultatele experimentale obținute la exploatarea coloanei pentru hidroliza N-acetil-L-fenilglicinei sunt prezentate în Tabelul 8.6 și Figura 8.8.

Se observă că în timpul exploatarea coloanei, catalizatorul se dezactivează lent. După 265 ore de funcționare discontinuă, capacitatea coloanei a scăzut la 62% din valoarea inițială. Timpul de înjumătățire al capacității coloanei este $t_{1/2} = 336,5$ ore, adică 14 zile și corespunde unei constante de dezactivare $K_d = 2,05 \times 10^{-3} h^{-1}$.

Pentru menținerea conversiei la valori de peste 90%, viteza spațială a soluției de substrat a fost redusă corespunzător.

Tabel 8.6. Funcționarea coloanei micropilot cu DEAE-Filtradex R-50-aminoacilază pentru hidroliza N-acetil-L-fenilglicinei

Nr. crt.	VS h ⁻¹	Timp ore	Conc L-PheGly mol/l	Conversia, X %	K _t U
1	0,308	48	0,0475	95,0	78,20
2	0,279	53	0,0496	99,2	77,30
3	0,288	64	0,0481	96,3	77,07
4	0,322	68,5	0,0455	91,0	74,70
5	0,317	78,5	0,0360	72,0	60,84
6	0,318	85,5	0,0415	83,0	69,70
7	0,312	90,0	0,0440	88,1	73,00
8	0,380	96,0	0,0450	90,0	76,65
9	0,255	104,0	0,0410	82,0	55,50
10	0,254	112,0	0,0442	88,4	59,94
11	0,246	120,0	0,0493	98,6	64,35
12	0,240	128,0	0,0458	91,6	65,6
13	0,274	135,0	0,0464	92,8	64,85
14	0,179	154,0	0,0470	94,0	45,09
15	0,176	162,0	0,0482	96,4	45,32
16	0,180	181,0	0,0496	99,3	47,86
17	0,191	217,0	0,0490	98,0	50,06
18	0,177	255,0	0,0460	92,0	46,0
19	0,177	265,0	0,0480	96,0	48,0
20	0,125	285,0	0,0492	98,5	32,0

PheGly - fenilglicină

În cazul coloanei pilot s-a utilizat o DEAE-Filtradex R 50-aminoacilază cu o activitate de $a = 0,25$ U/ml, activitate totală $a_{tot} = 473$ U și un volum de $V = 1900$ ml. În acest caz coloana a fost exploatată continuu timp de 162 ore, cu o viteză spațială aproximativ constantă ($VS = 0,22$ h⁻¹). Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 8.7 și Figura 8.9.

Tabel 8.7. Funcționarea coloanei pilot cu DEAE-Filtradex R50-aminoacilază pentru hidroliza N-acetil-L-fenilglicinei

Nr. crt.	VS h ⁻¹	Timp ore	Conc L-PheGly mol/l	Conversia, X %	K _t U
1	0,26	15	0,0430	87,0	352,5
2	0,24	20	0,0438	87,8	330,4
3	0,225	28	0,0497	97,8	352,0
4	0,225	36	0,0454	90,5	322,8
5	0,205	40	0,0497	98,7	334,2
6	0,21	49	0,0489	96,2	320,0
7	0,24	56	0,0440	89,0	338,4
8	0,225	66	0,0480	95,7	341,5
9	0,225	73	0,0450	90,0	321,5
10	0,21	96	0,0440	89,0	313,0
11	0,197	105	0,0492	98,7	323,5
12	0,21	110	0,0476	94,8	317,3
13	0,225	115	0,0460	92,6	330,7
14	0,21	123	0,0450	90,8	303,8
15	0,24	140	0,0420	82,8	320,0
16	0,225	150	0,0450	89,0	317,8
17	0,225	156	0,0430	84,8	303,8
18	0,26	162	0,0380	76,5	318,0

PheGly - fenilglicină

În cazul exploatării acestui tip de coloană, cu diametrul de aproximativ 5 ori mai mare ca în cazul celeilalte coloane, rezultatele obținute sunt mai concludente, având în vedere că exploatarea a fost continuă și viteza spațială constantă. Ca și în cazul precedent catalizatorul se dezactivează lent, după 162 ore de funcționare activitatea enzimei a scăzut la 90% din valoarea inițială, spre deosebire de 58% în cazul precedent.

Timpul de înjumătățire este $t_{1/2} = 46$ zile față de 14 și corespunde unei constante de dezactivare $K_d = 6,2 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ (de 3 ori mai mică).

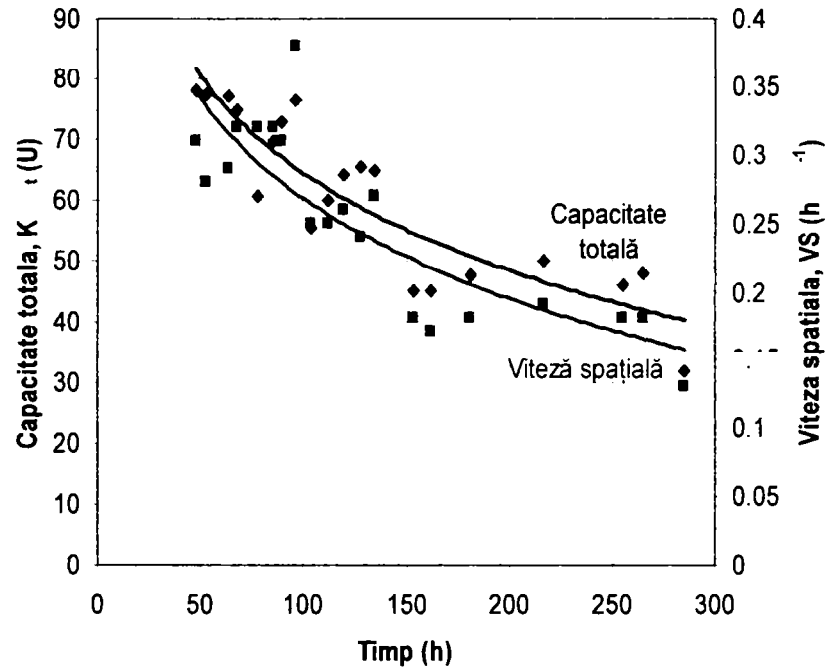


Figura 8.8. Graficul funcționării coloanei micropilot (capacitate totală și viteză spațială) în timp.

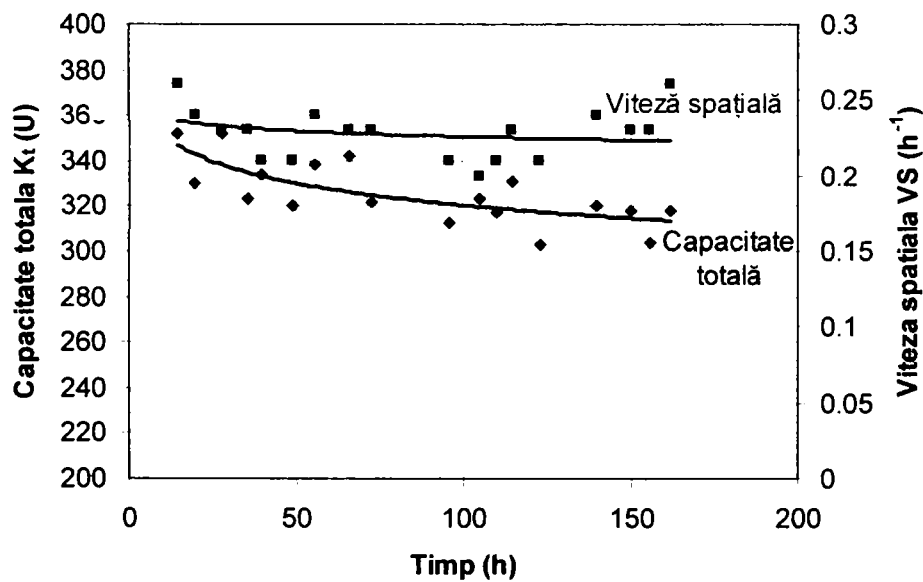


Figura 8.9. Graficul funcționării coloanei pilot (capacitate totală și viteză spațială) în timp.

8.1.4. Regenerarea enzimei imobilizate

După cum s-a văzut anterior, aminoacilaza imobilizată pe DEAE Filtradex R 50 își pierde activitatea la exploatarea continuă și îndelungată. Pentru a asigura conversii rezonabile (peste 90%) ar trebui ajustată viteza spațială. În acest caz, după cum s-a văzut în primul experiment și după cum era de așteptat, conversia crește. Dar procesul devine neeconomic datorită lungirii acestuia. Oricum, când se ajunge la o anumită valoare a activității coloanei scăderea vitezei spațiale nu mai dă rezultate. Din acest motiv este necesară regenerarea periodică a catalizatorului.

S-au testat două tehnici de regenerare a activității enzimatice a coloanei micropilot.

A. regenerarea enzimei în exterior, prin procedeul în baie

B. regenerarea enzimei direct pe coloană

A. Regenerarea enzimei imobilizată în exterior s-a realizat prin scoaterea catalizatorului din coloană, spălarea în baie tampon fosfat 0,1 M pH 7,0 până nu s-a mai detectat fenilglicină sau acetilfenilglicină în soluție. Peste gelul spălat s-a adăugat o soluție de aminoacilază, s-a agitat 3 ore, apoi s-a lăsat în contact 18 ore la 0-4°C. A urmat procedura de spălare prezentată la Cap.6.4.2: filtrare, agitare o oră cu acetat de sodiu 0,2 M, filtrare, spălare cu apă până nu s-au mai detectat proteine în filtrat (metoda Lowry), tamponare cu tampon fosfat 0,1 M pH 7,0. Catalizatorul s-a reintrodus apoi în coloană.

B. Regenerarea catalizatorului direct pe coloană a cuprins următoarele etape:

- coloana a fost spălată cu tampon fosfat 0,1 M, pH 7,0 până la eluarea totală a fenilglicinei și acetilfenilglicinei;

- regenerarea propriu-zisă s-a realizat prin trecerea (cu recirculare) pe coloană a unei soluții enzimatice proaspete, cu o viteză spațială de 0,185 h⁻¹, timp de 12 ore, după care soluția eluată s-a recirculat în coloană timp de 14 ore;

- coloana a fost spălată cu tampon fosfat 0,1 M, pH 7,0 până când în apele de spălare nu au mai fost detectate proteine.

Pentru determinarea capacității coloanei după regenerare s-a trecut prin coloană o soluție de N-acetil-D,L-fenilglicină 0,1 M, pH 7,0, cu 5·10⁻⁴ M CoCl₂, la 50°C, cu o viteză spațială de 0,37 h⁻¹.

Rezultatele obținute în cazul celor două tipuri de regenerări, în baie și pe coloană, sunt prezentate în Tabelul 8.8.

Tabel 8.8. Regenerarea activității aminoacilazei imobilizate pe DEAE-Filtradex R 50

Regenerare	Aminoacilază	Vol. ml	Proteine mg/ml	Activitate		K _t U	η _{imobiliz.} %
				U/ml	U _{tot}		
în baie	sol. inițială	500	1,664	0,280	140,00		20
	imobilizat inițial	350	-	0,175	61,57	46,41	
	imobilizat final	350	-	0,237	82,95	74,26	
	ape spălare	500	0,336	0,004	2,00		
în coloană	sol. inițială	500	2,074	0,166	82,40		42
	imobilizat inițial	270	-	0,175	47,25	28,62	
	imobilizat final	270	-	0,250	67,50	63,19	
	ape spălare	810	0,280	-	-		

Regenerarea în baie a dus la rezultate mai slabe decât cea efectuată în coloană. Capacitatea coloanei a crescut de numai 1,6 ori față de 2,2 ori pentru regenerarea pe coloană. De asemenea randamentul de imobilizare, calculat față de capacitatea totală a coloanei determinată dinamic (K_t) este mult mai bun în cazul regenerării în coloană, 42% față de numai

20% la procedeul în baie.

Pe de altă parte, operațiile în sine sunt mult mai ușor de efectuat în cazul regenerării pe coloană, singurul lucru care trebuie făcut fiind schimbarea soluțiilor care sunt trecute prin coloană.

8.1.5. Obținerea D-fenilglicinei

Eluatul obținut în urma hidrolizei enzimice (pe coloană) conține L-fenilglicină, N-acetil-D-fenilglicină și N-acetil-L-fenilglicină neconvertită (urme). Obținerea D-fenilglicinei cuprinde mai multe etape și anume.

- separarea L-fenilglicinei
- separarea N-acetil-D-fenilglicinei
- hidroliza N-acetil-D-fenilglicinei pentru a obține D-fenilglicină

8.1.5.1. Separarea L-fenilglicinei din hidrolizatul enzimatic

Separarea L-fenilglicinei din amestecul de L-fenilglicină și N-acetil-D,L-fenilglicină s-a bazat pe diferența dintre solubilitățile lor în apă la 0-10°C.

Soluția rezultată la hidroliza enzimatică s-a concentrat într-un evaporator rotativ la 5-10 mm Hg și 50-60°C până la un volum final de aproximativ 20% din cel inițial. Soluția concentrată obținută s-a răcit la 10°C când L-fenilglicina a cristalizat. S-a filtrat la 10°C și s-a uscat în etuvă la 70-80°C.

L-fenilglicina obținută s-a caracterizat prin punct de topire, spectru IR, rotație optică specifică. Puritya produsului s-a determinat prin titrare potențiomtrică și metoda cu ninhidrină.

A fost realizat un număr de 14 separări pe soluțiile obținute la exploatarea coloanelor micropilot și pilot. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 8.9.

Tabel 8.9. Separarea L-fenilglicinei din eluatele de la hidroliza enzimatică

Nr. crt.	Volum inițial ml	Volum final ml	L-fenilglicină mM	Acetilfenilglicină mM	Cantit. L-PheGly g	$[\alpha]_D^{25}$	Puritate %	$\eta_{separare}$ %
1	1950	310	40.2	59,8	8,50	+132,0	92,50	88,45
2	2340	540	46.8	53,2	15,95	+112,5	46,33	110,76
3	1965	385	46.6	53,4	15,2	+120,6	69,58	109,75
4	760	220	42.6	57,4	3,75	+131,76	84,10	81,43
5	1910	460	46.5	53,5	11,80	+144,86	92,34	87,93
6	1200	2335	47.8	52,2	8,50	+142,50	88,82	98,04
7	1315	285	49.1	50,9	11,20	+136,40	80,26	114,75
8	1165	215	47.8	52,1	6,80	+169,0	94,69	80,66
9	1555	300	45.0	55,5	8,50	+179,6	90,69	80,34
10	1850	370	47.8	52,2	11,20	+156,2	94,20	83,83
11	1900	340	47.7	52,3	12,50	+144,9	86,80	91,20
12	11600	960	42.9	57,0	75,32	+149,7	93,20	91,50
13	26000	2210	44.3	55,7	174,03	+138,7	86,80	88,00
14	21400	3370	43.4	56,6	147,80	+142,4	89,00	91,30

* Rotația specifică a L-fenilglicinei este +156,4°, c = 1 g/100 ml HCl 1N
PheGly N fenilglicină; η N randament

Obs. L-fenilglicina separată topește la temperaturi mai mari de 300°C cu descompunere.

Cromatografia în strat subțire a arătat că L-fenilglicina obținută nu conține acetyl-fenilglicină, exceptând separările 2, 3 și 7, când se observă clar că și randamentele de separare depășesc 100%. În acest caz suspensia a fost răcită la temperatură mai mică decât 10°C, când a precipitat și acetyl-fenilglicina.

Concentrarea soluțiilor s-a făcut de aproximativ 5 ori, exceptând două cazuri (12 și 13) când concentrarea s-a făcut de 12 ori. Totuși acest lucru nu a influențat nici randamentele de separare (80-90% în medie) și nici puritatea produsului (85-95%). De fapt această puritate nu este semnificativă pentru că preparatele obținute (impurificate cu acetyl-fenilglicină) au fost în continuare racemizate și acetilate pentru a fi reintroduse în proces.

8.1.5.2. Separarea N-acetyl-D-fenilglicinei din hidrolizatul enzimatic

Separarea N-acetyl-D-fenilglicinei din filtratele rezultate în urma separării L-fenilglicinei s-a realizat prin precipitarea N-acetyl-D-fenilglicinei la pH acid (1-1,5). L-fenilglicina rămasă în urme în soluție nu precipită, formând un clorhidrat solubil.

Filtratele obținute la faza anterioară s-au acidulat cu HCl 5N până la pH 1-1,5. Acidularea s-a făcut lent, sub agitare. S-a format un precipitat alb. Suspensia s-a lăsat peste noapte la 0-4°C apoi s-a filtrat. Solidul obținut s-a uscat la etuvă la 60°C, apoi s-a caracterizat prin spectru IR, punct de topire, rotație specifică. Puritatea s-a determinat potențiomtric.

În Tabelul 8.10 sunt prezentate rezultatele obținute la separarea N-acetyl-D-fenilglicinei și caracteristicile acesteia.

Toate cele 14 produse obținute au avut puncte de topire în domeniu 190-192°C și nu au conținut fenilglicină (cromatografie în strat subțire).

S-a obținut N-acetyl-D-fenilglicină cu puritate avansată (98,6-99,9%). Randamentele de separare nu au fost prea bune (39-76%) și mai ales variabile, exceptând cele trei la scară pilot, când randamentele au fost mai constante și mai mari (78-82%).

Tabel 8.10. Separarea și caracterizarea N-acetyl-D-fenilglicinei

Nr. crt.	Cantitate g	Puritate %	$[\alpha]_D^{25}$	$\eta_{\text{separare}} \%$
1	11,0	99,72	-213,1	59,9
2	16,2	99,96	-216,5	68,2
3	7,9	99,93	-219,3	39,0
4	3,4	99,89	-224,4	41,2
5	15,0	99,94	-213,3	76,0
6	8,5	99,95	-209,8	70,3
7	11,0	98,86	-218,3	85,1
8	11,4	99,65	-216,4	69,4
9	11,5	99,34	-216,0	69,9
10	13,5	99,28	-216,8	72,4
11	10,10	98,86	-218,4	52,0
12	127,60	98,90	-232,8	80,3
13	279,80	98,60	-230,1	82,5
14	229,60	98,70	-232,6	78,0

η N randament

8.1.5.3. Hidroliza N-acetil-D-fenilglicinei

D-fenilglicina se obține prin hidroliza acidă a N-acetil-D-fenilglicinei. Prin aducerea pH-ului la valoarea 5,6 precipită D-fenilglicina din soluție, ca urmare a descompunerii clorhidratului (pH = 5,6 este pH-ul izoelectric al fenilglicinei).

N-acetil-D-fenilglicina s-a suspendat într-o soluție de HCl 2,5 N și s-a refluxat 4 ore. Raportul molar N-acetil-D-fenilglicină:HCl a fost de 1:1,5. După răcire soluția s-a adus la pH 5,6 cu o soluție de NaOH 5N când a precipitat D-fenilglicina. Suspensia s-a filtrat, iar precipitatul a fost spălat pe filtru cu apă distilată și alcool etilic la rece. Precipitatul obținut s-a uscat în etuvă la 60-70°C.

Produsele obținute s-au caracterizat prin spectroscopie IR, punct de topire, rotație optică specifică. Purity s-a determinat prin titrare potențiomtrică și metoda cu ninhidrină.

Pentru hidroliză s-a folosit N-acetil-D-fenilglicina izolată în laborator în experimentele prezentate anterior. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 8.11.

Tabel 8.11. Obținerea D-fenilglicinei prin hidroliza acidă a N-acetil-D-fenilglicinei

Nr. crt.	D-PheGly g	Puritate %	$[\alpha]_D^{25}$	η_{separare} %
1	6,8	99,53	-163,7	79,1
2	10,6	99,50	-146,8	82,8
3	5,0	90,94	-154,7	80,9
4	2,0	99,98	-160,8	75,5
5	8,4	99,80	-162,8	71,6
6	5,7	98,80	-160,8	82,4
7	22,0	97,2	-154,6	97,0
8	20,0	91,8	-153,2	98,5
9	194,2	98,8	-155,0	95,6
10	635,4	90,0	-130,0	90,0

PheGly N fenilglicină; η - randament

Produsele obținute topesc la temperatură de peste 300°C cu descompunere. Purificarea produsului prin recristalizare nu a fost necesară. D-fenilglicina obținută nu a conținut ioni de cobalt (analiza prin absorbție atomică). Prin cromatografie în strat subțire s-a remarcat faptul că produsele nu conțin acetilfenilglicină.

Randamentele de separare au fost de 70-82% în cazul în care s-a lucrat cu cantitate mică de substanță și de 90-98% în cazul în care s-a lucrat cu cantități mari, ceea ce era de așteptat.

S-au obținut produse cu puritate avansată (98-99%) în majoritatea cazurilor.

În ceea ce privește ultima separare (nr.10), s-a utilizat o N-acetil-D-fenilglicină obținută prin acilarea D-fenilglicinei, de puritate 88% (impurificată cu sare). În celelalte cazuri puritatea N-acetil-D-fenilglicinei a fost de 98-99%. Corespunzător, D-fenilglicina obținută în experimentul 10 are o puritate mai scăzută (90%). Deci, cum era de așteptat, puritatea chimică și optică a produsului obținut depinde de puritatea materiei prime luate în lucru.

8.1.6. Racemizarea L-fenilglicinei

Racemizarea, procesul de transformare a unor enantiomeri puri în modifi a ii racemice, poate fi considerată global fie ca o transformare reversibilă reciprocă a enantiomerilor, $(+) \Leftrightarrow (-)$, fie ca o transformare ireversibilă de ordinul I: $(+) \rightarrow (\pm)^2$.

Consider nd racemizarea ca o transformare reversibilă a enantiomerilor, aplicarea ecua iei de viteză caracteristică acestor transformări duce la următoarea expresie pentru constanta de viteză:

$$K = \frac{2,3}{2 \cdot t} \log \frac{\alpha_0}{\alpha_t}$$

 n care: α_0 este rotația specifică inițială iar α_t rotația specifică la un moment dat.

 n al doilea caz, aplicarea ecua iei de viteză pentru transformări ireversibile de ordinul I duce la calculul unei constante de viteză din expresia:

$$K' = \frac{2,3}{t} \log \frac{\alpha_0}{\alpha_t}$$

Se observă că cele două constante nu sunt egale ($K' = 2K$). Se obi nuie te să se considere că viteza de racemizare K' este dublul vitezei de transformare reciprocă a enantiomerilor.

Racemizarea este un proces  nso it de creșterea entropiei, deoarece modifi a iile racemice posedă o stare de dezordine mai mare decât enantiomerii puri ini iali. Ca mecanism, de cele mai multe ori racemizarea implică apari ia unui compus intermediar simetric care, printr-o reacție reversibilă, revine la substan a inițială racemizat .

Dintre metodele utilizate pentru racemizarea aminoacizilor amintim:

- Racemizarea aminoacizilor în cataliză acidă
- Racemizarea aminoacizilor în cataliză bazică
- Racemizarea aminoacizilor prin complec i chela i
- Racemizarea aminoacizilor în prezența enzimelor

Deoarece pentru sinteza de antibiotice este necesară D-fenilglicina, L-fenilglicina separată nu  i găsește utilizare ca atare, nefiind un aminoacid natural, proteinogen.  n plus neutilizarea ei duce automat la scăderea randamentului de obținere sub 50%, având în vedere hidroliza stereoselectivă a N-acetil-D,L-fenilglicinei. Din acest motiv este necesară racemizarea L-fenilglicinei pentru reintroducerea ei în proces.

S-a utilizat racemizarea în cataliză bazică. Separarea racemicului din amestecul de reacție s-a realizat prin acidulare p n  la pH 5,6, pun ndu-se în libertate fenilglicina din sarea de sodiu.

Mod de lucru: L-fenilglicina  i soluția de NaOH 6N (raport molar fenilglicină:NaOH egal cu 1:4)s-au refluxat timp de trei ore. Amestecul de reacție a fost apoi răcit  i s-a adus la pH 5,6 cu HCl 5N, c nd a precipitat D,L-fenilglicina. Suspensia s-a lăsat 12 ore la 0 C, apoi s-a filtrat. Precipitatul s-a spălat pe filtru cu apă distilată rece. Produsul ob tinut s-a uscat la 60 N 70 C.

Produsele ob tinate s-au caracterizat prin spectru IR, punct de topire, rotație optică specifică. Puritatea s-a determinat prin titrare poten iometric   i metoda cu ninhidrină.

Rezultatele ob tinate sunt prezentate în Tabelul 8.12.

S-au ob tinut racemice cu puritate de 92%  i activitate optică reziduală de 0 N (+1), cu randamente de 88 - 98%, mai mari în cazul în care s-a plecat de la cantita i mai mari de fenilglicină.

Tabel 8.12. Racemizarea L-fenilglicinei

Nr. Crt.	D,L-PheGly g	Puritate %	$[\alpha]_D^{25}$ grade	η_{separare} %
1	31,0	92,6	+1,01	98,4
2	13,0	92,8	0,0	94,2
3	37,0	92,9	+1,005	88,1
4	334,0	92,0	0,0	92,0
5	972,2	99,0	0,0	98,0

PheGly N fenilglicină; η - randament

8.1.7. Concluzii

În urma cercetărilor efectuate pentru obținerea D-fenilglicinei din amestecul racemic, utilizând hidroliza enzimatică a racemicului de N-acetil-D,L-fenilglicină, se pot trage următoarele concluzii:

1. Acetilarea D,L-fenilglicinei s-a realizat cu anhidridă acetică în mediu bazic, la 5-10°C. Raportul molar optim fenilglicină : anhidridă : NaOH a fost 1:1,2:2,5. N-acetil-D,L-fenilglicina obținută a avut o puritate de 99,7-99,9%, la un randament de reacție de 85-90%.
2. Hidroliza racemicului de N-acetil-D,L-fenilglicină s-a realizat în cataliza aminoacilazei imobilizată pe DEAE-Filtradex R-50, procedeul în coloană. Condițiile optime de hidroliză au fost: concentrație substrat 0,1M, concentrație CoCl_2 5×10^{-4} M, pH 7,0, temperatură 50°C.
3. Pentru menținerea unei conversii de peste 90%, debitul de curgere al soluției de substrat a fost scăzut corespunzător.
4. Timpul de înjumătățire al capacității enzimaticice pe coloana pilot a fost de 46 zile.
5. Regenerarea capacității coloanei s-a realizat prin trecerea directă a unei soluții aminoacilazice prin coloană. Randamentul de imobilizare a fost de 42% iar capacitatea coloanei a crescut de 2,2 ori.
6. Regenerarea capacității enzimaticice prin procedeul în baie a dus la un randament de imobilizare de numai 20%, cu o creștere a capacității de 1,6 ori.
7. Separarea L-fenilglicinei din eluatele de pe coloană s-a realizat prin concentrarea la vid și răcire, cu randament de 80-90%, produsele având puritate de 85-95%.
8. Separarea N-acetil-D-fenilglicinei din filtratele anterioare s-a realizat prin precipitare la pH 1-1,5 și temperatură 0-4°C, cu randamente de 78-82%, iar produsele au avut o puritate de 98-99,9%.
9. D-fenilglicina s-a obținut prin hidroliza N-acetil-D-fenilglicinei în prezență de acid clorhidric (raport molar 1:1,5), la reflux. Produsul s-a separat prin aducere la pH 5,6 și răcire. Purity D-fenilglicinei obținută a fost de 98-99%. Randamentele de obținere au fost de 70-82%.
10. Racemizarea L-fenilglicinei pentru a fi reintrodusă în proces s-a realizat în cataliză bazică, cu NaOH în raport molar 1:4, la reflux. Racemicul a precipitat prin acidulare la pH 5,6 și răcire. Purity obținută a fost de 92%, cu randamente de 88-98%.

8.2. Obținerea L-metioninei prin hidroliza enzimatică a N-acetil-D,L-metioninei

8.2.1. Date introductive

Metionina, $C_5H_{11}NO_2S$, este acidul α -amino- γ -metiltiobutanoic. A fost descoperită în anul 1922 de către Muller în hidrolizatele de cazeină iar în 1928 Barger și Cogne realizează sinteza metioninei folosindu-se de reacția Strecker. Metionina posedă un atom de carbon asimetric, deci există sub forma a doi enantiomeri. În natură există enantiomerul L, care are aceeași configurație cu L-gliceraldehida. După sistemul Cohn-Ingold-Prelog, L-metionina aparține seriei S.

L-metionina este o substanță incoloră, cristalină, stabilă în stare solidă și la temperatură obișnuită. La încălzire se topește cu descompunere (278-280°C). Metionina este solubilă în apă însă foarte puțin solubilă în alcool și în alți solvenți organici. Se dizolvă ușor în soluții slab acide sau alcaline, când pot avea însă modificări chimice și racemizări. Solubilitatea metioninei variază cu pH-ul, fiind minimă la pH izoelectric ($pH_i=5,75$) și depinde de tăria ionică a soluției. Datorită faptului că structura amfionică permite formarea unor legături cu apa, dizolvarea aminoacizilor are loc cu micșorare de volum.

Pentru metionină, valorile parametrilor care caracterizează activitatea optică sunt:

- rotația specifică, $[\alpha]_D^{25} = +23,4$ ($c=3g/l$ în HCl 1N)
- rotația moleculară $[\alpha_M]_{365}^{37} = -21,0$ ($0,1 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$ în apă).

Măsurarea rotației moleculare în timpul descompunerii N-acetil-L-metioninei la L-metionină, în prezența acilazei, poate servi la urmărirea reacției și la determinarea conversiei.

Metionina, ca toți aminoacizii, prezintă toate proprietățile chimice dictate de prezența în moleculă a grupărilor $-COOH$ și $-NH_2$.

L-metionina este un aminoacid esențial, indispensabil creșterii animalelor tinere și funcționării normale a organismului adult. Necesarul este de 2-13 g/zi (poate fi suplinită, în mare măsură de cisteină [372]).

În organism, metionina suferă reacții de dezaminare, transaminare și decarboxilare (în mod similar cu ceilalți aminoacizi). Îndeplinește funcția de transmetilare, putând ceda gruparea metil unor acceptori potriviți și transformându-se prin aceasta în homocisteină. Homocisteina se poate remetila, regenerând metionina, cu grupă metil cedată de colină sau betaină. În toate reacțiile metabolice, metionina participă sub forma derivatului S-adenozil-metionină, obținut din metionină și ATP. Acest compus sulfonium (R_3S^+) conține o grupare metil foarte reactivă care participă la diverse reacții de metilare: transformarea fosfatidilaminelor în fosfatidilcoline (lecitine), sinteza de creatinină, metilarea noradrenalinei la adrenalină, metilarea bazelor azotate din acizii nucleici (ADN, ARN). În sinteza proteinelor, metionina este întotdeauna primul aminoacid legat.

Participarea metioninei la sinteza hepatică a lecitinelor explică acțiunea lipotropă a acestui aminoacid și a proteinelor bogate în metionină. Este folosită la bolnavii hepatici, care nu pot consuma o dietă adecvată, ca și la cei sub influența unor agenți hepatotoxici. Dozele recomandate sunt de 1-4g/zi oral, fracționat [372].

Metionina este utilizată și ca antidot în intoxicația acută cu paracetamol, pentru evitarea afectării hepatice. Se administrează câte 2,5 g oral la fiecare 4 ore, începând din primele ore ale intoxicației.

Este contraindicată în bolile hepatice grave - hepatită severă, comă hepatică, encefalopatie portală și, în general, în stările de hiperamoniemie, situație în care poate agrava toxemia.

Aminoacizii proteinogeni au fost sintetizați întâi în scopul stabilirii sau confirmării structurii lor. Mai târziu, obținerea lor preparativă a devenit necesară pentru studii biologice, îmbunătățirea hranei animalelor, obținere de aromatizanți alimentari, medicamente, etc. Metionina se sintetizează prin următoarele metode [298]:

- a) Reacția dintre esterul malonic sodat și metil- β -cloroetilsulfură.
- b) Sinteza Strecker, care constă în tratarea aldehydelor cu acid cianhidric și amoniac, când se obține α -aminonitrilul, care este apoi hidrolizat la acid.
- c) Sinteza hidantoinică, după Bucherer, constă în transformarea aldehydei în cianhidrină care trece prin tratare cu carbonat de amoniu într-o hidantoină 5-substituită; aceasta prin hidroliză alcalină formează, cu randament mare, aminoacidul.

În urma acestor sinteze metionina se obține sub formă de racemic. Scindarea acestuia nu poate fi efectuată prin metode obișnuite, cu ajutorul bazelor și acizilor optic activi, deoarece aminoacizii sunt acizi, respectiv baze prea slabe pentru a forma săruri stabile, cristalizabile, cu acești compuși.

Metoda clasică pentru scindarea aminoacizilor racemici în enantiomeri constă în acilarea (de obicei formilarea) lor la gruparea amino (ceea ce mărește mult aciditatea) și formarea de săruri cu baze optic active la fel ca în cazul oricărui alt acid optic activ.

În ultimul timp se aplică din ce în ce mai mult metode biochimice de scindare, mai rapide decât metodele chimice. Una din ele constă în esterificarea D,L-aminoacidului și hidroliza esterului cu enzime ca papaina sau chimotripsina care atacă numai formele L.

L-metionina se poate obține și din L-metioninamidă prin hidroliză catalizată de enzima L- α -aminoacil-amidază.

Una din metodele enzimatică, aplicate cu succes în cazul metioninei, constă în acilarea (acetilare, cloroacetilare, trifluoroacetilare) racemicului, urmată de hidroliza enzimatică, catalizată de aminoacilază, când se obține un amestec format din L-metionină și N-acil-D-metionină. Etapele procesului sunt:

1. Acilarea D,L-metioninei

Drept acilderivat al metioninei, în general se folosește compusul acetilat care se obține ușor, este relativ ieftin și este ușor de hidrolizat în prezența aminoacilazei. N-acetil-D,L-metionina se obține în urma acetilării cu anhidridă acetică sau clorură de acetil.

2. Hidroliza enzimatică a N-acetil-D,L-metioninei

Are loc în prezența aminoacilazei și se obține L-metionina și N-acetil-D-metionina. În funcție de forma în care se găsește enzima (liberă sau imobilizată) din punct de vedere tehnologic procesul poate fi condus în mai multe variante (vezi studiul de literatură, Cap. 3).

3. Racemizarea N-acetil-D-metioninei

După separarea L-metioninei, N-acetil-D-metionina rămasă în soluția mamă se racemizează pentru a putea fi recirculată în proces. Racemizarea se poate realiza fie în cataliză acidă sau bazică (în mod similar cu toți aminoacizii, prezența grupei acetil în moleculă are drept efect creșterea vitezei de racemizare), fie prin simplă încălzire la 60°C, în prezența anhidridei acetice.

Cercetările din ultimii ani au scos la iveală o serie de microorganisme producătoare de N-acilaminoacid racemaze. Takahashi și colab. [373] au brevetat un procedeu de a obține eficient D- sau L-aminoacizi, utilizând hidroliza amestecului racemic a N-acil-derivaților, în prezența unei aminoacilaze D- sau L-optic selectivă, în combinație cu o N-acilaminoacid racemază. Procedul are avantajul că izomerul optic N-acilat rămas nehidrolizat nu mai trebuie separat ci este racemizat in situ. Tulpinile producătoare de racemază au fost *Streptomyces* (*coelestis*, *celluloflavus*, *alboflavus*, *aureocirculatus*, etc), *Actinomyces*

(roseoviolacea, aureomonopodiales), *Jensenia canicruria*, *Sebekia benihana*. Și Tokuzama [149,327] a selectat o tulpină de *Amycolatopsis* sp. TS-1-60, producătoare de N-acilaminoacid racemază, a cărei genă a clonat-o pe *E. coli*. În continuare cele două enzime, aminoacilaza și racemaza au fost imobilizate pe DEAE-Toyopearl și utilizate pentru producerea de aminoacizi optic puri.

Metionina se întrebuițează, în primul rând, ca adaus la hrana animalelor sau oamenilor, fiind aminoacid esențial, însă are și o utilizare tehnologică, fiind folosită în diverse industrii: farmaceutică, cosmetică, metalurgică, electrochimică.

Producția de metionină racemic în lume în 1980 a fost de 140000 tone. Deși numai forma L este biologic activă, în multe cazuri se folosește racemicul ca atare, renunțându-se la separarea izomerilor optici.

În ultimii ani, cercetările s-au îndreptat în sensul înlocuirii L-metioninei cu N-acetil-L-metionină, ușor hidrolizabilă sub acțiunea unei acilaze de proveniență animală, ca aditiv pentru hrana animalelor. Folosirea N-acetil-L-metioninei prezintă avantajul că poate fi introdusă în hrană în cantități mult mai mari (0,15-0,5%) decât L-metionina (0,05%), fără a altera proprietățile organoleptice.

În industria farmaceutică, S-adenozil-L-metionina se folosește la obținerea unui medicament cu rol în reducerea nivelului colesterolului.

În industria electrochimică, metionina se utilizează ca adaus la băile de acoperire electrolitică; se folosește la acoperirea suprafeței oțelurilor, reducând coeziunea acestora.

Cercetările efectuate în laborator și prezentate în această teză, au avut drept scop obținerea de L-metionină prin hidroliza N-acetil-D,L-metioninei, catalizată de aminoacilază (imobilizată pe diferite suporturi). Etapele principale au fost cele prezentate mai sus:

- acetilarea D,L-metioninei cu anhidridă acetică în mediu de acid acetic;
- hidroliza enzimatică a N-acetil-D,L-metioninei obținută în etapa anterioară, cu separarea și purificarea L-metioninei;
- racemizarea N-acetil-D-metioninei pentru reintroducerea în proces.

8.2.2. Acetilarea D,L-metioninei

Pentru obținerea N-acetil-D,L-metioninei s-a utilizat o rețetă a NI ICCF-București, la care s-au făcut unele modificări pentru a îmbunătăți randamentul.

Reactivii utilizați au fost:

- D,L-metionină, de puritate 99% (cal.I), respectiv 78,2% (cal.II) (de la Combinatul Petrochimic Pitești)
- anhidridă acetică p.a., 98% (de la Combinatul Chimic Ișalnița)
- acid acetic glacial 96% (de la Combinatul Chimic Ișalnița)
- acetat de etil p.a. (Chimopar București)
- cărbune animal pulvis (Chimopar București)

Mod de lucru: Într-un balon cu trei găuri, prevăzut cu agitare mecanică, termometru și refrigerent de reflux, s-au introdus 45 g D,L-metionină și 150 ml (175 g) acid acetic glacial. S-a agitat bine până când suspensia a devenit omogenă. S-a încălzit pe baie (s-au în cuib) până la 60°C, apoi s-au adăugat dintr-o dată 30 ml (32 g) anhidridă acetică. Temperatura s-a ridicat la 70-73°C și s-a agitat până ce toată metionina din suspensie a trecut în soluție. Timpul de acetilare a fost de 4-5 minute. S-a menținut temperatura în balon la 70°C timp de încă 15 minute, sub agitare. S-a răcit balonul la temperatura camerei. Amestecul de reacție obținut s-a concentrat prin evaporarea acidului acetic într-un evaporator rotativ la 65-70°C și 10 mm col.

Hg. Lichidul a căpătat o consistență vâscoasă și uneori chiar a cristalizat. S-a montat la balon refrigerentul de reflux și s-au introdus, sub agitare 100 ml acetat de etil. S-a încălzit la reflux până când s-a dizolvat complet N-acetilmetionina. A urmat răcirea la 0-4°C când a cristalizat N-acetilmetionina. Aceasta s-a filtrat la rece și cristalele s-au spălat pe filtru cu acetat de etil. Cristalele de N-acetil-D,L-metionină obținute au fost uscate la etuvă 4 ore la 50-55°C (N-acetilmetionina se descompune parțial peste 60°C, cu îngălbenire).

Purificarea N-acetil-D,L-metioninei s-a făcut prin dizolvare în acetat de etil (40 ml pentru 50 g acetilmetionină) la reflux și decolorarea cu cărbune activ. A urmat filtrarea la cald, răcire, cristalizare, filtrare și uscare în condițiile prezentate.

Produsele obținute au fost caracterizate prin punct de topire (microscop Boetius), spectru IR (spectrofotometru Specord 75 IR, Karl Zeis Jena), titrare potențimetrică cu NaOH 0,1N (pH-metru digital OP-208, biuretă automată OP-930 înregistrator potențimetric OH 8410, toate trei Radelkis Ungaria), cromatografie în strat subțire și reacția cu ninhidrină (metodele de analiză conform cap. 8.1.2).

S-au realizat mai multe sinteze dintre care sunt prezentate rezultatele pentru un număr de 14 sinteze.

Rezultate obținute

Din cele 14 sinteze prezentate, primele trei au fost realizate cu rețeta prezentată. Sintezele 4-6 s-au realizat cu rețeta multiplicată de 3 ori, sinteza 7 cu rețeta multiplicată de 6 ori, iar la sintezele 8-14 de 15,55 ori. La ultimele 7 sinteze recristalizarea acetilmetioninei s-a realizat fără decolorare cu cărbune activ.

Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 8.13.

Tabel 8.13. Acetilarea D,L-metioninei cu anhidridă acetică și acid acetic glacial

Nr. Sint.	N-acetil-D,L-metionină			Randam. %
	Cantitate g	Puritate %	Punct.topire °C	
1	43,3	99,0	110-113	85,0
2	50,2	99,8	111-112	88,2
3	45,0	99,3	110-112	86,8
4	110,02	100,0	112-113	95,4
5	103,08	100,0	112-113	88,4
6	107,95	100,0	112-113	93,7
7	270,9	100,0	112-113	89,0
8	642	85,13	111-115	76,5
9	718	87,18	109-113	75,5
10	778	83,99	110-114	81,8
11	726	85,55	110-117	76,3
12	626	84,60	108-112	65,8
13	930	83,17	109-113	97,8
14	620	82,15	108-113	65,2

În toate cele 14 sinteze s-a lucrat cu metionină de puritate 99%. În sintezele la care s-a făcut purificarea și cu cărbune activ s-au obținut produse cu puritate foarte înaltă, peste 99% (sintezele 1-7), iar randamentele de reacție au variat în domeniul 85-93%. În ultimele 7 sinteze, nemaifăcându-se purificarea cu cărbune activ, puritatea este mai scăzută, 82-87%. Și randamentele mici (65-85%) denotă că acetilarea a fost incompletă. În produse s-a identificat

metionina prin cromatografie în strat subțire și reacția cu ninhidrină. În cazurile în care se lucrează cu cantități mari probabil că trebuie prelungit timpul de acetilare. Sau mai probabil, datorită timpului lung de refluxare cu acetatul de etil (necesar, de fapt pentru a atinge temperatura de refluxare în condițiile de laborator) s-a produs o dezacetilare parțială.

Alte două sinteze au fost realizate cu metionină de puritate 78,2%. S-au obținut produse acetilate cu puritate de 98,5% și cu randament de 98,5%, dar în aceste două cazuri s-a realizat și purificarea cu cărbune activ.

S-a încercat și o recuperare a N-acetil-D,L-metioninei din filtratele de acetat de etil prin evaporarea acestora, dar s-a obținut o pastă vâscoasă din care foarte greu a cristalizat acetilmetionina, și cu randamente foarte mici.

8.2.3. Hidroliza N-acetil-D,L-metioninei cu aminoacilază imobilizată [342,346,350,352]

S-a utilizat procedeul în coloană cu aminoacilază imobilizată pe diferite suporturi.

Reactivii utilizați au fost:

- soluție N-acetil-D,L-metionină, 0,2M, pH=7,0, cu 5×10^{-4} M CoCl_2 . N-acetil-D,L-metionina a fost obținută în laborator prin metoda prezentată anterior.
- aminoacilază imobilizată pe diferite suporturi - obținută în laborator (Cap. 6)
- soluții aminoacilază de diferite activități - obținute în laborator (Cap. 5)

Mod de lucru: Coloanele au fost umplute cu aminoacilaza imobilizată utilizând procedura prezentată la obținerea D-fenilglicinei (Cap. 8.1). Din rezervorul termostatat, soluția de N-acetil-D,L-metionină s-a trecut cu ajutorul pompei dozatoare, la anumite debite de alimentare, peste coloana umplută cu aminoacilaza imobilizată. La ieșirea din coloană s-au cules fracții de 25 ml, care s-au analizat pentru determinarea concentrației de L-metionină (metoda cu ninhidrină și polarimetrică).

Calculul coloanei

Conversia, activitatea coloanei, capacitatea coloanei, viteza spațială, timpul de înjumătățire s-au calculat cu formule prezentate la hidroliza enzimatică a N-acetil-D,L-fenilglicinei în Cap. 8.1.3.

8.2.3.1. Hidroliza N-acetil-D,L-metioninei cu aminoacilază imobilizată pe DEAE-Sephadex A-50

S-a utilizat o coloană de sticlă cu dimensiunile 2,5x100 cm. Catalizatorul, suspendat pe inele de sticlă, a avut inițial un volum util de 275 ml. La studiile de influență a debitului asupra conversiei, volumul de catalizator s-a modificat, datorită compactării. Același fenomen de compactare apare și în cazul exploatării îndelungate a coloanei. S-au făcut testări de schimbare a fluxului de soluție (de jos în sus) dar nu s-au obținut rezultate semnificative.

S-au studiat influența debitului, a temperaturii, a concentrației substratului și a concentrației de CoCl_2 asupra conversiei.

Rezultate obținute

A. Influența debitului de alimentare asupra conversiei

Coloana a fost exploatată la debite variind între 25-160 ml/h. Concentrația N-acetil-D,L-metioninei a fost de 0,2M cu 5×10^{-4} M CoCl_2 , pH=7,0. Temperatura a fost de 40°C. Enzima imobilizată a avut diferite activități. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 8.14.

Tabel 8.14. Influența debitului de alimentare asupra conversiei N-acetil-D,L-metioninei în cataliza aminoacilazei imobilizată pe DEAE-Sephadex A-50

Debit ml/h	Vit.spaț. VS	Conc.L-Met M	Activ.col. U/g	Vol.umplut. ml	Timp funcț. Ore	Capacit.col U/g	Conversie %
25	0,10	0,071			180	0,095	71,0
45	0,18	0,036	0,096	245	200	0,087	36,0
60	0,24	0,028			116	0,090	28,0
45	0,16	0,086			267	0,180	86,0
60	0,22	0,088	0,247	275	243	0,247	88,4
80	0,29	0,080			291	0,298	79,8
60	0,31	0,090			316	0,263	89,8
80	0,37	0,090	0,517	215	297	0,340	89,5
120	0,65	0,073			340	0,429	73,2
60	0,21	0,091			611	0,292	90,8
100	0,35	0,057	0,394	285	512	0,304	56,8
120	0,42	0,047			534	0,302	47,0
140	0,40	0,043			582	0,317	43,2

Din datele prezentate în tabel se observă că, la o anumită activitate enzimatică a coloanei, conversia scade o dată cu creșterea debitului de alimentare. Acest lucru este valabil în cazul în care coloana este exploatată la capacitatea ei maximă. O dată cu creșterea activității enzimatice a coloanei se observă o creștere a conversiei pentru aceeași valoare a debitului de alimentare. O dată cu scăderea în activitate este necesară micșorarea debitului de alimentare pentru menținerea nivelului de conversie impus.

B. Influența temperaturii asupra conversiei

S-a utilizat o coloană cu o activitate de 0,487 U/ml, la un debit de 80 ml/h. Temperatura s-a variat între 30 și 65°C. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 8.15.

Tabel 8.15. Influența temperaturii asupra conversiei N-acetil-D,L-metioninei în cataliza aminoacilazei imobilizată pe DEAE-Sephadex A-50

Temperatură °C	Conversie %	Capacitate, K _c U/ml
30	49,0	0,395
40	68,3	0,541
45	70,7	0,581
50	67,9	0,521
55	72,9	0,601
60	76,1	0,613
65	71,9	0,594

Așa cum era de așteptat, viteza de reacție, respectiv conversia, ca și capacitatea coloanei cresc o dată cu creșterea temperaturii. La temperatură peste 50°C, creșterea conversiei nu mai este semnificativă, iar peste 60°C enzima începe să se denatureze, scăzând activitatea și conversia.

C. Influența concentrației substratului asupra conversiei

S-a utilizat o coloană cu enzimă cu activitate de 0,517 U/ml, la două concentrații de N-acetil-D,L-metionină 0,2M și 0,4M, pH=7,0 și cu 5x10⁻⁴M CoCl₂. Temperatura de exploatare a fost de 40°C. Debitul de alimentare au fost între 40 și 120 ml/h. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 8.16.

Tabel 8.16. Influența concentrației substratului asupra conversiei N-acetil-D,L-metioninei în cataliza aminoacilazei imobilizată pe DEAE-Sephadex A-50

Concentrație M	Debit ml/h	Vit.spaț. VS	Timp funcț. ore	Conversie %	Capacit.col. U/g
0,2	60	0,31	316	89,8	0,263
	80	0,37	297	89,5	0,349
	120	0,65	340	73,2	0,429
0,4	60	0,34	364	78,9	0,462
	60	0,39	418	47,4	0,277
	40	0,26	437	58,0	0,226

Se observă că la același debit de alimentare (60ml/h) conversia scade cu 10% odată cu dublarea concentrației substratului. Scăderea este și mai dramatică în timp. Dacă în cazul concentrației substratului de 0,2 M, măbind și debitul de alimentare, conversia scade cu 16%, în cazul concentrației substratului de 0,4 M conversia scade cu 20%, menținând debitul constant, ba chiar scăzându-l. Se poate trage concluzia că la concentrații de substrat mai mari de 0,2 M, coloana își pierde rapid activitatea, probabil prin spălarea enzimei de pe suportul de imobilizare.

D. Influența concentrației ionului Co^{2+} asupra conversiei

În cercetările privind caracterizarea aminoacilazei microbiene obținute în laborator s-a demonstrat rolul activator al ionilor de Co^{2+} în concentrații de până la 0,2 mM asupra activității enzimei. Prezența sa, însă, în substrat, în concentrații mari este nedorită, deoarece cobaltul se regăsește în produsul de reacție, căruia îi imprimă toxicitate, impunându-se astfel operația de recristalizare. Pornind de la aceste considerente s-a realizat un test în care $CoCl_2$ nu a mai fost utilizat în soluția de substrat. Coloana a fost exploatată la parametri optimi stabiliți, dar fără cobalt în soluția de N-acetil-D,L-metionină. Un al doilea test s-a realizat cu o concentrație de $CoCl_2$ de 5×10^{-5} M, deci de 10 ori mai mică decât în testele realizate până acum. Debitul de alimentare au fost de 80-100 ml/oră, temperatura $50^\circ C$. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 8.17.

Tabel 8.17. Influența concentrației de $CoCl_2$ asupra activității coloanei

Timp Ore	Conc. $Co^{2+} = 0$		Conc. $Co^{2+} = 5 \times 10^{-5}$ M			Conc. $Co^{2+} = 5 \times 10^{-4}$ M		
	Conv., X %	Capac. K_c U/ml	Timp ore	Conv., X %	Capac. K_c U/ml	Timp ore	Conv., X %	Capac. K_c U/ml
6	94,0	0,73	5	91,2	0,89	54	67,9	0,52
28	90,8	0,70	50	93,2	0,91	247	78,4	0,62
92	100,0	0,83	96	92,3	0,89	268	72,7	0,55
162	84,7	0,86	146	91,2	0,89	320	81,2	0,63
184	86,5	0,84	170	89,5	0,88	370	83,5	0,65
207	85,2	0,83	194	87,5	0,87	400	84,6	0,65
258	80,2	0,81	218	86,4	0,83	700	75,0	0,63
283	74,7	0,74	240	84,3	0,79	737	71,0	0,56
306	70,0	0,68				766	64,0	0,54
330	66,0	0,63				801	59,6	0,48
352	65,5	0,63				829	66,3	0,51
						855	60,7	0,49
						877	56,2	0,46
						899	55,8	0,46
						922	55,4	0,47
						976	54,5	0,47

Este interesant de remarcat că în toate cele trei cazuri a fost necesar un timp inițial de funcționare pentru ca să se stabilizeze coloana. Probabil enzima imobilizată s-a așezat mai uniform în coloană, îndepărtându-se canalele preferențiale de curgere care duc la scăderea capacității coloanei. Activitatea enzimatică crește o perioadă de timp pentru ca apoi să aibă o perioadă optimă de funcționare, urmată de scăderea activității enzimaticе o dată cu prelungirea timpului de funcționare la același debit de alimentare.

Reprezentând grafic capacitatea coloanei funcție de timp (Figura 8.10) s-a putut determina timpul de înjumătățire pentru cele trei teste realizate. În cazul concentrației de CoCl_2 de $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, după 30 de zile de funcționare continuă capacitatea coloanei a scăzut la 72% din capacitatea inițială. Timpul de înjumătățire este de 47 zile față de 60 zile prezentat în literatură [166].

În cazul unei concentrații de CoCl_2 de 10 ori mai mică, capacitatea coloanei scade la 86% după 10 zile de funcționare continuă, timpul de înjumătățire fiind de 20,4 zile.

În cazul unei concentrații zero de CoCl_2 , la început coloana a funcționat bine, probabil datorită cobaltului adsorbit pe coloană de la testele anterioare. Apoi conversia și capacitatea coloanei scad destul de repede, ajungând la 85% din capacitatea inițială după 14,6 zile de funcționare continuă, timpul de înjumătățire fiind de 17,1 zile. Datorită scăderii rapide a activității enzimei imobilizate la exploatarea coloanei fără cobalt, deși produsul obținut a avut o puritate de 100%, exploatarea coloanei în aceste condiții nu este economică.

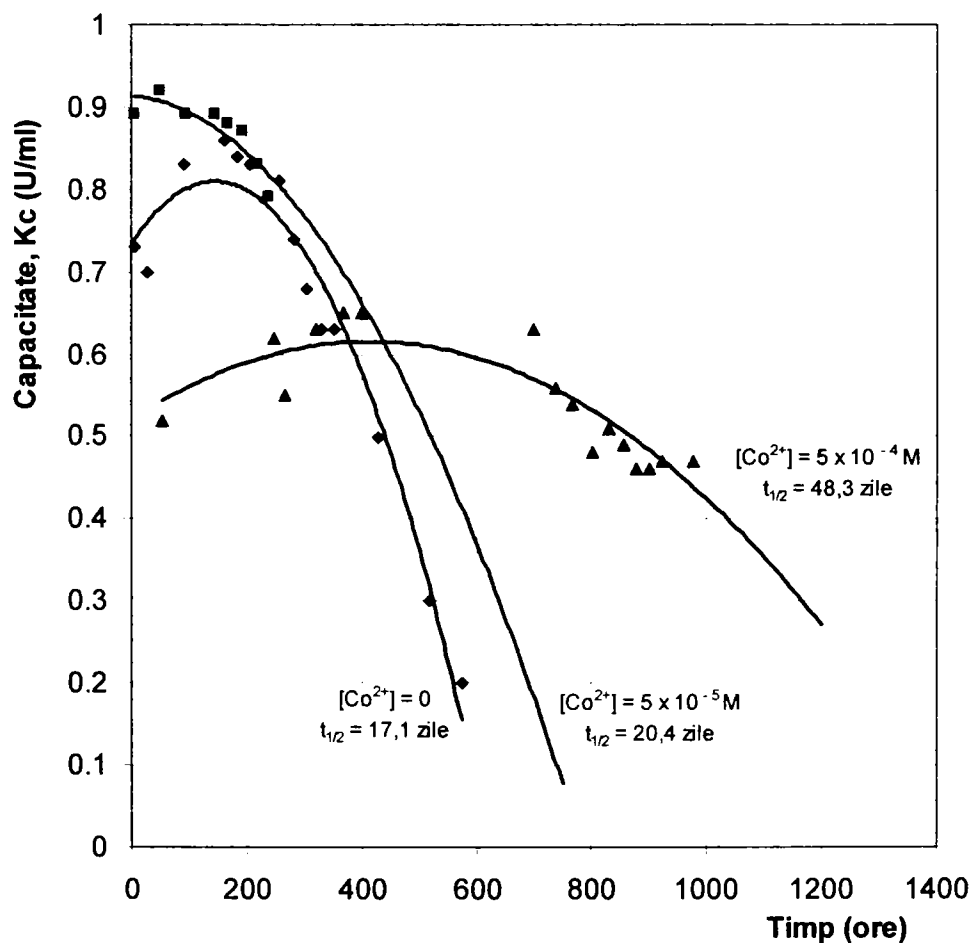


Figura 8.10. Variația capacității coloanei în timp pentru diferite concentrații de Co^{2+}

8.2.3.2. Regenerarea pe coloană a enzimei imobilizate

Pentru a asigura exploatarea coloanei la capacitatea ei maximă a fost necesară regenerarea periodică a catalizatorului. Aceasta s-a realizat direct pe coloană și a cuprins următoarele etape:

- Spălarea coloanei cu tampon fosfat 0,1M, pH = 7,0, cu un debit de 60 ml/h până la eluarea completă a metioninei și a acetilmetioninei de pe coloană.
- Regenerarea propriu-zisă s-a realizat prin trecerea pe coloană a unei soluții de aminoacilază. După introducerea întregii cantități de enzimă în coloană, aceasta s-a menținut 45 ore la 4°C pentru definitivarea procesului de imobilizare.
- Eluarea soluției enzimatice reziduale de pe coloană s-a realizat prin spălare cu tampon fosfat 0,1M, pH = 7,0 până când în eluat nu au mai fost detectate proteine.
- Pentru determinarea capacității coloanei regenerate s-a trecut pe coloană o soluție de N-acetil-D,L-metionină 0,2 M, pH = 7,0 cu 5×10^{-4} M CoCl_2 , la temperatura de 50°C și cu un debit de 80 ml/h.

Rezultatele obținute la regenerarea coloanei sunt prezentate în Tabelul 8.18.

Tabel 8.18. Regenerarea coloanei cu DEAE-Sephadex A 50-aminoacilază

Aminoacilaza	Volum ml	Proteine mg/ml	Activitate U/ml
soluție de regenerare	118	1,92	1,174
enzimă imob. inițială	155	-	0,470
enzimă imob. regenerată	155	-	0,822
tampon spălare	300	0,054	-

Randamentul de fixare al proteinei pe suport a fost de 93%, iar randamentul de imobilizare a aminoacilazei de 39,6% și care este foarte apropiat de cel indicat în literatură (42%) și mai bun decât cel obținut la regenerarea prin procedeul în baie (20%). Capacitatea coloanei a crescut de 1,75 ori.

8.2.4. Hidroliza N-acetil-D,L-metioninei cu aminoacilază imobilizată pe DEAE-Filtradex R-50

În experimentele efectuate în laborator s-a încercat înlocuirea DEAE-Sephadexului A-50 - aminoacilază cu un altul de proveniență românească, DEAE-Filtradex R-50 - aminoacilază (obținut în laborator) pentru obținerea L-metioninei.

S-au efectuat două experimente, cu cantități diferite de enzimă imobilizată și condiții diferite de lucru.

Experiment 1:

Dimensiuni coloană: 2,5 x 60 cm.

Soluția de N-acetil-D,L-metionină: 0,2 M, pH = 7,0, cu 5×10^{-4} M CoCl_2

Debit de alimentare: 60 ml/h

Temperatura: 50°C

Experiment 2:

Dimensiuni coloană: 8 x 38 cm.

Soluția de N-acetil-D,L-metionină: 0,2 M, pH = 7,0, cu 1×10^{-4} M CoCl_2

Debit de alimentare: 500 ml/h

Temperatura: 50°C

În ambele cazuri enzima imobilizată a fost suportată pe inele de sticlă 5 x 5 mm. Modul de exploatare al coloanelor a fost cel indicat pentru enzima imobilizată pe DEAE-Sephadex A-50.

Rezultate obținute

S-a urmărit conversia și capacitatea coloanelor la funcționare continuă timp de 70, respectiv 240 ore. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 8.19.

Tabel 8.19. Hidroliza N-acetil-D,L-metioninei cu aminoacilază immobilizată pe DEAE- Filtradex R-50

Experiment 1			Experiment 2		
Timp Ore	Conversie, X %	Capacitate, K _c U/ml	Timp ore	Conversie, X %	Capacitate, K _c U/ml
9	68,47	0,404	5	91,25	0,886
24	78,67	0,347	50	93,20	0,913
32	86,00	0,395	96	92,30	0,892
40	84,50	0,381	146	91,20	0,894
45	86,90	0,379	170	89,50	0,877
54	85,90	0,354	194	87,50	0,870
63	85,90	0,389	218	86,40	0,833
70	84,44	0,387	240	84,30	0,788

În ambele experimente s-au obținut rezultate foarte asemănătoare. Deși timpul de exploatare a fost mult mai lung, s-a confirmat timpul de înjumătățire al capacității coloanei de 46 - 47 zile, extrem de apropiat de cel obținut la exploatarea aminoacilazei immobilizată pe DEAE-Sephadex A-50. După 240 de ore de funcționare continuă, conversia nu a scăzut sub 84%. Coeficienții de dezactivare au avut valorile $6,26 \times 10^{-4} \text{ ore}^{-1}$, respectiv $4,88 \times 10^{-4} \text{ ore}^{-1}$.

8.2.5. Hidroliza N-acetil-D,L-metioninei cu aminoacilază immobilizată pe Ponilex AS-57 [344]

După cum s-a prezentat la Cap.6, Ponilex AS-57 este un schimbător de ioni furnizat tot de Institutul Petru Poni, Iași. S-a testat și aminoacilaza immobilizată pe acest suport, în condițiile exploatării pe coloană.

Reactivii utilizați au fost:

- Soluție N-acetil-D,L-metionină: 0,2M, pH = 7,0, cu $5 \times 10^{-4} \text{ M CoCl}_2$
- Aminoacilază immobilizată pe Ponilex AS-57, cu o activitate totală de 43,7 U (obținută în laborator)

S-a lucrat cu o coloană cu dimensiunile: 2,5 x 60 cm

Mod de lucru: Este cel prezentat în cazurile anterioare. Temperatura a fost 40°C, debitul de alimentare de 60 ml/h.

Rezultate obținute

După 5 ore de funcționare continuă s-a obținut o conversie de aproximativ 15% la o capacitate a coloanei, $K_c = 0,12 \text{ U/g}$ gel umed. Rezultatele mult mai slabe obținute în acest caz au dus la abandonarea studiului cu aminoacilaza immobilizată pe Ponilex AS-57.

8.2.6. Separarea și purificarea L-metioninei din hidrolizatul enzimatic

Soluția rezultată la hidroliza enzimatică conține L-metionină, N-acetil-D-metionină, N-acetil-D,L-metionină, N-acetil-L-metionină. Separarea L-metioninei din acest amestec se bazează pe diferența dintre solubilitățile L-metioninei la 100°C (0,72 moli/l) și 0°C (0,18 moli/l) în apă și solubilitatea N-acetilmetioninei în aceleași condiții. Ținând cont de solubilități, L-metionina se poate separa cu un randament de 75% la 0°C. Cantitatea de L-metionină rămasă în soluție după cristalizare s-ar putea separa pe o coloană de schimbători de ioni Vionit CS-3.

Mod de lucru: Soluția rezultată la hidroliza enzimatică s-a concentrat într-un evaporator rotativ (presiune 5-10 mm Hg, temperatura 60-70°C) până la un volum final de 5-10% din volumul inițial. Soluția obținută s-a răcit la 5-10°C când a cristalizat L-metionina. Suspensia s-a filtrat la aceeași temperatură iar cristalele separate s-au uscat la etuvă la 70-80°C.

L-metionina cu puritate mai scăzută (70-85%) s-a recristalizat din apă. Cristalele impure s-au dizolvat în apă la 100°C, soluția s-a filtrat. Filtratul s-a răcit la 0°C, când a cristalizat L-metionina. S-a filtrat la rece iar cristalele separate s-au uscat la etuvă la 70-80°C.

L-metionina obținută s-a caracterizat prin punct de topire, spectru IR, polarimetrie, iar puritatea produsului s-a determinat prin titrare potențiomtrică, reacția cu ninhidrină, cromatografie în strat subțire.

Rezultate obținute

S-au realizat mai multe separări și purificări. În toate cazurile soluțiile inițiale au fost concentrate la 5-10% din volumul inițial. După cum se vede din rezultatele prezentate în Tabelul 8.20 pe acest domeniu gradul de concentrare nu a influențat puritatea produsului și randamentul de separare.

Probele obținute au topit toate la aproximativ 260°C, cu descompunere.

Tabel 8.20. Caracterizarea L-metioninei separată din hidrolizatul enzimatic

Nr. crt.	Puritate %	$[\alpha]_D^{25}$ grade	Randament %
1	83,50	+13,5	96,67
2	96,0	+20,5	99,85
3	97,0	+23,5	94,23
4	98,0	+21,5	98,00
5	97,0	+23,5	94,23
6	98,0	+21,5	98,50
7	96,0	+20,5	98,80
8	98,0	+21,5	93,90
9	98,0	+21,5	93,92
10	99,5	+23,5	94,40
11	99,5	+23,5	94,27
12	100,0	+25,0	73,80
13	100,0	+25,5	81,03
14	100,0	+25,5	61,60
15	100,0	+27,0	60,60

Experimentele 1-9 s-au realizat fără recristalizare, totuși puritățile obținute sunt foarte bune (97-98%), cu randamente de separare de 93-98%. Experimentele 10-15 s-au realizat și cu recristalizare din apă a L-metioninei. După cum se observă produsele obținute au purități de aproape 100%, în schimb randamentele de purificare au scăzut foarte mult, chiar până la 60%.

8.2.7. Racemizarea N-acetil-D-metioninei și separarea racemicului

Soluțiile rămase după separarea L-metioninei au conținut N-acetil-D-metionină și L-metionină neseparată. Pentru racemizare s-a utilizat metoda în cataliză acidă, adoptând un mod de lucru care a permis racemizarea și acetilarea metioninei în același timp.

Reactivii utilizați au fost:

- Soluție rămasă după separarea L-metioninei
- Anhidridă acetică p.a. (Combinatul Chimic Ișalnița)
- Acid sulfuric 50% (preparat din acid sulfuric 98% - Chimopar București)
- Acetat de etil p.a. (Chimopar București)

Mod de lucru: Soluția rămasă după separarea L-metioninei s-a analizat determinându-se conținutul în acetilmetionină (titrare potențiomtrică) și metionină (cu ninhidrină). Soluția s-a introdus într-un balon cu două găuri, prevăzut cu agitare mecanică și termometru. S-a încălzit la 40°C, apoi s-a adăugat anhidrida acetică, (în raport molar 1:1 cu acetilmetionina și metionina din soluție) în porțiuni, sub agitare. S-a ridicat temperatura la 85°C și s-a menținut o oră, cu agitare. S-a răcit și s-a acidulat cu acid sulfuric 50% până la un pH final de 2,2-2,5. Soluția obținută s-a evaporat la sec într-un rotavapor (presiune 20-30 mmHg, temperatură 60-70°C). Reziduul s-a extras la cald cu acetat de etil în porțiuni (raport cantitativ 1:4). Extractul s-a filtrat pentru îndepărtarea sulfatului de sodiu nedizolvat. Filtratul s-a răcit la 0°C când a cristalizat N-acetil-D,L-metionina, care s-a filtrat la rece și s-a uscat în etuvă la 50-60°C.

Produsele obținute s-au caracterizat prin punct de topire, spectru IR, rotație specifică, puritate prin titrare potențiomtrică.

Rezultate obținute

S-au realizat inițial o serie de testări pentru a vedea dacă nu se poate lucra la temperaturi mai joase de 85°C. Ca urmare amestecul de reacție s-a încălzit la 37°C, timp de 5 ore. Restul procedurii a fost identic. Randamentele de separare au fost foarte mici, sub 20%, așa că celelalte teste s-au realizat în condițiile date inițial. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 8.21.

Tabel 8.21. Racemizarea N-acetil-D-metioninei

		Caracterizare produs				
Conc.Ac.Met M	Conc.Met M	Punct.top. °C	$[\alpha]_D^{25}$ grade	Purit. %	Rand.racem. %	Rand.separ. %
1,182	0,230	110-112	+2,0	99,80	91,20	57,75
1,565	0,087	112-113	+1,0	99,90	96,02	83,60
1,224	0,027	111-112	+1,0	99,99	96,12	65,00
2,067	0,122	111-113	+1,2	99,80	94,20	67,35

AcMet N acetilmetionină

Racemizarea se realizează cu randamente mari (91-96%) iar produsele obținute au puritate aproape 100%. În schimb randamentele de separare sunt mult mai scăzute (57-84%). Probabil cantitatea de acid sulfuric adăugată a fost insuficientă și o parte din acetilmetionină a rămas sub formă de sare de sodiu care nu cristalizează din acetat de etil. Sau poate nu a fost eliminat total acidul acetic din sistem la evaporare, iar acetilmetionina este foarte solubilă în acid acetic.

8.2.8. Concluzii

În urma cercetărilor efectuate pentru obținerea L-metioninei din amestecul racemic, utilizând metoda enzimatică cu aminoacilază I, se pot trage următoarele concluzii:

1. Metoda enzimatică adoptată a fost hidroliza stereospecifică a N-acetil-L-metioninei în cataliza enzimei aminoacilază microbială, imobilizată pe diferite suporturi.
2. Acetilarea D,L-metioninei s-a realizat cu anhidridă acetică în prezență de acid acetic. S-au obținut produse cu puritate înaltă (99%) dacă s-a introdus și o fază de purificare cu cărbune activ. Randamentele de reacție au fost de 85-93%. Dacă s-a lucrat cu cantități mari, randamentele au fost mai scăzute, procesul necesitând un timp mai lung pentru faza de acetilare.
3. Hidroliza enzimatică s-a realizat utilizând aminoacilaza imobilizată pe DEAE-Sephadex A-50 și DEAE-Filtradex R-50, sistemul în coloană. Capacitatea enzimatică a sistemului utilizat a scăzut în timp la utilizarea continuă.
4. Conversia N-acetil-L-metioninei la L-metionină depinde de debitul de trecere al soluției de substrat prin coloană. Pentru a menține conversia dorită, debitul trebuie scăzut odată cu scăderea capacității enzimatică a coloanei.
5. Temperatura optimă de operare este de 50°C, iar pH-ul 7,0.
6. Concentrația optimă de substrat este 0,2M. Valori peste 0,2M duc la spălarea enzimei de pe coloană în timpul exploatării.
7. Concentrația optimă de CoCl_2 , utilizat pentru activarea aminoacilazei, este de 5×10^{-4} M. Scăderea sub această valoare duce la scăderea drastică a timpului de înjumătățire al capacității coloanei.
8. Timpii de înjumătățire ai capacității enzimatică a coloanelor au fost de 47-48 zile pentru ambele tipuri de geluri studiate, pentru conversii scăzând de la 95% la 55%, la menținerea unui debit constant de exploatare.
9. Regenerarea capacității coloanei de DEAE-Sephadex A-50-aminoacilază s-a realizat direct pe coloană, prin trecerea unei soluții de aminoacilază. Randamentul de imobilizare obținut a fost de 40%, capacitatea coloanei crescând de 1,75 ori.
10. Hidroliza N-acetil-L-metioninei cu enzima imobilizată pe Ponilex AS-57 s-a realizat cu o conversie inițială de 15%, total nesatisfăcătoare pentru un proces tehnologic.
11. Separarea L-metioninei din hidrolizatul enzimatic s-a realizat prin concentrare în vid și răcire, cu randamente de 93-98%. Puritya preparatelor obținute a fost de 96-98%.
12. Purificarea L-metioninei prin recristalizare din apă a dus la produse foarte pure (99,5-100%), dar cu randamente mult mai mici (60-94%).
13. Racemizarea N-acetil-D-metioninei s-a realizat în cataliză acidă, cu acetilarea, în același timp, a urmelor de metionină. S-a obținut un racemic acetilat de puritate ridicată (99,8%), cu randamente de racemizare de 90-96% și de separare de 57-63%.

Concluzii generale

1. Aminoacilazele sunt biocatalizatori care și-au găsit de aproape 40 de ani aplicații industriale pentru separarea racemicurilor de aminoacizi, prin hidroliza stereoselectivă a N-acil-D,L-aminoacizilor. Cel mai intens studiată, și ca atare aplicată, este L-aminoacilaza I, care s-a dovedit a avea o largă specificitate nu numai pentru majoritatea aminoacizilor proteinogeni, dar și pentru o serie întregă de alți acilaminoacizi. Au fost descoperite și D-aminoacilaze, astfel încât aria de utilizare se extinde și pentru separarea directă a D-aminoacizilor, fapt extrem de important pentru obținerea unor intermediari utilizați în sinteza de medicamente cum ar fi antibioticele de semisinteză. L-aminoacilazele catalizează nu numai hidroliza N-acil-L-aminoacizilor ci și reacția de sinteză a acestora, hidroliza dipeptidelor, a esterilor, transesterificarea și transacilarea. Diversitatea funcțională se corelează cu sursa producătoare, enzima fiind sintetizată de la bacterii până la om. Izolarea și caracterizarea acestor enzime s-a realizat atât din surse microbiene cât și animale, scopul fiind de a elucida rolul acestora în organisme, dar mai ales pentru a obține preparate cu utilizare industrială la un preț de cost cât mai scăzut. Faptul că aminoacilaza se comportă foarte bine la imobilizare a scăzut și mai mult costul utilizării ei la scară mare.

2. S-a studiat prezența aminoacilazei în țesuturi animale (rinichi, inimă, plămân, ficat) la șoarece și la porc. Enzima are o activitate mare în rinichi, și mai scăzută în ficat și inimă. În plămân, activitatea este mult mai scăzută la porc și nedetectabilă la șoarece. Rezultatele sunt asemănătoare cu cele prezentate în literatură.

3. Dintre tulpinile de fungi testate, doar cea de *Aspergillus oryzae*, furnizată de Institutul Cantacuzino București, a prezentat activitate aminoacilazică. Biosinteza enzimei a fost studiată atât pe medii solide cât și în culturi submerse. Au fost optimizate procedura de obținere a inoculului, mediile de cultură, atât solide cât și submerse. Enzima este indusă de L-metionină. Cultura pe mediu solid, în prezența inductorului, a dus la obținerea unor cantități de proteine mult mai mari (2 mg/ml extract brut, față de 0,3 mg/ml filtrat al mediului submers), dar activitatea specifică aminoacilazică a fost aproximativ aceeași (1,2 U/mg) cu cea obținută în culturile submerse în bioreactor. În absența inductorului, culturile de suprafață au dus la obținerea unor activități specifice acilazice mult mai mici (0,05 N 0,07 U/mg). Ambele medii de cultură alese au constatat din componente naturale ieftine, tărațe de grâu și coji de orez în cazul mediului solid și tărațe de grâu și făină de fasole pentru cel submers, fără adaos de alte săruri minerale. Aceste valori ale activității acilazice sunt comparabile cu cele raportate în literatură pentru tipuri de culturi și microorganisme (fungi) similare. Este, de fapt, dificil să se facă o comparație a rezultatelor obținute, de vreme ce determinările de activitate enzimatică nu s-au realizat în condiții identice, mai ales în ceea ce privește substratul reacției.

4. Având în vedere că scopul cercetării a fost, de fapt, obținerea unei aminoacilaze imobilizate cât mai ieftine, nu s-a realizat o purificare prea avansată a enzimei. Extractele din culturile de *Aspergillus oryzae* pe mediu solid, s-au filtratele mediilor submerse au fost precipitate fracționat cu sulfat de amoniu, fracția cea mai activă fiind 50-70% saturație. Deoarece s-a urmărit aplicarea la scară pilot a procesului, s-a testat și utilizarea unui preparat tehnic de sulfat de amoniu, obținându-se rezultate similare cu cele obținute în cazul preparatului p.a. Pentru a simplifica procesul, preparatele aminoacilazice care au fost utilizate în continuare pentru imobilizare s-au obținut prin precipitare masivă, direct cu 70% saturație în sulfat de amoniu tehnic. S-au obținut preparate cu aceeași activitate specifică (0,55 U/mg), mai mare decât cea raportată în literatură (0,33 U/mg) pentru condiții similare de operare. Randamentul de recuperare al enzimei este, de asemenea, foarte bun, de 89%, iar enzima, comparativ cu extractul brut, a fost purificată de 10 ori.

Precipitarea fracționată cu acetonă a dus la rezultate mult mai slabe, o activitate specifică de 0,18 U/mg, iar factorul de purificare a fost doar de 3. În plus, precipitarea cu solvenți organici implică manipularea unor volume mari, ca și un preț de cost mai ridicat.

La precipitarea fracției 0-70% sulfat de amoniu cu 60% acetonă nu s-a obținut o purificare a aminoacilazei, singurul avantaj fiind că preparatul umed obținut a fost uscat mai rapid la temperatura camerei, comparativ cu precipitatul obținut cu sulfatul de amoniu.

5. Desalefierea preparatului obținut la precipitarea cu sulfat de amoniu, realizată prin dializă, pe lângă că duce la pierderea totală a activității catalitice (datorită pierderii ionului de zinc din structură), dar a necesitat și volume mari de apă și un timp de 60 N 70 ore pentru îndepărtarea totală a sulfatului. Desalefierea prin cromatografie de excluziune sterică s-a realizat pe două tipuri de gel, Sephadex și produsul similar românesc, produs de Institutul Petru Poni Iași, Filtradex. Atât Sephadexul G-25 cât și Filtradexul R-25, tip coarse ambele, nu au dus la o separare netă a enzimei de sulfatul de amoniu. Această separare a fost obținută la utilizarea unor geluri tip G-50 (respectiv R-50) fine. Debitul de eluent utilizat în procesul de cromatografiere influențează procesul de separare; în cazul coloanei utilizate, la un debit peste 1,0 ml/min, proteina nu a mai fost separată net de sulfat. Rezultatele obținute au dus la aplicarea la scară pilot a procesului de desalefiere, când s-a utilizat produsul românesc Filtradex R-50. S-a obținut un randament de recuperare al enzimei extrem de bun, de 96%, la un factor de purificare de 9,44, foarte asemănător cu cel prezentat în literatură. S-au obținut preparate cu activitate specifică de aproximativ 0,73 U/mg. Marele avantaj al acestei metode de desalefiere este timpul scurt necesar procesului (în jur de 8 ore pentru 1,67 litri soluție enzimatică aplicată pe coloană).

6. O purificare mai avansată a preparatelor aminoacilazice s-a realizat prin cromatografie de excluziune sterică pe geluri Sephadex G-100, respectiv pe produsul similar românesc Filtradex R-100. S-a testat desalefierea și purificarea în același timp, pe coloane aplicându-se fracții de precipitare cu 70% saturație sulfat de amoniu. În acest caz, preparatul românesc a dus la rezultate mult mai slabe, randamentul de recuperare fiind de 47,7% și un factor de purificare maxim de 3,23. În schimb, la cromatografierea pe Sephadex G-100, nu numai că s-a obținut un factor maxim de purificare de 21,5, dar se pare că a fost înlăturat și un inhibitor al enzimei, de vreme ce randamentul total de recuperare al activității enzimatice a fost de 123%. Pentru fracția cu activitate maximă (13,8 U/mg), calculând de la extractul brut, s-a obținut un randament de recuperare al enzimei de 33%, la un factor de purificare de 127 pentru numai două trepte de purificare. Rezultatele sunt mai bune decât cele publicate, pentru condiții asemănătoare de lucru.

7. În cazul culturilor realizate pe mediu solid, la scară pilot, s-au obținut preparate solide prin simpla precipitare directă a extractului brut cu 70% saturație sulfat de amoniu și uscare la temperatura camerei. Acestea au avut activitatea de 0,02 N 0,07 U/mg. Preparatele comerciale, de exemplu Sigma, mai purificate, au o activitate de aproximativ 0,5 U/mg.

8. Imobilizarea aminoacilazei obținută în laborator, forma desalefiată, s-a realizat prin două metode: legare covalentă și ionică. La legarea covalentă, indiferent de suportul testat (Biozan R, CM-celuloză sau CM-celuloză-cloroacetilată), procedurile de lucru au fost complicate iar randamentele de imobilizare au fost sub 10%. Legarea ionică s-a realizat pe două tipuri de suporturi anionice, Ponilex (copolimeri stiren-acrilamidă derivatizați) și derivați de dextran (DEAE-Sephadex A50 și similarul românesc, DEAE-Filtradex R50).

La imobilizarea prin legare ionică pe suporturi tip Ponilex, prin cele două procedee, în baie și pe coloană, s-au obținut randamente de imobilizare asemănătoare (pentru geluri identice), dar procedeul în coloană este mult mai simplu de realizat din punct de vedere practic, necesitând o mai simplă manipulare a suportului, deci și pierderile sunt mai reduse. Tipul de Ponilex cu rezultatele cele mai bune este AS 106 care are gruparea funcțională, N,N-dimetilaminopropilamină. Randamentele de imobilizare sunt între 40% și 70%, iar activitățile enzimatice între 0,9 și 3,8 U/ml. Activitatea imobilizatului crește cu încărcarea gelului și cu gradul de reticulare al acestuia, dar randamentul de imobilizare scade.

Cele două suporturi schimbătoare de ioni, DEAE-Sephadex și DEAE-Filtradex utilizate pentru legarea ionică a aminoacilazei, au prezentat rezultate asemănătoare, din punct de vedere al randamentului de imobilizare (40 N 50%). Cât privește activitatea aminoacilazică

a imobilizatului, rezultate mai bune s-au obținut în cazul DEAE-Sephadex A-50 (maximul de 3,2 U/ml, față de 2,37 U/ml în cazul DEAE-Filtradex R-50). Valori crescătoare ale încărcării enzimă/suport duc la creșterea activității imobilizatului, dar cu o scădere a randamentului de imobilizare, fapt ce se menține și la imobilizarea la scară mare pe suportul românesc.

Creșterea concentrației tamponului utilizat în timpul exploatării aminoacilazei imobilizate pe DEAE-Sephadex A-50 și DEAE-Filtradex R-50 peste 0,2 M duce la desorbția avansată a enzimei de pe suport. Procesul este accelerat și de temperatură, dar de două ori mai mult în cazul suportului românesc. Acest lucru se poate utiliza în momentul în care enzima și-a pierdut activitatea și se dorește reutilizarea gelului.

9. S-a determinat influența pH-ului asupra activității acilazei native și imobilizate pe DEAE-Filtradex R50. Enzima separată în laborator din culturi de *A. oryzae* s-a comportat asemănător cu alte enzime similare obținute tot din *A. oryzae* și prezentate în literatură. pH-ul optim de acțiune al enzimei native este de 7,4-7,5. Imobilizarea acilazei prin legare ionică duce la o deplasare spre domeniul acid cu 0,5 unități, astfel încât pH-ului optim al imobilizatului este de 7,0, în cazul în care substratul folosit a fost N-acetil-D,L-metionina. Pentru N-acetil-D,L-fenilglicină, enzima imobilizată a prezentat o stabilitate pe un domeniu de pH mult mai larg (5,5 N 7,5), comparativ primul substrat, în cazul căruia domeniul de pH optim este de 7,0 N 7,5. O tamponare prealabilă determinării activității enzimei native, timp de 10 minute, duce la o pierdere a activității cu până la 40% pentru pH-uri de 5,0 N 6,0.

10. Temperatura optimă de acțiune a aminoacilazei native (pentru un timp de 30 minute necesar determinării standard a activității) este de 50-55°C. Nu s-a determinat stabilitatea în timp a enzimei native la diferite temperaturi. Pentru enzima imobilizată pe DEAE-Filtradex R50, temperatura optimă crește cu 5-10°C, comparativ cu enzima nativă, comportament similar cu cel prezentat în literatură pentru enzimă din *A. oryzae* și imobilizată prin legare ionică pe un suport asemănător (DEAE-Sephadex A50). Exploatarea ulterioară, la scară pilot, pentru hidroliza N-acetil-D,L-aminoacizilor a demonstrat o bună stabilitate a imobilizatului la temperatura de 50°C.

11. Acilaza din *A. oryzae*, ca marea majoritate a enzimelor similare, de origine microbiană sau animală, este o Zn-enzimă. Prezența altor ioni în mediul de reacție influențează activitatea enzimatică. Ionul Co^{2+} este cel mai puternic activator, cum de fapt se manifestă pentru majoritatea acilazelor prezentate în literatură. Alți ioni metalici activatori, în ordinea descrescătoare a acțiunii lor, sunt Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} . Ni^{2+} este un inhibitor pentru enzima testată (din *A. oryzae*) dar este un activator puternic pentru cea din *P. furiosus*, *E. coli* și nu afectează acilaza intestinală porcine. Cu^{2+} este inhibitor pentru enzima studiată, pentru cele din *Streptomyces* sp., *A. denitrificans* și *A. oryzae*, dar nu afectează acilaza din *P. furiosus*, după cum prezintă literatura. Acest lucru demonstrează, încă o dată, structura diferită a enzimelor acilazice din diferite surse.

În cazul acilazei imobilizate pe DEAE-Filtradex R50, singurul ion activator este cel de Co^{2+} . Ceilalți ioni testați, spre deosebire de enzima nativă pentru care, după cum s-a prezentat anterior, unii erau activatori, sunt inhibitori ai imobilizatului. Dar, comparând gradul de inhibare pentru ionii inhibitori ai enzimei native, se observă că imobilizarea a dus la o creștere a stabilității față de acești ioni. Și stabilitatea față de EDTA, complexantul zincului din structura acilazei (ceea ce dovedește că acest ion are rol, dacă nu direct, cel puțin în menținerea formei active) crește mult în urma imobilizării, de la 27,3% activitate remanentă pentru enzima nativă la 75,5% pentru cea imobilizată.

12. Literatura din domeniu prezintă activitate maximă a acilazei intestinale porcine la o concentrație de 10^{-4} M CoCl_2 . Cercetările efectuate cu acilaza din *A. oryzae*, au demonstrat o activare maximă a enzimei native (cu substrat acetilmetionină) ca și pentru cea imobilizată (substrat acetilfenilglicină) la o concentrație de CoCl_2 de 10^{-3} M. Pentru același substrat, acetilmetionina, imobilizatului a prezentat însă o creștere continuă a activității o dată cu creșterea concentrației de Co^{2+} pe domeniul 10^{-6} - 10^{-2} M.

13. Studiul cinetic realizat și anume dependența vitezei inițiale de reacție de concentrația inițială a substratului a relevat faptul că, atât enzima nativă cât și cea imobilizată au o cinetică tip Michaelis-Menten. Afinitatea enzimei pentru cele două substraturi testate, exprimată prin constanta Michaelis (K_m) este foarte apropiată și ceva mai scăzută decât cea a enzimei din *A. oryzae* obținută de Chibata. Imobilizarea prin legare ionică duce la o scădere a afinității pentru acetilmetionină, similar cu datele prezentate în literatură, dar pentru acetilfenilglicină afinitatea crește. Capacitatea catalitică a imobilizatului (V_{max}) scade, în schimb, în cazul imobilizării, pentru ambele substraturi (de 5 ori pentru acetilmetionină și mult mai mult, de aproximativ 50 de ori pentru acetilfenilglicină), ceea ce demonstrează că DEAE-Filtradex R50 nu este, cel puțin din acest punct de vedere, foarte asemănător cu similarul său DEAE-Sephadex A50, unde V_{max} crește nesemnificativ în cazul imobilizării. La imobilizarea prin legare ionică pe suportul românesc enzima este atașată într-o formă conformațională mai puțin adecvată actului catalitic.

14. Producerea industrială a L-aminoacizilor prin hidroliza stereoselectivă a derivaților N-acilați, catalizată de aminoacilază, a dus la dezvoltarea și optimizarea tehnologiilor existente. Studiile economice asupra costului total de operare cu enzime libere și cu enzime imobilizate pledează pentru o tehnologie bazată pe enzime fixate pe suport, costul acesteia fiind cu 60 % mai scăzut decât cel al procesului convențional cu enzima liberă. Ca atare, s-a studiat hidroliza enzimatică a doi N-acetil-D,L-aminoacizi (metionina și fenilglicina) utilizând aminoacilaza obținută în laborator și imobilizată prin legare ionică pe DEAE-Filtradex R50. S-a folosit un reactor tip coloană cu enzima imobilizată în pat fix, dar suspendată pe inele de sticlă pentru a reduce tasarea (deci distrugerea gelului ca și micșorarea debitului de exploatare).

15. Acetilarea celor doi aminoacizi s-a realizat în laborator, stabilindu-se condițiile optime de reacție. Pentru fenilglicină, racemicul acesteia a fost acetilat cu anhidridă acetică în mediu bazic, raportul molar optim de reactanți fenilglicină : anhidridă acetică : NaOH fiind de 1:1,2:2,5. S-au obținut randamente de reacție de 85-90% și purități ale N-acetil-D,L-fenilglicinei de 99,7 N99,9%. Acetilarea metioninei s-a realizat tot cu anhidridă acetică, dar în mediu de acid acetic (raport molar metionină : anhidridă acetică : acid acetic de aproximativ 1:1: 9,6). În acest caz s-au obținut randamente de 85-93%, la o puritate a acetilatului de 99%.

16. Hidroliza racemicurilor de N-acetil-D,L-aminoacizi s-a realizat în coloane, cu enzima imobilizată suportată pe inele de sticlă. Pentru a menține o conversie înaltă, de peste 90%, pe parcursul exploatării coloanelor debitul a fost scăzut corespunzător. Concentrațiile optime de substrat au fost de 0,1 M pentru N-acetil-D,L-fenilglicină și 0,2 M pentru N-acetil-D,L-metionină. Concentrația optimă de $CoCl_2$ a fost de $5 \times 10^{-4} M$. Scăderea sub această concentrație a dus la scăderea drastică a timpului de înjumătățire al activității coloanei (20,4 zile pentru $5 \times 10^{-5} M$ $CoCl_2$ față de 47 zile pentru $5 \times 10^{-4} M$ $CoCl_2$). Temperatura de lucru a fost de $50^{\circ}C$, iar pH-ul de 7,0 în ambele cazuri. Pentru determinarea timpului de înjumătățire, în cazul fenilglicinei, s-a testat coloana la o viteză spațială constantă ($0,22 h^{-1}$) și s-a obținut un $t_{1/2} = 46$ zile ce corespunde unei constante de dezactivare $K_d = 6,2 \cdot 10^{-4} h^{-1}$, iar pentru metionină rezultatele au fost similare ($t_{1/2} = 47-48$ zile). În acest al doilea caz a fost testată, pentru comparare, și o coloană cu aminoacilază imobilizată pe DEAE-Sephadex G50, rezultatele fiind aceleași ca pentru suportul românesc. Valoarea $t_{1/2} = 60$ zile este raportată de cercetătorii japonezi la exploatarea unei coloane cu acilază tot din *A. oryzae* și imobilizată pe DEAE-Sephadex A50. Studiul în continuare al enzimei locale, imobilizată pe suportul indigen, ar putea duce la îmbunătățirea procesului, cu atingerea performanțelor japonezilor, diferențele actuale nefiind prea mari.

17. Un lucru extrem de important din punct de vedere economic este posibilitatea de reutilizare a suportului folosit la imobilizare, în cazul legării ionice. După un anumit timp de exploatare imobilizatul își pierde activitatea fie prin denaturarea enzimei, fie prin spălarea acesteia de pe gel. Prin spălarea suportului cu un tampon cu pH și/sau tărie ionică diferită de cea folosită la exploatare, o parte din proteina legată, dacă nu chiar toată, este desprinsă din

legăturile ionice și îndepărtată, suportul putând fi refolosit pentru o nouă imobilizare. S-a testat regenerarea suporturilor prin două proceduri, în baie și direct pe coloană. Regenerarea capacității enzimatică prin procedeul în baie, a dus la un randament de imobilizare de numai 20%, cu o creștere a capacității de 1,6 ori. Regenerarea capacității coloanei s-a realizat prin trecerea directă a unei soluții aminoacilazice prin coloană. Randamentul de imobilizare a fost de 42% iar capacitatea coloanei a crescut de 2,2 ori (pentru DEAE-Filtradex R50). Rezultate asemănătoare s-au obținut și la regenerarea DEAE-Sephadex-ului A50.

18. Separarea L-fenilglicinei din eluatele de pe coloană s-a realizat prin concentrarea la vid și răcire, cu randament de 80-90%, produsele având puritate de 85-95%. Nu s-a procedat la o repurificare a L-fenilglicinei deoarece nu acesta era produsul care interesa. Pentru separarea L-metioninei, procedura a fost identică, randamentele fiind de 93-98%, iar puritatea preparatelor de 96-98%. Purificarea L-metioninei prin recristalizare din apă a dus la produse foarte pure (99,5-100%), dar cu randamente mult mai mici (60-94%).

19. Deoarece D-fenilglicina este folosită în industria antibioticelor, N-acetil-D-fenilglicina s-a separat din filtrate prin precipitare la pH 1-1,5 și 0-4°C, cu randamente de 78-82%, iar produsele au avut o puritate de 98-99,9%. D-fenilglicina s-a obținut prin hidroliza N-acetil-D-fenilglicinei în prezență de acid clorhidric (raport molar 1:1,5), la reflux. Produsul s-a separat prin aducere la pH 5,6 și răcire. Puritatea D-fenilglicinei obținută a fost de 98-99%. Randamentele de obținere au fost de 70-82%.

20. Având în vedere că pornirea de la racemic duce automat la randamente globale de maxim 50%, pentru creșterea randamentului, deci pentru scăderea prețului de cost, izomerul nedorit trebuie reintrodus în proces. Pentru aceasta se recurge la racemizarea acestui izomer. Racemizarea L-fenilglicinei s-a realizat în cataliză bazică, cu NaOH în raport molar 1:4 la reflux. Racemicul a precipitat prin acidulare la pH 5,6 și răcire. Puritatea obținută a fost de 92%, cu randamente de 88-98%. Racemizarea N-acetil-D-metioninei s-a realizat în cataliză acidă, cu acetilarea, în același timp, a urmelor de metionină. S-a obținut un racemic acetilat de puritate ridicată (99,8%), cu randamente de racemizare de 90-96% și de separare de 57-63%.

21. Având în vedere că laboratorul în care s-au realizat aceste cercetări nu a dispus de dotări specifice microbiologice și biochimice, că toate coloanele cromatografice, ca și cele utilizate pentru exploatarea enzimei imobilizate au fost realizate local, că nu s-a dispus de un fermentator de capacitate mare, că sterilizarea și aerarea acestuia nu au fost întru totul adecvate scopului urmărit, s-au obținut preparate aminoacilazice cu activitate comparabilă cu preparatele comerciale de aceeași proveniență (fungică). Aceste preparate au fost purificate prin cromatografie utilizând, probabil pentru prima dată în țară, geluri tip Filtradex R50, respectiv R100, care au prezentat caracteristici operaționale aproape identice ce similarele lor de tip Sephadex. Aminoacilaza a fost apoi imobilizată prin legare ionică pe gelul românesc DEAE-Filtradex R50 cu randamente similare obținute cu gelurile tip Sephadex. Exploatarea la scară pilot a acestor imobilizate (premieră în România) a dus la rezultate apropiate celor obținute la scară industrială de japonezi. Ca atare, întreaga procedură de separare a amestecurilor racemice de aminoacizi, s-ar putea transpune, eventual, la scară industrială. Acest lucru ar necesita, desigur, o cercetare mai avansată, pentru îmbunătățirea randamentelor și a purității produșilor, eventual izolarea unei racemaze care să înlocuiască procedura chimică.

BIBLIOGRAFIE

1. C.J. Suckling (1990) în *Enzyme Chemistry* (editor C.J.Suckling), Sec.Ed., Chapman and Hall, London, 1-7; 95-171.
2. S.L. Neidelman (1990) în *Biocatalysis* (editor D.A. Abramowicz), Van Nostrand Reinhold, New York, 1-24.
3. K. Faber (1995) în *Biotransformations in Organic Chemistry - A Textbook*, Sec.Ed., Springer-Verlag, Berlin, 1-23.
4. I.P. Dumitru, D. Iordăchescu (1981), *Introducere în Enzimologie*, Ed.Medicală, București, 1-65.
5. R.K.Murray, D.K.Granner, P.A.Mayes, V.W.Rodwell in *Harper's Biochemistry*, 24th ed., Appleton & Lange, Stamford, 64-74.
6. R.A. Copeland (1996) în *Enzymes. A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*, VCH Publishers Inc., 1-10.
7. H.M. Koplove, C.L. Cooney (1979) în *Enzyme Production During Transient Growth; Advances in Biochemical Engineering*, vol.12, (editori T.K. Ghose, A. Fiechter, T. Blakebrough), Springer Verlag, Berlin, 1-14.
8. K.M. Shahoni (1975) în *Enzymes in Food Processing*, Sec.Ed., Academic Press, New York, 181-217.
9. J.F.Kennedy, J.M.S. Cabral (1987) în *Biotechnology vol. 7a Enzyme Technology* (editor H.J. Rehm, G. Reed), VCH, Weinheim, 347-405.
10. Y.B. Tewari (1990), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **23**, 187-203.
11. M.W.Anders, W.Dekant (1994), *Adv. Pharmacol.*, **27**, 431-448.
12. S.M.Birnbaum (1955), in *Methods in Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds), vol. 2, Academic Press, New York, 115-119.
13. T.N. Sager, C. Thomsen, J.S. Valsborg, H. Laursen, A.J. Hansen (1999), *J.Neurochemistry*, **73** (2), 807-811.
14. T.Akimitsu, K.Kurisu, R.Hanaya, K.Iida, Y.Kiura, K.Arita, H.Matsubayashi, K.Ishihara, K.Kitada, T.Serikawa, M.Sasa (2000), *Brain Research*, **861**, 143-150.
15. K.K.Bhakoo, T.J.Craig, P.Styles (2001), *J.Neurochem.*, **79** (1), 211-220.
16. G.Chakraborty, P.Mekala, D.Yahya, G.Wu, R.W.Ledeem (2001), *J.Neurochem.*, **78** (4), 736-745.
17. W.K.Paik, L.Bloch-Frankenthal, S.M.Birnbaum, M.Winitz, J.P.Greenstein (1957), *Arch Biochem Biophys*, **69**, 56-66.
18. K.Kachel, E.Asuncion-Punzalan, E.London (1995), *Biochemistry*, **34**, 15475-15479.
19. S.Rowsell, R.A.Pauptit, A.D.Tucker, R.G.Melton, D.M.Blow, P.Brick (1997), *Structure*, **5**, 337-347.
20. S.T.George, A.S.Balasubramanian (1983), *Biochem. J.*, **209**, 471-479.
21. S. Suzuki, M.Tateishi (1981), *Drug Metab. Dispos.*, **9** (6), 573-577.
22. Y.Endo (1976), *Biochim Biophys Acta*, **438** (2), 532-539.
23. K.S.Makarova, N.V.Grishin (1999), *J. Mol. Biol.*, **292**, 11-17.
24. Y.Shintani, H.Fukuda, N.Okamoto, K.Murata, A.Kimura (1984), *J. Biochem.*, **96**, 637-643.
25. H.Fruh, T.Leisinger (1981), *J. Gen Microbiol*, **125** (Pt 1), 1-10.
26. U. Groeger, K. Dranz, H. Klenk (1990), *Angew. Chem.*, **102** (4), 428-429.
27. W. Hummel, H. Schuette, E. Schmidt, M.R. Kula (1987), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27** (3), 283-291.

28. F.Javid-Majd, J.S.Blanchard (2000), *Biochemistry*, **39**, 1285-1293.
29. T.Shiba, K.Takeda, M.Yajima, M.Tadano (2002), *Appl. Environ. Microbiol.*, **68** (5), 2179-2187.
30. M.A.Wegman, M.H.A.Janssen, F.van Rantwijk, R.A.Sheldon (2001), *Adv. Synth. Catal.*, **343** (6-7), 559-576.
31. K. Kubo, T. Ishikura, Y. Fukagawa (1984), *J. Antibiot.* **37** (11), 1394-1402.
32. K. Kubo, T. Ishikura, Y. Fukagawa (1985), *J. Antibiot.* **38** (5), 622-630.
33. Y. Fukagawa, M. Okabe, S. Azuma, I. Kojima, T. Ishikura, K. Kubo (1984), *J. Antibiot.* **37** (11), 1388-1393.
34. K. Kubo, T. Ishikura, Y. Fukagawa (1985), *J. Antibiot.* **38** (3), 333-339.
35. W.H.J.Boesten, L.R.R.Meyer-Hoffman (1980), *Brevet Britanic*, 1,577,087; CA (1981), 94, 207164t.
36. A.Ferjancic-Biagini, T.Giardina, A.Puigserver (1998), *Recent Res. Devel. Agric. Food Chem.*, **2**, 533-548.
37. N. Marks, E.S. Lo, F. Stern, W. Danho (1983), *J. Neurochem.*, **41** (1), 201-208.
38. K.Ishikawa, H.Ishida, Y.Koyama, Y.Kawarabayashi, J.Kawahara, E.Marsui, I.Matsui (1998), *J. Biol. Chem.*, **273** (28), 17726-17731.
39. M.W.W.Adams, J.F.Holden, A.L.Menon, G.J.Schut, A.M.Grunden, C.Hou, A.M.Hutchins, F.E.Jenney, C.Kim, K.Ma, G.Pan, R.Roy, R.Sapra, S.V.Story, M.F.J.M.Verhagen (2001), *J. Bacteriol.*, **183** (2), 716-724.
40. A.Scaloni, W.M.Jones, D.Barra, M.Pospischil, S.Sassa, A.Popowicz, L.R.Manning, O.Schneewind, J.M.Manning (1992), *J. Biol. Chem.*, **267** (6), 3811-3818.
41. A.Scaloni, D.Barra, W.M.Jones, J.M.Manning (1994), *J. Biol. Chem.*, **269** (21), 15076-15084.
42. A.Scaloni, W.Jones, M.Pospischil, S.Sassa, O.Schneewind, A.M.Popowicz, F.Bossa, S.L.Graziano, J.M.Manning (1992), *J. Lab. Clin. Invest.*, **120** (4), 546-552.
43. Y.Endo (1980), *Biochim Biophys Acta*, **628** (1), 13-18.
44. T.Giardina, A.Biagini, F.Dalle Ore, E.Ferre, M.Reynier, A.Puigserver (1997), *Biochimie*, **79**, 265-273.
45. H.J.Brömme, W.Blech (1981), *Acta Biol. Med. Ger.*, **40**, 1009-1020.
46. N.Budisa, W.Karnbrock, S.Steinbacher, A.Humm, L.Prade, T.Neuefeind, L.Moroder, R.Huber (1997), *J. Mol. Biol.*, **270**, 616-623.
47. M.A.Moscarello, H.Pang, C.R.Pace-Asciak, D.D.Wood (1992), *J. Biol. Chem.*, **267** (14), 9779-9782.
48. H.A.Drabkin, C.Bradley, I.Hart, J.Bleskan, F.P.Li, D.Patterson (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6980-6984.
49. Y.E. Miller, H. Drabkin, C. Jones, J.H. Fisher (1990), *Genomics*, **8** (1), 149-154.
50. D.G. Ginzinger, V. Shridhar, A. Baldini, R.T. Taggart, O.J. Miller, D.I. Smith (1992), *Am. J. Hum. Genet.*, **50** (4), 826-833.
51. S.L. Navlor, A. Marshall, C. Hensel, P.F. Martinez, B. Holley, A.Y. Sakaguchi (1989), *Genomics*, **4** (3), 355-361.
52. Y.E. Miller, J.D. Minna, A.F. Gazdar (1989), *J. Clin. Invest.*, **83** (6), 2120-2124.
53. B.Zahr, H.Brauch, C.Talmadge, M.Linehan (1987), *Nature*, **327**, 721-4.
54. R.M.Gemmill, M.varella-Garcia, D.I.Smith, P.Erickson, W.Golembieski, Y.Miller, J.Coyle-Morris, N.Tommerup, H.A.Drabkin (1991), *Genomics*, **11** (1), 93-102.
55. J.W.M. Jones, A. Scaloni, F. Bossa, A.M. Popowicz, O. Schneewind, J.M. Manning (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, **88** (6), 2194-2198.

56. V. Shridhar, W. Golembieski, A. Kamat, S.E. Smith, N. Phillips, O.J. Miller, Y. Miller, D.I. Smith (1994), *Somat. Cell Mol. Genet.*, **20** (4), 255-265.
57. R.M. Cook, W.A. Franklin, M.D. Moore, B.E. Johnson, Y.E. Miller (1998), *Genes, Chromosomes and Cancer*, **21** (4), 320-325.
58. V.I.Kashuba, R.Z.Gizatullin, A.I.Protopopov, R.Allikmets, S.Korolev, J.Li, F.Boldog, K.Tory, V.Zabarovska, Z.Marcsek, J.Sumegi, G.Klein, E.R.Zabarovsky, L.Kisselev (1997), *FEBS Lett.*, **419**, 181-185.
59. V. Shridhar, S. Riverd, S. Shridhar, C. Mullins, L. Bostick, W. Sakr, D. Grignon, O.J. Miller, D.I. Smith (1996), *Oncogene*, **12** (9), 1931-1939.
60. W. Tyran, M. Ujec, K. Stasiak, J. Kwiatkowska (1983), *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **31** (4), 565-574.
61. S.Balabanov, U.Zimmermann, C.Protzel, C.Scharf, K.J.Klebingat, R.Walther (2001), *Eur. J. Biochem.*, **268** (22), 5977-5980.
62. J.R.Leadbetter, E.P.Greenberg (2000), *J. Bacteriol.*, **182** (24), 6921-6926.
63. S.C.Winans, B.L.Bassler (2002), *J. Bacteriol.*, **184** (4), 873-883.
64. W.Lehnert (1983), *Clin. Chim. Acta*, **134**, 207-212.
65. D.G. Hine, K. Tanaka (1984), *Pediatr. Res.*, **18** (6), 508-512.
66. N. Gregersen, S. Kolvra, P.B. Mortensen (1986), *Biochem, Med. Metab. Biol.*, **35** (2), 210-218.
67. N. Gregersen, S. Kolvra, P.B. Mortensen (1986), *Biochem, Med. Metab. Biol.*, **36** (1), 98-105.
68. H.Lindner, S.Höpfner, M.Täfler-Naumann, M.Miko, L.Konrad, K.H.Röhm (2000), *Biochimie*, **82**, 129-137.
69. K. Borowiak (1995), *Ann. Acad. Med. Stetin (Poland)*, **41**, 145-154.
70. E. Ziomek, R. Slowinska, A. Szewczuk (1982), *Enzyme*, **27** (4), 221-226.
71. N. Sabolovic, M. Wellman-Bednawska, D. Oth (1982), *Enzyme*, **28** (4), 355-361.
72. A.Szewczuk, A.Szczeklik (1971), *Clin Chim Acta*, **33**, 309-315.
73. H.G.Bray, S.P.James (1960), *Biochem. J.*, **74**, 394-397.
74. T.J.Monks, R.J.Highet, SS.Lau (1988), *Molec. Pharmacol.*, **34**, 492-500.
75. G.Birner, M.Werner, M.M.Ott, W.Dekant (1995), *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **132**, 203-212.
76. H.L.Lash, W.Qian, D.A.Putt, S.E.Hueni, A.A.Elfarra, R.J.Krause, J.C.Parker (2001), *J.Pharmacol Exper Therap*, **297** (1), 155-164.
77. J.N.M.Commandeur, F.J.J de Kanter, N.P.E.Vermeulen (1989), *Molec. Pharmacol.*, **36**, 654-663.
78. B.S.Vinita Uttamsingh, A.I.Ramswamy, R.B.Baggs (1998), *Anesthesiology*, **89**, 1174-1183.
79. V.Uttamsingh, M.W.Anders (1999), *Chem Res Toxicol*, **12** (10), 937-942.
80. E. Takahashi, M. Furui, H. Seko, T. Shibatani (1997), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47** (2), 173-179.
81. G-J.Kim, D-E.Lee, H-S.Kim (2000), *Appl. Environ. Microbiol.*, **66** (5), 2133-2138.
82. D.Sareen, R.Sharma, H.S.Nandanwar, R.M.Vohra (2001), *Protein Express. Purif.*, **21**, 170-175.
83. K.Sakai, K.Oshima, M.Moriguchi (1991), *Appl Environ Microbiol*, **57** (9), 2540-2543.
84. M.Sugie, H.Suzuki (1978), *Agric. Biol. Chem.*, **42** (1), 107-113.
85. Y.B.Yang, C.S.Lin, C.P. Tseng, Y.J. Wang, Y.C. Tsai (1991), *Appl. Environ. Microbiol.*, **57** (4), 1259-1260.

86. H-P. Chen, S-H. Tsai, Y-B. Yang, K-T. Wang (1992), *BioMed. Chem. Lett.*, **2**, 697-700.
87. Y.C.Tsai, C.S.Lin, T.H.Tseng, H.Lee, Y.J.Wang (1992), *Enz. Microb. Technol.*, **14** (5), 384-389.
88. Y.B.Yang, K.M.Hsiao, H.Li, A.Tsugita, Y.C.Tsai (1992), *Biosci Biotechnol Biochem*, **56** (9), 1392-1395.
89. H.P.Chen, S.H.Wu, K.T.Wang (1994), *Bioorg. Med. Chem.*, **2** (1), 1-5.
90. Y.C.Tsai, C.S.Lin, C.P.Tseng, Y.B.Yang (1993), Brevet SUA, 5,206,162.
91. K.Sakai, K.Imamura, Y.Sonoda, H.Kido, M.Moriguchi (1991), *FEBS Lett*, **289** (1), 44-46.
92. M.Moriguchi, K.Sakai, Y.Miyamoto, M.Wakayama (1993), *Biosci Biotechnol Biochem*, **57** (7), 1149-1152.
93. M.Wakayama, E.Watanabe, Y.Takenaka, Y.Miyamoto, Y.Tau, K.Sakai, M.Moriguchi (1995), *J. Ferment. Bioeng.*, **80** (4), 311-317.
94. M.Wakayama, Y.Katsuno, S.Hayashi, Y. Miyamoto, K.Sakal, M.Moriguchi (1995), *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59** (11), 2115-2119.
95. M.Wakayama, T.Ashika, Y.Miyamoto, T.Yoshikawa, Y.Sonoda, K.Sakai, M.Moriguchi (1995), *J. Biochem.*, **118**, 204-209.
96. M.Wakayama, S.Hayashi, Y.Yatsuda, Y.Katsuno, K.Sakai, M.Moriguchi (1996), *Protein Express. Purif.*, **7**, 395-399.
97. M.Wakayama, H.Yada, S.Kanda, S.Hayashi, Y.Yatsuda, K.Sakai, M.Moriguchi (2000), *Biosci Biotechnol Biochem*, **64** (1), 1-8.
98. S.Tokuyama (1999), Brevet SUA, 5,916,774.
99. F.E.Muñiz-Lozano, G.Dominguez-Sánchez, Y.Diaz-Viveros, D.M.Barradas-Dermitz (1998), *J. Ind Microb. Biotechnol*, **21** (6), 296-299.
100. K.Mitsubishi, H.Yamamoto, A.Matsuyama, S.Tokuyama (2001), Brevet European, 1 120 465 A1.
101. Y.Asano, T.Mori, S.Hanamoto, Y.Kato, A.Nakazawa (1989), *Biochem Biophys Res Commun*, **162** (1), 470-474.
102. S.Tokuyama (2000), Brevet SUA, 6,030,823.
103. M.Terpstra (2000), *Process Biochem.*, **35**, 1057-1061.
104. S.Kawasaki, C.Miyake, T.Kohchi, S.Fujii, M.Uchida, A.Yokota (2000), *Plant Cell Physiol.*, **41** (7), 864-873.
105. P.A.Covitz, L.S.Smith, S.R.Long (1998), *Plant Physiol.*, **117**, 1325-1332.
106. F.Csaikl, G.Reimer, U.Csaikl (1986), *Heredity*, **56**, 157-160.
107. I.Gilles, H.G.Löffler, F.Schneider (1984), *Z. Naturforsch.*, **39c**, 1017-1020.
108. A.Yamauchi, N.Ueda, S.Hanafusa, E.Yamashita, M.Kihara, S.Naito (2002), *J. Pharm Pharmacol*, **54** (2), 205-212.
109. D.E.Wilcox (1996), *Chem. Rev.*, **96**, 2435-2458.
110. V.Uttamsingh, R.B.Baggs, D.M.Krenitsky, M.W.Anders (2000), *Drug Metab. Dispos.*, **28** (6), 625-632.
111. D.Heese, H.G.Löffler, K.H.Röhm (1988), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **369**, 559-566.
112. G.J.Palm, K.H.Röhm (1995), *J. Prot. Chem.*, **14** (4), 233-240.
113. K.J.Greenhough, A.J.Turner (1991), *Biochim. Biophys. Acta*, **1076**, 364-368.
114. M.Jakob, Y.E.Miller, K.H.Röhm (1992), *Biol. Chem Hoppe-Seyler*, **373**, 1227-1231.
115. M.Mitta, H.Ohnogi, A.Yamamoto, I.Kato, F.Sakyiama, S.Tsunasawa (1992), *J. Biochem.*, **112**, 737-742.

116. T.Giardina, A.Biagini, D.Massey-Harroche, A.Puigserver (1999), *Biochimie*, **81**, 1049-1055.
117. T.Giardina, J.Perrier, A.Puigserver (2000), *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6249-6255.
118. A.Hernández, E. Piña (1989), *Prep. Biochem.*, **19** (3), 247-249.
119. J.Henseling, K.H.Röhm (1988), *Biochim. Biophys. Acta*, **959**, 370-377.
120. B. Szajani (1980), *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **15** (4), 287-293.
121. L.Boros, I.Daroczi, I.Huber, J.Ivony, J.Kiss, B.Szajani (1982), Brevet WO, 00253.
122. B.Szajani, J.Kiss, I.Huber, L.Boros, I.Daroczi (1985), Brevet SUA, 4,532,214.
123. B.Szajani, J.Kiss, J.Ivony, I.Huber, L.Boros, I.Daroczi (1986), Brevet SUA, 4,608,340.
124. E.Szwajcer, A.Szewczuk, M.Mordarski (1980), *Acta Biochim Pol*, **27** (2), 123-34.
125. H.Fukuda, S.Iwade, A.Kimura (1982), *J. Biochem.*, **91**, 1731-1738.
126. A.B.Santoyo, J.B.Rodríguez, L.J.G.Carrasco, E.G.Gomez, I.A.Rojo, M.L.A.Teruel (1996), *Enz. Microbiol. Technol.*, **19**, 176-180.
127. Y. Yugari, Y. Mihzamoto (1976), Brevet SUA, 3,985,617 (Cl. 195-68; C07 G7/02); CA (1976), 85, 188439g.
128. A.Bódalo, J.Bastida, J.L.Gómez, I.Alcaraz, M.L.Asanza (1997), *Enz. Microb. Technol.*, **21** (1), 64-69.
129. H.Hernandez, M.L.Asanza, I.Alcaraz, A.M.Hidalgo, M.F.Maximo, J.Bastida (2001), *Biotechnol Lett*, **23** (11), 887-891.
130. V.Viprey, A.Rosenthal, W.J.Broughton, X.Perret (2000), *Genome Biology*, **1**(6), research 0014.1 N 0014.17.
131. E.E. Skvortsova, I.Iu. Galaev, P.S. Nys, V.K. Shviadas, E.M. Savitskaia (1984), *Biokhimiia*, **49** (4), 547-550.
132. H.Umezawa, T.Takeuchi, T.Nagatsu, M.Hamada, S.Iwadare, I.Matsumoto, H.Morishima (1988), Brevet SUA, 4,745,067.
133. A.B.German, A.D.Neklyudov (2001), *Appl. Biochem. Microbiol.*, **37** (1), 55-58.
134. A.B.German, A.D.Nekliudov (2001), *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, **37** (1), 63-66.
135. M.G.Oreshina, G.A.Penzikova, M.M.Levitov, Iu.E.Bartoshevich (1984), *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, **20** (6), 787-792.
136. V. Sakanyan, L. Desmarez, C. Legrain, D. Charlier, I. Mett, A. Kochikyan, A. Savchenko, A. Boyen, P. Falmagne, A. Pierard (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, **59** (11), 3878-3888.
137. H.M.Weiß, G.J.Palm, K.H.Röhm (1995), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **376**, 643-649.
138. H.Y. Cho, K. Tanizawa, H. Tanaka, K. Soda (1987), *Agric. Biol. Chem.*, **51** (10), 2793-2800; CA 108, 51744b.
139. B.Kempf, E.Bremer (1996), *FEMS Microbiol. Lett.*, **141**, 129-137.
140. P.Curley, D.van Sinderen (2000), *FEMS Microbiol. Lett.*, **183**, 177-182.
141. K.Ishikawa, H.Ishida, I.Matsui, Y.Kawarabayasi, H.Kikuchi (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, **67** (2), 673-679.
142. S.V. Story, A.M. Grunden, M.W.W. Adams (2001), *J. Bacteriol.*, **183** (14), 4259-4268.
143. M.Bakker, F.van de Velde, F. van Rantwijk, R.A.Sheldon (2000), *Biotechnol. Bioeng.*, **70** (3), 343-348.
144. Y.B.Yang, K.M.Hsiao, H.Li, A.Tsugita, Y.C.Tsai (1992), *Biosci Biotechnol Biochem*, **56** (9), 1392-1395.
145. U.Groeger, K.Drauz (1994), Brevet SUA, 5,348,882.

146. Y.B. Yang, H.L. Hu, M.C. Chang, H. Li, Y.C. Tsai (1994), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58** (1), 204-205.
147. Y.C.Tsai, L.H.Hsiang, B.Y.Yuan (1993), Brevet SUA, 5,194,383.
148. M. Sugie, H. Suzuki (1980), *Agric. Biol. Chem.*, **44** (5), 1089-1095.
149. S.Tokuyama (2001), *J Molec Catal B: Enzym*, **12**, 3-14.
150. I.Gentzen, H.G.Loffler, F.Schneider (1980), *Z. Naturforsch [C]*, **35** (7-8), 544-550.
151. M.Li, B.He (1992), *Lizi Jiaohuan Yu Xifu*, **8** (5), 417-422; CA (1995), 122, 100186w.
152. D.Wang, M.Li, B.He (1992), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **16**, 115-124.
153. Y-J.Yuan, S-h.Wang, Z-x.Song, R-c.Gao (2002), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **77** (5), 602-606.
154. H. Yamanaka, T. Fukui, T. Kawamoto, A. Tanaka (1996), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45** (1/2), 51-55.
155. A.S. Bommarius, K. Drauz, M. Klenk, C. Wandrey (1992), *Ann. NY Acad. Sci.*, **672**, 126-136.
156. K.H.Röhm, R.L.van Etten (1986), *Eur. J. Biochem.*, **160**, 327-332.
157. H.K.Chenault, J.Dahmer, G.M.Whitesides (1989), *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6354-6364.
158. H.Samejima, K.Kimura, Y.Ado (1980), *Biochimie*, **62**, 299-315.
159. C.A. Grunding (1985), *Biomed. Biochim. Acta.*, **44** (11-12), 1579-1590.
160. Y. Yamazaki, W. Hummel, M.R. Kula (1987), *Z. Naturforsch.* **42c** (9-10), 1082-1088.
161. A.B.Santoyo, J.B.Rodriguez, J.L.G.Carrasco, E.G.Gómez, M.L.A.Teruel, I.A.Rojo (1997), *Chem. Eng. Sci.*, **52** (2), 171-176.
162. M.D.Trevan, A.L.Mak (1988), *Trends in Biotechnol.*, **6**(3) [50], 68-73.
163. Y.Kameda, E.Toyoura, H.Yamozoe, Y.Kimura, Y.Yasuda (1952), *Nature*, **170**, 888-892.
164. Y.C.Tsai, C.P.Tseng, K.M.Hsiao, L.Y.Chen (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, **54** (4), 984-989.
165. T. Mori, T. Sato, T. Tosa, I. Chibata (1972), *Enzymologia*, **43** (4), 213-226.
166. I.Chibata, T. Tosa, T. Sato, T. Mori (1976) in *Methods in Enzymology, vol.XLIV, Immobilised Enzymes* (ed. K. Mosbach), Acad.Press, 746-759.
167. W.Kordel, F.Schneider (1977), *Z. Naturforsch [C]*, **32** (5-6), 342-344.
168. S.Pittelkow, H.Lindner, K.H.Röhm (1998), *Prot. Express. Purif.*, **12**, 269-276.
169. R.M.Cook, B.J.Burke, D.L.Buchhagen, J.D.Minna, Y.E.Miller (1993), *J. Biol. Chem.*, **268** (23), 17010-17017.
170. M. Miyagi, M. Nakao, T. Nakazawa, I. Kato, S. Tsunasawa (1998), *Rapid Comm. Mass Spectr.*, **12** (10), 603-608.
171. M.Mitta, I.Kato, S.Tsunasawa (1993), *Biochim. Biophys. Acta*, **1174**, 201-203.
172. H.Lindner, W.Berens, I.Kraus, K.H.Rohm (2000), *Biol. Chem.*, **381** (11), 1055-1061.
173. Z.Y. Tang, J.Y. Yu, O. Zhou, B. He, Z.F. Wang, H.M. Zhou (1995), *J. Biochem.*, **118** (4), 706-709.
174. A.Biagini, A.Puigserver (2000), *Regard sur la Biochimie*, **2**, 15-23.
175. A.Biagini, A.Puigserver (2001), *Compar. Biochem. Physiol. B*, **128**, 469-481.
176. K. Sakota, H. Tanaka, H. Nishiyama, N. Ezaki (1990), Brevet Japonese, 02,72,897; CA (1990), 113, P 130721y

177. Y. On, G. Zhao, X. Zhou (1987), *Shengwu. Huaxue Zazhi*, **3** (3), 411-416; CA (1988), 108, 34088y.
178. D.Hesse, S.Berger, K.H.Röhm (1990), *Eur. J. Biochem.*, **188**, 175-180.
179. T. Zhang, H. Zhoo (1994), *Shengwu Wub. Xuebao*, **10** (2), 198-202; CA (1995), 122, 127410b.
180. J-H.Bai, D.Xu, H-R.Wang, S-Y.Zheng, H-M.Zhou (1999), *Biochim. Biophys. Acta*, **1430**, 39-45.
181. H-R.Wang, T.Zhang, H-M.Zhou (1995), *Biochim. Biophys. Acta*, **1248**, 97-106.
182. Z.H.Wang, H.B.Wu, X.C.Wang, H.M.Zhou, C.L.Tsou (1992), *Biochem J.*, **281**, 285-290.
183. I. Gilles, H.G. Loeffler, F. Schneider (1981), *Z. Naturforsch [C]*, **36** (9-10), 751-754.
184. B.He, T.Zhang, H-M.Zhou (1997), *Int. J. Biol. Macromol.*, **20**, 53-62.
185. J.Frey, W.Kordel, F.Schneider (1977), *Z. Naturforsch [C]*, **32** (9-10), 769-776.
186. H.G.Löffler, F.Schneider (1987), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **368**, 481-485.
187. D.Heese, K.H.Röhm (1989), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **370**, 607-612.
188. T.vom Bruch, K.H.Röhm (1988), *Z. Naturforsch.[C]*, **43**, 671-678.
189. R. Chen, D. Xu, H.M. Zhou (1997), *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **43** (6), 1277-1283.
190. Y.K.Reshetnyak, E.A.Burstein (2001), *Biophys J.*, **81**, 1710-1734.
191. W.Kordel, F.Schneider (1977), *Z. Naturforsch [C]*, **32** (5-6), 337-341.
192. S-C.J.Fu, S.M.Birnbaum, J.P.Greenstein (1954), *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 6054-6058.
193. W.Kordel, F.Schneider (1975), *Hoppe Seylers Physiol Chem*, **356** (6), 915-920.
194. K.Yokoigawa, E.Sato, N.Esaki, K.Soda (1994), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 287-289.
195. A.Ferjancic-Biagini, T.Giardina, M.Reynier, A.Puigserver (1997), *Biocat. Biotransf.*, **15**, 313-323.
196. I.Y.Galaev, V.K.Svedas (1982), *Biochim. Biophys. Acta*, **701**, 389-394.
197. J.Kosáry, B.Szajáni, L.Boross (1992) in *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, ed. J.Tramper, Elsevier Science Publishers B.V., 609-612.
198. J.Kosáry, Cs.Sisak, B.Szajami, L.Boross (1994), *Biocatalysis*, **11**, 329-337.
199. L.Boross, J.Kosáry, É.Stefanovits-Bányai, C.Sisak, B.Szajáni (1998), *J. Biotechnol.*, **66**, 69-73.
200. L.Boross, J. Kosáry, É.Stefanovits-Bányai, C.Sisak, B.Szajáni (1998) in *Stability and Stabilization of Biocatalysts*, (Ed. A.Ballesteros, F.J.Plou, J.L.Iborra, P.J.Halling), Elsevier Science B.V., 477-482.
201. A.Manjón, J.M.Obón, M.Cánovas, J.L.Iborra (1992) in *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, (ed. J.Tramper), Elsevier Science Publishers B.V., 121-128.
202. B.Herradon, S.Valverde (1995), *SYNLETT*, **6**, 599-602.
203. M.Ors, A.Morcuende, M.J.Jimenez-Vacas, S.Valverde, B.Herradon (1996), *SYNLETT*, **5**, 449-451.
204. J.Feraldos, E.Arroyo, B.Herradon (1997), *SYNLETT*, **4**, 367-370.
205. F.Sanchez-Sancho, B.Herradon (1998), *Tetrahedron : Asymetry*, **9**, 1951-1965.
206. M.Bakker, A.S.Spruijt, F.van Rantwijk, R.A.Sheldon (2000), *Tetrahedron: Asymmetry*, **11**, 1801-1808.
207. M.Bakker, A.S.Spruijt, F. van de Velde, F. van Rantwijk, R.A.Sheldon (2001), *J Molec Catal B: Enzym*, **11**, 373-376.
208. M.I.Youshko, F. van Rantwijk, R.A.Sheldon (2001), *Tetrahedron: Asymmetry*, **12**, 3267-3271.
209. O.S.Wolfbeis, E.Koller (1983), *Anal. Biochem.*, **129**, 365-370.

210. S.M.Birnbaum, L.Levintow, R.B.Kingslez, J.P.Greenstein (1952), *J.Biol.Chem.*, **194**, 455-470.
211. V.Iu.Shviadas, I.Iu.Galaev, N.A.Galstian, I.V.Berezin (1980), *Biokhimiia*, **45** (8), 1361-1364.
212. J.P.Greenstein (1957), *Methods Enzymol*, **3**, 554-570.
213. R.Marshall, S.M.Birnbaum, J.P.Greenstein (1956), *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4636-4642.
214. W.S.Fones, M.Lee (1953), *J.Biol.Chem.*, **201**, 847-856.
215. S-C.j.Fu, S.M.Birnbaum (1953), *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 918-920.
216. S-C.J.Fu, S.M.Birnbaum (1953), *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 918-920.
217. S.Kang, Y.Minematsu, Y.Shimohigashi, M.Waki, N.Izumiya (1988), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 575-576.
218. E.Moravcsik, J.Telegdi, H.Tüdös, K.Kömives, L.Ötvös (1977), *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung*, **12**, 399-402.
219. H.G.Löffler, M.Kroll, F.Schneider (1988), *Biol Chem Hoppe-Seiler*, **369**, 866-879.
220. C. Sambale, M.R. Kula (1987), *Appl. Biochem.*, **9** (3), 251-257.
221. Y.Endo (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **523** (1), 207-214.
222. V. Uttamsingh, D.A. Keller, M.W. Anders (1998), *Chem. Res. Toxicol.*, **11** (7), 800-809.
223. M.J.Cormier, B.L.Strehler (1953), *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4865-4866.
224. A.Szewczuk, M.Wellman-Bednawska (1978), *Clin. Chim. Acta*, **84**, 27-31.
225. J.Telegdi, H.Tüdös, F.Kraicsovits, E.Moravcsik, L.Ötvös (1987), *Acta Biochim. Biophys. Hung.*, **22** (1), 67-74.
226. A. Blaskó (1987), *Revista de Chimie*, **38**(10), 879-881.
227. S.R.Baker, J.Goldsworthy, R.C.Harden, C.R.Salhoff, D.D.Schoepp (1995), *Bioorg & Med Chem Lett*, **5** (3), 223-228.
228. Y.Kokuryo, T.Nakatani, K.Kobayashi, Y.Tamura, K.Kawada, M.Ohtani (1996), *Tetrahedron: Asymmetry*, **7** (12), 3545-3551.
229. M.Q. Huang, H.M. Zhou (1995), *Enz.Protein*, **48** (4), 229-237.
230. E.Kumpe, H.G.Löffler, F.Schneider (1981), *Z.Naturforsch.[C]*, **36**, 951-955.
231. T. Kobayashi, Y. Maki, S. Honda, K. Kusai (1987), *Brevet Japonese*, 62,163,689; CA (1987), 108, 71317t.
232. T. Tosa, T. Mori, I. Chibata (1967), *Enzymologia*, **32** (3), 153-168.
233. A.Kaycsa, A.Anghel (2001), A 19-Sesiune Științifică anuală a Soc. Nat. de Biol. Cel., 7 N 10 ian. 2001, *Bul. Soc. Nat. de Biol. Cel.*, **29**, 291.
234. B.Szajani, A.Kiss, L.Boross (1980), *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, **15**(1), 29-37.
235. H-B.Wu, C-L.Tsou (1993), *Biochem. J.*, **296**, 435-441.
236. Y.X. Zhang, W.P. Le, H.M. Zhou (1995), *J. Protein Chem.*, **14** (8), 695-701.
237. I.A. Iamskov, M.V. Budanov, L.S. Lobareva, M.K. Malinka, V.A. Davankov (1981), *Biokhimiia*, **46** (4), 652-656.
238. V.Yu, K.Sviadas, I.Iu.Galaev, I.V.Berezin (1980), *Biochimia*, **45** (10), 1833-1839.
239. C.L. Tsou (1988), *Adv. Enzymol.*, **61**, 381-436.
240. Z.X. Wang, H.R. Wang, H.M. Zhou (1995), *Biochemistry*, **34** (20), 6863-6868.
241. Y. Yang, H.R. Wang, H.M. Zhou (1996), *Int. J. Pept. Protein Res.*, **48** (6), 532-8.
242. Y.X.Zhang, S.L.Yan, H.M.Zhou (1996), *J. Prot. Chem.* **15** (7), 631-637.
243. B. He, Y. Zhang, T. Zhang, H.R. Wang, H.M. Zhou (1995), *J. Protein Chem.*, **14** (5), 349-357.

244. T.Tamura, Y.Oki, A.Yoshida, T.Kuriyama, H.Kawakami, H.Inoue, K.Inagaki, H.Tanaka (2000), *Arch. Biochem. Biophys.*, **379** (2), 261-266.
245. C.Wandrey, E.Flaschel, K.Schugerl (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1649-1670.
246. R.Bacaloglu, G.Musca, Gr.Pop, A.Blasko, C.Boeriu, A.Stoi (Kaycsa), S. Eisler, (1985), *Rev. Roum. Biochim.*, **22**(2), 91-99.
247. A.Bódalo, J.L.Gómez, J.Bastida, G.León, M.F.Máximo, A.M.Hidalgo, M.C.Montiel (1999), *Enz. Microb. Techn.*, **24**, 381-387.
248. A.Bódalo, J.L.Gómez, E. Gómez, M.F.Máximo, M.C.Montiel (2002), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **77**(5), 552-558.
249. L.Ötvös, E.Moravcsik, Gy.Mády (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**(5), 1056-1064.
250. L.Ötvös, E.Moravcsik, F.Kraicsovits (1975), *Tetrahedron Lett.*, **29**, 2485-2488.
251. P.Denton (2000), *Bioorg. Chem.*, **28**, 205-213.
252. J.Telegdi, H.Tüdös, F.Kraicsovits, L.Ötvös (1990), *Acta Biochim. Biophys. Hung.*, **25**, 93-99.
253. J.Henseling, K.H.Röhm (1987), *FEBS Letters*, **219** (1), 27-30.
254. K.Nilsson (1987), *Trends in Biotechnol.* **5**, 73-154.
255. J.K. Johnson (1979) in *Immobilised Enzymes; Preparation and Engineering; Recent Advances*, Noyes Data Corp., New Jersey, 1979, 26-63.
256. J. Klein (1988) in *Bioreactor Immobilised Enzymes and Cells; Fundamentals and Applications* (editor M.Moo-Young), Elsevier Appl. Science, London, 1988, 3-42.
257. J.F. Kennedy, J.M.S. Cabral (1985) in *Immobilised Enzymes and Cells* (Ed. J. Woodward), IRL Press, Oxford UK, 1985, 19-62.
258. W.Hartmeier (1985), *Trends Biotechnol.* **3** (6), 149-153.
259. J.F. Kennedy, J.M.S. Cabral (1985), in *Immobilised Enzymes and Cells*, (Ed. J.Woodward), IRL Press, Oxford UK, 1985, p.19.
260. J. Klein (1990), in *Bioreactor Immobilised Enzymes and Cells, Fundamentals and Applications* (Ed. M.Moo-Young), Elsevier Appl.Science, London, 1990, 3
261. I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, T. Mori (1978) in *Immobilized Enzymes. Research and Development* (editor I. Chibata), John Wiley & Sons, New York, 1978, 148-178.
262. T.Tosa, T.Mori, N.Fuse, I.Chibata (1969), *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1047-1053.
263. T.Tosa, T.Mori, N.Fuse, I.Chibata (1967), *Enzymologia*, **32**, 153-163.
264. T.Tosa, T.Mori, N.Fuse, I.Chibata (1967), *Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 603-615.
265. T.Tosa, T.Mori, N.Fuse, I.Chibata (1966), *Enzymologia*, **31**, 214-225.
266. I.Chibata (1978), *Pure & Appl. Chem.*, **50**, 667-675.
267. I.Chibata (1978), *Pure & Appl. Chem.*, **50**, 667-675.
268. G.Franzmann, H.L.Hulsmann (1979), Brevet German, 27 49 317.
269. F.Meiller, B.Mirabel (1979), Brevet Britanic, 1 547 077.
270. F.Meiller, B.Palaiseau, M.Fresnes (1979), Brevet SUA, 4,132,596.
271. H. Mazarguil, F. Meillre, P. Monsan (1975), Brevet German, 2,516,935; CA (1976), 84, 14396g.
272. I.Chibata, T.Tosa, T.Mori, T.Watanabe, M.Fujimura (1980), Brevet SUA, 4,224,411.
273. I. Chibata, T. Tosa, T. Mori, T. Watanabe, M. Fujimura (1979), Brevet German, 2,828, 194; CA (1979), 90, 134553z.
274. T. Watanabe, T. Mori, T. Tosa, I. Chibata (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21** (3), 477-486.
275. F.Leuschner (1961), Brevet Britanic, 953,414 .

276. P.M. Lee, K.H. Lee, Y.S. Siaw (1993), *Biomater, Artif. Cells Immob. Biotechnol.*, **21** (4), 563-570.
277. T.Kawai, M.Nakamura, K.Sugita, K.Saito, T.Sugo (2001), *Biotechnol Prog*, **17**(5), 872-875.
278. K. Kawashima, K. Umeda (1975), *Biotechnol. Bioeng.*, **17** (4), 599-605.
279. K. Kawashima, K. Umeda (1974), *Biotechnol. Bioeng.*, **16** (5), 609-621.
280. Y. Suzuki (1977), Brevet Japonese, 77 47,983; CA (1977), 87, 64651s.
281. K. Hirano, I. Karube, S. Suzuki (1971), *Biotechnol. Bioeng.*, **19** (3), 311-321.
282. T. Tosa, T. Sato, T. Mori, K. Yamamoto, I. Takata, Y. Nishida. I. Chibata (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, **21** (10), 1697-1709.
283. M.Yamaya, H.Kanbara (1987), Brevet European, 0 231 093 A2.
284. H.L.Hulsmann, P.Janssen, G.Renckhoff, H.J.Vahlensieck (1977), Brevet German, 26 19 571.
285. H.L.Hulsmann, P.Janssen, G.Renckhoff, H.J.Vahlensieck (1977), Brevet German, 26 19 571.
286. C.Sisak, B.Szajáni, L.Boross (1988), *Biotech. Food Ind. Proc. Int. Symp. Budapest*, 679-692.
287. C.Sisak, L.Boross, B.Szajáni (1990), *Biotechnol. Techn.*, **4** (1), 15-20.
288. B.Szajáni, K.Ivony, L.Boross (1980), *J. Appl. Biochem.*, **2**, 72-80.
289. K.Smalla, J.Turkova, J.Čoupek, P.Hermann (1988), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **10**, 21-31.
290. N.Kiba, Y.Oyama, M.Furusawa (1995), *Talanta*, **42**(3), 449-453.
291. H.J. Wang, J.H. Bai, D.S. Liu, T. Zhang, H.M. Zhou (1999), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **76** (3), 183-191.
292. T.Barth, H.Masková (1971), *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **36**, 2398-2400.
293. I.Chibata, T.Tosa, T.Mori, M.Fujimura (1983), Brevet SUA, 4,390,626.
294. M.F.Palaisbeau, M.B.Fresnes (1977), Brevet German, 27 23 454.
295. A.B. Santoyo, J.B. Rodriguez, J.L.G. Carrasco, E.G. Gomez, I.A. Rojo, M.L.A Teruel (1998), *J. Chem. Tech. Biotech.*, **73** (3), 197-202.
296. R.E. Copeland (1996) in *Enzymes. A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*, VCH Publishers Inc., 1996, 1-10.
297. A.Kleemann, W.Leuchtenberger, B.Hoppe, H.Tanner (1985) in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, vol. A2 (Ed. W.Gerhartz, Y.S.Yamamoto, F.T.Campbell, R.Pfefferkorn, J.F.Rounsavile), VCH, Weinheim, 57-97.
298. C.D. Nenitescu (1980) in *Chimie organică*, vol. II, Ed. Didactică și Pedagogică, București, 353-397.
299. M.J. O'Donell (1988), *Tetrahedron*, **44**, 5253-5265.
300. A. Collet, M. Birenne, J. Jaques (1980), *Chem. Rev.*, **80**, 215-224.
301. J.S.Dordick, B.D.Martin, R.J.Lihardt (1995), Brevet SUA, 5,474,915.
302. J.A.Bush, G.Wu, A.Suryawan, H.V.Nguyen, T.A.Davis (2002), *J. Nutr.*, **132**, 59-67.
303. R.M.Williams, P.J.Sinclair, D.Zhai, D.Chen (1988), *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1547-1557.
304. M.D.Trean, A.L.Mak (1988), *Trends in Biotechnol.*, **6**(3), 68-73.
305. S.Moore, W.H.Stein (1954), *J. Biol. Chem.*, **211**, 907-913.
306. Y.Kameda, E.Toyouura, H.Yamozoe, Y.Kimura, Y.Yasuda (1952), *Nature*, **170**, 888-892.
307. W.D.Lubell, H.Rapoport (1987), *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 236-239.

308. R.M. Williams (1989) in *Synthesis of Optically Active Alfa-Amino Acids*, Pergamon Press, 1989, 257-279.
309. M.Sauter, O.Werbitzky (1999), Brevet WO, 07873.
310. A.Ducastaing, J.Adrian (1990), *Sciences des Aliments*, **10**, 231-254.
311. A.S.Jandel, H.Hustedt, C.Wandrey (1982), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **15**, 59-63.
312. C.Wandrey, R.Wichmann (1987), *Biotec.*, **1**, 85-92.
313. B.K.Hamilton, H-Y.Hsiao, W.E.Swann, D.M.Anderson, J.J.Delente (1985), *Trends Biotechnol.*, **3** (1), 64-68.
314. M.Hasegawa (1985), *Chem. Econ. Eng. Rev.*, **17** (1-2), 26-35.
315. M.D.Bednarski, H.K.Chenault, E.S.Simon, G.M.Whitesides (1987), *J. Chem. Am. Soc.*, **109**, 1283-1285.
316. Y-P.Yu, S-H. Wu (2001), *Chirality*, **13**, 231-235.
317. R.Damico (1975), *J. Agr. Food Chem.*, **23** (1), 30-33.
318. A.Bódalo, J.L.Gómez, E. Gómez, J.Bastida, M.F.Máximo, M.C.Montiel (2001), *Enz. Microb. Technol.*, **28**, 355-361.
319. *Farmacopeea Română*, ed. a X-a, Ed. Medicală, București, 1998.
320. H.Kunz, H.G.Lerchen (1987), *Tetrahedron Lett.*, **28** (17), 1873-1876.
321. B.Witkop (1983), *Heterocycles*, **20** (10), 2059-2075.
322. R.A.Sheldon, P.A.Porskamp, W. ten Hoeve (1985) in *Biocatalysts in Organic Synthesis* (Ed. J.Tramper, H.C. van der Plas, P.Linko), Elsevier, Amsterdam, 59-81.
323. C. Wandrey, C. Flaschel (1979), *Adv.Biochem.Eng.*, **12**, 184-201.
324. A.M. Klibanov, E.D. Moris (1981), *Enzym.Microb.Technol.*, **3**, 119-121.
325. J. Houben (1965) in *Methoden der Organische Chemie*, vol.2, Georg Thieme, Leipzig, 106-111.
326. A.Bódalo, J.L.Gómez, E. Gómez, M.F.Máximo, A.M.Hidalgo (2001), *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76**(9), 978-984.
327. S. Tokuyama, K. Hatano (1996), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44** (6), 774-777.
328. A.Szewczuk, M.Kuropatwa, K.Barczyk-Luczykowa, E.Ziomek (1982), *Clin. Chim. Acta*, **123**, 33-37.
329. I.G.Weinberg, D.I.Lautient, A.A.Hagendorf, A.K.Aren (1982), Brevet URSS, 968070.
330. H.Y. Cho, K. Tanizawa, H. Tanaka, K. Soda (1987), *Anal. Biochem.*, **165** (1), 142-146.
331. T.Kraus, V.Uttamsingh, M.W.Anders, S.Wolf (2000), *Drug Metab. Dispos.*, **28** (4), 440-445.
332. S.Moore (1968), *J.Biol.Chim.*, **243**, 6281-6283.
333. H.Miyano, T.Toyo'oka, K.Imai, T.Nakajima (1985), *Anal.Biochem.*, **150**, 125-130.
334. O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr, R.J.Randall (1951), *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
335. A.Stoi (Kaycsa), A.Anghel, D.Schiop (1986), A XIX-a Sesiune Științifică a Centrului de Igienă și Sănătate Publică, Timisoara, 1986.
336. A.Anghel, A.Stoi (Kaycsa), Fr.Peter (1986), Conferința Națională de Biochimie și Cercetări Fundamentale și Aplicate, Bucuresti, 19-20 dec. 1986.
337. A.Anghel, A.Stoi (Kaycsa), Fr.Peter (1987), Conferința de Biochimie "Cercetări Fundamentale și Aplicative", 19-20 dec. 1986, București, St.Cerc.Biochim., **39**(2), 135-137.

338. R.Bacaloglu, A.Anghel, Al.Sauciuc, A.Stoi (Kaycsa), Gr.Pop, G.Musca, Fr.Peter, Tr.Hava, C. Boeriu, A.Blasko, S.Eisler (1986), Brevet Romania, nr. 95942.
339. R.Bacaloglu, A.Anghel, A.Stoi, Gr.Pop, G.Musca, Fr.Peter, Tr.Hava, C.Boeriu, A.Blasko, S. Eisler (1986), Brevet Romania, nr. 95943.
340. A.Kaycsa, A.Anghel (2000), Sesiunea Științifică Anuală a SRBBM, Bucuresti, 19-20 sept. 2000.
341. I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, T. Mori (1978) în *Immobilized Enzymes. Research and Development* (editor I. Chibata), John Willey & Sons, New York, 9-108.
342. R.Bacaloglu, A.Stoi (Kaycsa), G.Musca, Gr.Pop, A.Anghel (1986), Microsimpozion ICECHIM, 25-26 ian. 1986.
343. S.Maxim, A.Flondor, A.Kaycsa (1989), Zilele Academiei Ieșene, 19-25 oct. 1989.
344. S.Maxim, A.Fondor, I.Bunia, A.Kaycsa (1992), *J. Molecular Catalysis*, **72**, 351-359.
345. A.Kaycsa, S.Maxim (1989), Al VII-lea Simpozion de Microbiologie Industrială și Biotehnologie, Galați, 8-9 sept. 1989.
346. A.Kaycsa, A.Anghel (2000), Sesiunea Științifică Anuală a SRBBM, București, 19-20 sept. 2000.
347. R.Bacaloglu, G.Musca, Gr.Pop, A.Stoi (Kaycsa), A.Anghel, A.Blasko, C.Boeriu, Microsimpozion ICECHIM, 25-26 ian. 1985.
348. R.K.Scopes (1982), *Principles and Practice of Protein Purification*, Springer Verlag, New York, 43-59.
349. R.Bacaloglu, G.Musca, Gr.Pop, A.Blasko, C.Boeriu, A.Stoi (Kaycsa), S.Eisler (1985), Microsimpozion ICECHIM, 25-26 ian. 1985.
350. C.Boeriu, A.Stoi (Kaycsa), G.Preda, S.Eisler, D.Oana (1986), Conferința Națională de Biochimie și Cercetări Fundamentale și Aplicate, București, 19-20 dec. 1986.
351. R.Bacaloglu, A.Blasko, C.Boeriu, Fr.Peter, A.Stoi (Kaycsa), S.Eisler, D.Oana (1986), A XIII-a Sesiune de Comunicări Științifice, Călimănești, mai 1986.
352. C.Boeriu, A.Stoi (Kaycsa), G.Preda, S.Eisler (1987), Simpozion ICECHIM, 30 ian. 1987.
353. C.Boeriu, A.Kaycsa, G.Preda, E.Sigrun, D.Oana, E.Deretey, Fr.Peter (1989), Al VII-lea Simpozion de Microbiologie Industrială și Biotehnologie, Galați, 8-9 sept. 1989.
354. C.Boeriu, Fr.Peter, A.Kaycsa, G.Preda, D.Oana (1990), Brevet Romania, nr. 108 252.
355. G.N.Rolinson (1998), *J. Antimicrob. Chemotherapy*, **41**, 589-603.
356. T.Shiraiwa, S.Sakata, K.Fujishima, H.Kurokawa (1991), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 191-195.
357. T.Shiraiwa, S.Sakata, H.Kurokawa (1989), *Tech. Reports Kansai Univ.*, **31**, 97-102.
358. W.H.J.Boesten (Stamicarbon B.V.), (1977), Brevet DE 2,637,204; C.A. (1977), 87, 39839b.
359. W.H.J.Boesten (Stamicarbon B.V.), (1976), Brevet DE 2526594; C.A. (1976), 84, 149254c.
360. P.L.Kerkhoffs, W.H.L.Boesten (Stamicarbon B.V.) (1986), Brevet EU, 181,675; C.A. (1986), 105, 96058k.
361. W.H.J.Boesten (Stamicarbon B.V.) (1979), Patent European, 2297; C.A. (1980), 92, 22083f.
362. M.C. de Zoete, A.A.Ouwehand, F. van Rantwijk, R.A.Sheldon, (1995), *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **114**, 171-174.
363. M.A.P.J.Hacking, M.A.Wegman, J.Rops, F. van Rantwijk, R.A.Sheldon (1998), *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **5**, 155-157.

364. M.A.Wegman, M.A.P.J.Hacking, J.Rops, P.Pereia, F. van Rantwijk, R.A.Sheldon (1999), *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, 1739-1750.
365. W.H.J.Boesten (Stamicarbon B.V.) (1991), Brevet EU 442,584; C.A. (1992), 116, 42062r.
366. T.Shiraiwa, S.Sakata, H.Natsuyama, K.Fujishima, H.Miyazaki, S.Kubo, T.Nitta, H.Kurokawa (1992), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**, 965-970.
367. T.Shiraiwa, S.Sakata, K.Fujishima, H.Natsuyama, H. Kurokawa (1990), *Chem Express*, **5 (8)**, 561-564.
368. T.Sugai, T.Yamazaki, M.Yokoyama, H.Ohta (1997), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1419-1427.
369. E.Schajcev, A.Szewczuk, M.Mordarcki (1981), *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1675-1681.
370. C.Boeriu, D.Oana, G.Preda, A.Kaycsa, E.Deretey, Fr.Peter (1995), *Revista de Chimie*, **46(5)**, 426-429.
371. P.G. Righetti, A. Bossi (1998), *Electrophoresis*, **19 (7)**, 1075-1080.
372. V.Stroescu (1998), *Bazele farmacologice ale practicii medicale*, ed. VI, Ed. Medicala, Bucuresti, 878-879.