

UTILIZAREA ALCALAZEI IMOBILIZATE ÎN SINTEZA PEPTIDELOR

Teză destinată obținerii
titlului științific de doctor inginer
la
Universitatea "Politehnica" din Timișoara
în domeniul INGINERIE CHIMICĂ
decătre

Ing. Livia Nicoleta Corîci

Conducător științific: prof.univ.dr.ing. Corneliu Davidescu
Referenți științifici: prof.univ.dr.ing. Carmen Boeriu
prof.univ.dr.ing. Gabriela Bahrim
prof.univ.dr.ing. Francisc Peter

Ziua susținerii tezei: 20.12.2011

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- | | |
|------------------------|---|
| 1. Automatică | 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații |
| 2. Chimie | 8. Inginerie Industrială |
| 3. Energetică | 9. Inginerie Mecanică |
| 4. Ingineria Chimică | 10. Știința Calculatoarelor |
| 5. Inginerie Civilă | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 6. Inginerie Electrică | |

Universitatea „Politehnica” din Timișoara a inițiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoștințelor și rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul școlii doctorale a universității. Seriile conțin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2006

Această publicație este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicații, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustrațiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare și permisiunea pentru utilizare obținută în scris din partea Universității „Politehnica” din Timișoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300159 Timișoara, Bd. Republicii 9,
tel. 0256 403823, fax. 0256 403221
e-mail: editura@edipol.upt.ro

Cuvânt înainte

Teza de doctorat a fost elaborată pe parcursul activității desfășurate în perioada stagiului de doctorat cu frecvență la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului a Universității "Politehnica" din Timișoara.

Adresez respectuoase mulțumiri domnului Prof. Dr. Ing. Corneliu Davidescu, conducătorul științific al lucrării, pentru îndrumarea și sprijinul acordat pe întreaga perioadă de desfășurare a stagiului de doctorat.

Sunt profund îndatorată și doresc să mulțumesc doamnei Dr. Ing. Carmen Boeriu de la Universitatea din Wageningen pentru profesionalismul cu care m-a ghidat pe drumul către obținerea titlului de doctor în științe, pentru competența și permanența îndrumare științifică și pentru sprijinul moral și emoțional acordat pe întreaga perioadă de desfășurare a stagiului și a elaborării tezei de doctorat. *Above all and the most needed, she provided me unflinching encouragement and support in various ways. Her truly scientist intuition has made her as a constant oasis of ideas and passions in science, which exceptionally inspire and enrich my growth as a researcher want to be.*

Mulțumesc în mod special domnului Prof. Dr. Ing. Francisc Peter pentru încurajările oferite la momentul oportun pentru întreprinderea de demersuri în vederea obținerii stagiului de cercetare în străinătate, care mi-a îmbogățit atât orizontul științific cât și cel lingvistic. Sprijinul moral și științific, încurajările, cât și lecțiile primite de la dânsul îmi sunt de un real ajutor pentru viitorul carierei mele.

Îmi exprim întreaga considerație față de membrii comisiei de doctorat, domnului președinte al comisiei Prof. Dr. Ing. Lucian Mircea Rusnac, decan al Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului din Timișoara, doamnelor Dr. Ing. Carmen Boeriu de la Universitatea din Wageningen, Prof. Dr. Ing. Gabriela Bahrim de la Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați și domnului Prof. Dr. Ing. Francisc Peter de la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului din Timișoara, pentru onoarea ce mi-au făcut-o acceptând propunerea de a face parte din comisia de analiză a tezei și pentru timpul acordat.

I gratefully thank to the wonderful team from WageningenUR, Food and Biobased Research, for their hospitality, helpful advices and assistance in conducting experiments along the internship at this university. My special thanks go to Marinella, Guus and Ben. I would also acknowledge Dr Ivo Eggen and Dr. Dirk-Jan van Zoelen from Merck & Co., Netherlands, for useful discussions and supporting material during the doctoral internship.

Doresc să mulțumesc de asemenea doamnei Asist. Dr. Ing. Cristina Paul pentru tot sprijinul acordat de-a lungul elaborării tezei de doctorat. Mulțumesc tuturor colegilor din catedra de biocataliză, Ramo, Firuța, Miha, Anca, Ana și Andrada, pentru multiplele încurajări și sfaturi colegiale deosebit de utile. Mulțumesc doamnei Dr. Paula Sfârloagă de la Institutul Național de Electrochimie și Materie Condensată Timișoara pentru analizele SEM și domnului Dr. Ing. Valentin Ordodi de la Universitatea de Medicină și Farmacie Timișoara pentru analizele de fluorescență.

Nu în ultimul rând doresc să mulțumesc și sunt profund recunoscătoare familiei mele care a avut încredere în mine și m-a sprijinit pe toată perioada derulării stagiului de doctorat, părinților mei fiindu-le dedicată această reușită. Mulțumesc de asemenea prietenului meu care mi-a fost alături în toți acești ani.

Sper ca de-a lungul vieții, experiențele stagiului de doctorat să îmi fie de folos în plan personal și să îmi aducă împliniri pe plan educațional și profesional.

Timișoara, decembrie 2011

Livia Nicoleta Corici

Părinților mei

Corâci, Livia Nicoleta

Utilizarea alcalazei imobilizate în sinteza peptidelor

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 56, Editura Politehnica, 2011, 156 pagini, 78 figuri, 45 tabele.

ISSN: 1842-8223

ISBN: 978-606-554-419-2

Cuvinte cheie: peptide biologic active, alcalaza, entrapare în sol-gel, amidare, deprotecție

Rezumat:

În ultimii ani s-a îndreptat atenția asupra dezvoltării și obținerii unor noi procese și produse ecologice cu impact redus asupra mediului înconjurător și sănătății umane, dar viabile din punct de vedere economic. Sinteza enzimatică a peptidelor cu efect terapeutic s-a dovedit într-o serie de procese o alternativă promițătoare pentru industria farmaceutică. Producția la scară industrială este favorizată de folosirea enzimelor imobilizate, deoarece acestea oferă o serie de avantaje comparativ cu cele solubile: condiții blânde de reacție, reutilizarea biocatalizatorului, evitarea autolizei enzimei care ar putea determina formarea metaboliților secundari.

Cercetările efectuate în cadrul tezei de doctorat au urmărit obținerea de noi biocatalizatori pentru modificarea peptidelor la gruparea carboxil terminală. S-a pus accent pe imobilizarea alcalazei în matrici siliconice de sol-gel, optimizarea metodei de imobilizare, caracterizarea preparatelor enzimatiche obținute și optimizarea condițiilor proceselor de hidroliză și amidare ale grupării carboxilice C-terminale a peptidelor în vederea obținerii unei eficiențe catalitice maxime și a unei selectivități ridicate. S-a studiat structura morfologică, iar enzima imobilizată a fost caracterizată prin determinarea activității catalitice, stabilității termice, operaționale și de condiționare a enzimei. De asemenea, s-a studiat reproductibilitatea metodei de imobilizare, iar alcalaza imobilizată prin tehnica de sol-gel a fost standardizată pentru aplicații în sistemele continue.

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijin parțial din grantul strategic POSDRU/6/1.5/S/13, ID6998, cofinanțat din Fondul Social European "Investește în oameni", în cadrul Programului Operațional Sectorial Dezvoltare Resurse Umane 2007-2013.

Mulțumiri deosebite Universității din Wageningen (Wageningen UR Food & Biobased Research), pentru acordarea dreptului de utilizare a echipamentelor și materialelor necesare realizării experimentelor care au dus la finalizarea tezei de doctorat.

CUPRINS

	Introducere	
	Abrevieri	
1.	STUDIUL DE LITERATURĂ	13
1.1.	Introducere. Importanța tezei	13
1.2.	Noțiuni generale despre „chimia verde”	15
1.3.	Biocatalizatori enzimatici. Hidrolaze	16
1.4.	Peptide – structură, proprietăți, aplicații	17
1.5.	Metode de sinteză a peptidelor	20
1.5.1.	Sinteza chimică	21
1.5.2.	Obținerea peptidelor prin hidroliza enzimatică a proteinelor	26
1.5.2.1.	Enzime proteolitice	26
1.5.2.2.	Determinarea activității proteazelor	27
1.5.2.3.	Metode folosite pentru îmbunătățirea proprietăților proteazelor	28
1.5.2.4.	Serin-proteaze – mecanism catalitic	30
1.5.2.5.	Subtilizina – structură și proprietăți	32
1.5.2.6.	Peptide active biologic obținute prin hidroliza enzimatică a proteinelor	34
1.5.3.	Sinteza enzimatică	36
1.6.	Procese industriale de obținere a peptidelor	40
1.6.1.	Procese chimice industriale	40
1.6.2.	Procese enzimatiche industriale	41
1.7.	Modificarea peptidelor la carbonul C-terminal	43
1.7.1.	Amidarea	43
1.7.2.	Deprotecția enzimatică a carboxilului terminal	47
1.8.	Imobilizarea enzimelor	49
1.8.1.	Imobilizarea prin entrapare	49
1.8.1.1.	Activitatea enzimelor entrapate	50
1.8.1.2.	Stabilitatea enzimelor entrapate	51
1.8.1.3.	Selectivitatea enzimelor entrapate	52
1.8.2.	Tehnica de imobilizare a enzimelor în sol-gel	53
1.8.3.	Aplicațiile enzimelor imobilizate în procesele continue	56
1.9.	Concluzii	58
2.	CONTRIBUȚII ORIGINALE	59
2.1.	Caracterizarea enzimelor native studiate	60

2.1.1.	Electroforeza pe gel de poliacrilamidă	60
2.1.2.	Cromatografia de excluziune sterică	62
2.1.3.	Concluzii parțiale	66
2.2.	Studiul reacțiilor de hidroliză selectivă a peptidelor catalizate de alcalaza imobilizată	67
2.2.1.	Influența mediului de reacție asupra eficienței catalitice a alcalazei imobilizate	67
2.2.2.	Influența mediului de reacție asupra scindării regioselective a peptidelor	68
2.2.3.	Studiul cinetic al hidrolizei enzimatică a esterilor <i>terț</i> -butilici ai peptidelor	70
2.2.4.	Hidroliza enzimatică a Z-Ala-Phe-OBu ^t catalizată de alcalaza imobilizată prin metoda sol-gel. Influența naturii silanilor precursori asupra eficienței biocatalizatorilor	74
2.2.5.	Concluzii parțiale	77
2.3.	Studiul reacției de amidare a esterilor C-terminali ai peptidelor catalizată de alcalaza nativă sau imobilizată prin tehnica de sol-gel	77
2.3.1.	Selectarea proteazelor	78
2.3.2.	Reproductibilitatea diferitelor loturi de alcalază	79
2.3.3.	Imobilizarea alcalazei în matrici de sol-gel derivate de TMOS sau TEOS	80
2.3.4.	Influența naturii silanilor precursori asupra eficienței biocatalizatorilor în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe	82
2.3.5.	Studiul reproductibilității metodei de imobilizare în sol-gel	86
2.3.6.	Influența concentrației de enzimă asupra eficienței catalitice a alcalazei imobilizate prin metoda sol-gel	88
2.3.7.	Studiul influenței raportului molar al silanilor precursori asupra eficienței biocatalizatorilor	90
2.3.8.	Cinetica reacției de amidare a Z-Ala-Phe-OMe catalizată de alcalaza nativă și imobilizată	92
2.3.9.	Influența raportului molar al silanilor precursori asupra eficienței catalitice a alcalazei imobilizate în sisteme terțiare de MeTMOS, DMDMOS și TMOS	95
2.3.10.	Influența naturii suportului solid asupra eficienței catalitice a alcalazei imobilizate prin entrapare combinată cu adsorbție	98
2.3.11.	Concluzii parțiale	99
2.4.	Stabilitatea Alcalazei native și imobilizate în reacția de amidare	100
2.4.1.	Studiul stabilității în timp a preparatelor enzimatică	100
2.4.2.	Studiul stabilității termice a preparatelor enzimatică	102
2.4.3.	Studiul reutilizării preparatelor enzimatică în mediu de solvent organic în system discontinuu	104
2.4.4.	Studiul stabilității operaționale a alcalazei imobilizate în system continuu	106
2.4.5.	Concluzii parțiale	108
2.5.	Caracterizarea morfologică a biocatalizatorilor obținuți prin metoda sol-gel	109
2.5.1.	Microscopia electronică de scanare (SEM)	109
2.5.2.	Spectroscopia FTIR	114
2.5.3.	Microscopia cu fluorescență	118

2.5.4.	Concluzii parțiale	123
3.	PARTEA EXPERIMENTALĂ	124
3.1.	Metode de imobilizare a enzimelor	124
3.1.1.	Imobilizarea enzimelor prin entrapare în sol-gel	124
3.1.2.	Imobilizarea enzimelor prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție	124
3.2.	Metode de analiză	125
3.2.1.	Metoda Bradford de determinare a proteinelor	125
3.2.2.	Analiza cromatografică de lichide de înaltă performanță (HPLC)	126
3.2.3.	Electroforeza proteinelor pe gel de poliacrilamidă	127
3.2.4.	Analiza cromatografică de excluziune (SEC)	127
3.2.5.	Microscopia electronică de scanare (SEM) cuplată cu spectrometria de raze X cu dispersie de energie (EDX)	129
3.2.6.	Spectroscopia FTIR	130
3.2.7.	Marcarea proteinelor cu fluorocromi	130
3.2.8.	Metoda spectrofotometrică de determinare a activității subtilizinei A native	131
3.3.	Reacția de amidare enzimatică a Z-Ala-Phe-OMe	132
3.4.	Hidroliza enzimatică a esterilor <i>terț</i> -butilici C-terminali ai peptidelor	133
3.5.	Reutilizarea preparatelor enzimaticice imobilizate în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe	133
3.6.	Utilizarea preparatelor enzimaticice imobilizate în system continuu	134
4.	CONCLUZII FINALE	135
	BIBLIOGRAFIE	138
	ANEXE	145
	LISTA DE LUCRĂRI	153

INTRODUCERE

Intensificarea normelor de sănătate și siguranță a determinat căutarea intensivă a alternativelor biotehnologice de sinteză a peptidelor folosite în industria alimentară și în medicină. În ultimul deceniu s-a pus accentul pe dezvoltarea noilor metode de producție pe scară largă a peptidelor biologic active cu ajutorul proteazelor. Datorită proprietăților antitrombotice, antihipertensive, imunomodulatoare și antioxidante, aceste peptide sunt considerate agenți cu potențial efect terapeutic, unele dintre acestea fiind deja utilizate drept agenți terapeutici. Majoritatea metodelor convenționale, de exemplu metodele sintetice și biotehnologice folosite pentru producerea peptidelor cu efect terapeutic, sunt relativ costisitoare. Prin urmare, lipsa proceselor comercial viabile pentru producția pe scară largă a peptidelor a reprezentat un obstacol major pentru aplicațiile acestora ca agenți terapeutici.

Peptidele biologic active pot fi obținute atât prin hidroliza enzimatică a proteinelor, cât și prin sinteza enzimatică a peptidelor. Principalul dezavantaj al hidrolizei proteice îl reprezintă faptul că se obțin amestecuri de oligopeptide, polipeptide și aminoacizi liberi, procesul de separare a acestora devenind complicat datorită diversității componentelor amestecului de reacție. Specificitatea ridicată a proteazelor a condus însă, la creșterea interesului în dezvoltarea de noi metode de sinteză pe cale enzimatică a peptidelor. Astfel, s-a pus problema dezvoltării unor noi biocatalizatori stabili și reproductibili, astfel încât procesul de obținere a peptidelor să devină eficient și economic. Acesta este motivul pentru care cercetările cuprinse în această teză sunt consacrate dezvoltării unor noi metode enzimatic de modificare a peptidelor.

Scopul principal al acestei teze de doctorat a fost obținerea de noi biocatalizatori pentru deprotecția și amidarea grupării C-terminale a peptidelor. S-a pus accent pe imobilizarea alcalazei în matrici siliconice de sol-gel, optimizarea metodei de imobilizare, caracterizarea preparatelor enzimatic obținute și optimizarea condițiilor proceselor de modificare ale grupării carboxilice C-terminale a peptidelor. S-au studiat mai mulți precursori silanici, dintre aceștia, tetrametoxisilan (TMOS) și derivați silanici de forma $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$, unde R poate fi alchil-, aril-, dialchil- sau alchil-aril- în sisteme omogene și hibride pentru a evalua efectul catenei laterale asupra structurii matricei, asupra activității și stabilității enzimei. S-a studiat structura morfologică, iar enzima imobilizată a fost caracterizată prin determinarea activității catalitice, stabilității termice, operaționale și de condiționare a enzimei. De asemenea, s-a studiat reproductibilitatea metodei de imobilizare, iar imobilizarea alcalazei prin tehnica sol-gel a fost standardizată pentru aplicații în sistem continuu.

Teza de doctorat este structurată în patru părți:

- **1. Studiu de literatură** - în care este detaliat stadiul actual al cunoașterii în domeniul sintezei peptidelor biologic active, importanța temei, structura și proprietățile serin-proteazelor, metode de sinteză chimică și enzimatică a peptidelor, aplicațiile industriale ale noilor procese bazate pe modificarea și sinteza peptidelor.

- **2. Contribuții originale** - detaliază rezultatele obținute pe parcursul cercetărilor experimentale, cuprinzând obținerea de noi biocatalizatori pentru modificarea peptidelor și caracterizarea preparatelor enzimatic obținute.
- **3. Partea experimentală** - prezintă procedurile experimentale folosite în modificarea carboxilului terminal al peptidelor, a imobilizării protezei alcalază, precum și metodele de analiză folosite.
- **4. Concluzii finale** - rezultate din studiile experimentale în conformitate cu obiectivele stabilite.

ABREVIERI

Ala	alanină
Alcalază 2,4L FG	preparat comercial produs de tulpina <i>Bacillus licheniformis</i>
Alcalază 2,5L DX	preparat comercial produs de tulpina <i>Bacillus licheniformis</i>
Alcalază-CLEA	alcalaza imobilizată CLEA (CLEA-Technologies)
APT MOS	3-aminopropiltrimetoxisilan
Arg	arginină
Asn	asparagină
Asp	acid aspartic
Boc	gruparea <i>terț</i> -butiloxicarbonil
Bzl	gruparea benzil
CaL-B	lipaza din <i>Candida antarctica</i> B
Cbo	gruparea benziloxicarbonil
CLEA	cross-linked enzymes aggregates
CLEC	cross-linked enzymes cristals
CRL	lipaza din <i>Candida rugosa</i>
Cys	cisteină
DMD MOS	dimetildimetoxisilan
DMF	dimetilformamidă
DMSO	dimetilsufoxid
FITC	isotiocianatul de fluoresceină
Fmoc	gruparea 9-fluorenilmetiloxicarbonil
Gln	glutamina
Glu	acid glutamic
Gly	glicină
His	histidină
<i>i</i> -BuT MOS	<i>i</i> -butiltrimetoxisilan
Ile	izoleucina
k_{cat}	constanta catalitică
k_{cat}/K_M	eficiența catalitică a biocatalizatorului
K_M	constanta Michaelis-Menten
Leu	leucină
Lys	lizină
Met	metionină
MeT MOS	metiltrimetoxisilan
Moz	N- α -4-metoxibenziloxicarbonil
MPD MOS	metilfenildimetoxisilan
N-CBz	gruparea N-benziloxicarbonil
-OBu ^t	esterul <i>terț</i> -butilic
Oct MOS	octiltrimetoxisilan
-OEt	esterul etilic
-OMe	esterul metilic
PEG	polietilenglicol
Phe	fenilalanină
PhT MOS	feniltrimetoxisilan
Pro	prolină
PrT MOS	propiltrimetoxisilan

PVA	polivinilalcool
SEM	microscopie electronică de baleiaj
Ser	serină
Subtilizina A	subtilizina Carlsberg din <i>Bacillus licheniformis</i>
<i>t</i> -BuOH	<i>terț</i> -butanol
TEOS	tetraetoxisilan
Thr	treonină
TMOS	tetrametoxisilan
Trp	triptofan
Tyr	tirozină
Val	valină
V_{max}	viteza maximă a reacției enzimaticе
VMOS	viniltrimetoxisilan

1. STUDIU DE LITERATURĂ

1.1. Introducere. Importanța tezei

Peptidele reprezintă agenți terapeutici importanți datorită proprietăților unice și diversității chimice și biologice. În organismele vii acestea joacă rolul de mediatori și regulatori ai funcțiilor biologice vitale. În prezent, sunt utilizate în tratamentul cancerului, bolilor cardiovasculare și metabolice, ca inhibitori ai ACE (angiotensin converting enzyme) în cazul presiunii scăzute a sângelui, ca agenți antivirali și antimicrobieni și ca hormoni. Noile tehnologii industriale de obținere a insulinei umane, principalul hormon cu acțiune hipoglicemiantă, au fost posibile prin aplicarea tehnologiei ADN recombinant. Alte aplicații ale peptidelor sunt: ca îndulcitori (aspartamul), suplimente alimentare și produse cosmetice anti-îmbătrânire.

Necesitatea unor noi abordări terapeutice a determinat extinderi masive în tehnologia de fabricare a peptidelor. Prin urmare, în ianuarie 2004 au fost sintetizate 400 de peptide la nivel mondial. Dezvoltarea s-a datorat îmbunătățirii tehnologiilor de fabricare – obținerea pe cale sintetică, recombinantă și transgenică – precum și noilor tehnici care s-au dovedit a face peptidele mult mai stabile. Analistii au estimat o creștere anuală de 8% în decursul a zece ani, la un volum al pieței de 11,5 bil. euro în 2013. De asemenea se așteaptă o creștere aproape dublă pe piață a peptidelor ca ingrediente farmaceutice active.

Dezvoltarea peptidelor cu efect terapeutic nu înseamnă doar descoperirea peptidei potrivite, ci și îmbunătățirea tehnologiei de fabricație, creșterea productivității, reducerea costurilor de producție, precum și realizarea unor noi tehnici de condiționare astfel încât peptidele să își mențină stabilitatea și activitatea în organism.

În ultimii ani, s-a îndreptat atenția asupra utilizării enzimelor în sinteza peptidelor. Enzimele sunt catalizatori ideali pentru sinteza peptidelor datorită selectivității ridicate, simplificând astfel foarte mult procesul prin reducerea etapelor de protecție și deprotecție. De asemenea, enzimele operează în condiții blânde (pH neutru, temperatură ambiantă, presiune scăzută) prevenind astfel degradarea substratului și/sau produsului de reacție (racemizarea).

Proteazele sunt enzime care fac parte din clasa hidrolazelor, fiind cei mai studiați biocatalizatori. Pepsina, o protează digestivă, izolată în anul 1837 de către Theodor Schwann din peretele stomacal, a fost prima enzimă de origine animală descoperită și de asemenea prima enzimă cristalizată de către Northrop. Activitatea proteazelor constă în hidroliza selectivă a legăturilor peptidice, proprietate care intensifică utilizarea lor în industria alimentară și de asemenea ca aditivi în industria detergenților [1]. Enzimele proteolitice prezintă de asemenea specificitate ridicată în reacțiile de sinteză a peptidelor. Abilitatea lor de a cataliza formarea legăturilor peptidice a devenit o preocupare fundamentală în dezvoltarea de noi metode de sinteză enzimatică [2]. Enzima implicată în modificarea grupării C-terminale a peptidelor este subtilizina, o alcalază care aparține clasei proteazelor serinice.

Una dintre metodele care previn degradarea enzimelor în medii neconvenționale și îmbunătățesc stabilitatea catalizatorului este imobilizarea. Printre avantajele imobilizării enzimelor se numără: reutilizarea acestora, separarea

produsului de reacție și operarea în regim continuu. O metodă promițătoare o constituie tehnica de imobilizare în sol-gel, prin care enzimele sunt entrapate (încapsulate) în interiorul unei rețele de sol-gel, inertă chimic. Procedul de formare a gelului are loc la temperatură scăzută implicând etapele de hidroliză și policondensare a precursorilor silanici. Sol-gelul și materialele ceramice rezultate nu sunt toxice, au compatibilitate biologică și nu se dizolvă în medii organice și/sau apoase, prevenind astfel pierderea enzimei entrapate. Imobilizarea enzimelor prin entrapare în sol-gel s-a dovedit astfel cea mai eficientă metodă, având următoarele avantaje: înglobarea unei cantități mari de enzimă, stabilitate termică și operațională ridicată, controlul dimensiunii porilor, minimizarea forțelor de legătură între enzimă și suport care ar putea duce la modificări conformaționale și inactivarea enzimei [3].

Sangeanta și colaboratorii au raportat imobilizarea subtilizinei, enzimă aparținând clasei proteazelor serinice, în matrici de sol-gel utilizând precursori alcoxilani cu diferite lungimi ale catenelor laterale. Eficiența de entrapare a enzimei în sol-gel a fost de 80%, iar biocatalizatorul obținut a avut o activitate de 50% față de activitatea inițială chiar și după 11 reutilizări. Aceasta enzimă imobilizată a fost utilizată în sinteza peptidelor folosind ca mediu de reacție un amestec de acetone:dimetilformamidă și lichidul ionic: hexafluorofosfat de 1-butil-3-metilimidazoliu [4].

Preparatul comercial alcalază, având ca și componentă principală subtilizina, s-a dovedit a fi cel mai eficient în sinteza peptidelor. Acest biocatalizator a fost utilizat cu succes în sinteza tripeptidului RDG (Bz-Arg-Gly-Asp(-NH₂)-OH) prin combinarea metodei chimice și enzimice [5]. S-a demonstrat astfel că alcalaza este foarte stabilă în etanol, fiind astfel biocatalizatorul potrivit pentru sinteza peptidelor conținând aminoacizi hidrofilici. Sinteza s-a realizat la o temperatură de 35°C, în amestec de etanol/tampon TRIS-HCl (85:15), la pH 8, iar randamentul după 8 ore a fost de 73,6% [5]. Polimerul hidrofilic de origine naturală, chitosan, obținut prin deacetilarea polizaharidei chitină, a fost folosit ca suport pentru imobilizarea subtilizinei Carlsberg. Enzima a fost imobilizată atât în interiorul gelului, cât și pe suprafața suportului prin legături covalente, respectiv necovalente. Capacitatea chitosanului de a forma filme subțiri cu suprafețe diferite a determinat obținerea unor biocatalizatori rezistenți la majoritatea solvenților, separarea ușoară a produsului și reutilizarea. Aceste preparate s-au folosit la sinteza unei tetrapeptide cu un randament de 100% după 40 de minute de reacție [6].

Studiile recente au demonstrat că subtilizina nativă sau imobilizată prin înrețelare cu formare de agregate, este un catalizator excelent în deprotecția selectivă a *tert*-butil esterilor peptidici C-terminali și în sinteza derivaților peptidici prin modificarea grupării carboxilice terminale (exemplu: amidarea și sinteza diferiților esteri prin transesterificare). Catalizatorul cel mai eficient a fost alcalaza imobilizată prin înrețelare cu formarea unui agregat (CLEA - cross-linked enzymes aggregates). Alte proteaze și enzime hidrolitice cum sunt lipazele nu au avut eficiență catalitică [7, 8, 9, 10]. Una din problemele care au fost întâlnite a fost variația largă a eficienței catalitice a diferitelor șarje de alcalază imobilizată. Această reproductibilitate scăzută în calitatea enzimei imobilizate poate fi datorată variației compoziției și proprietăților diferitelor loturi de alcalază utilizate la imobilizare, precum și reproductibilității și controlului scăzut al imobilizării enzimelor prin înrețelare. Din această cauză, este necesar studiul imobilizării alcalazei, descoperirea unui catalizator insolubil, robust și eficient în aplicațiile industriale ale sintezei peptidelor.

1.2. Noțiuni generale despre "chimia verde"

Chimia verde este denumită chimia curată cu impact redus asupra mediului, o nouă filozofie de a gândi, care poate fi folositoare în dezvoltarea și obținerea de noi procese și produse ecologice. De asemenea, reprezintă încercarea de a preveni poluarea, de a reduce sau elimina utilizarea și producerea substanțelor periculoase care pot avea efecte nocive asupra omului și a mediului înconjurător [11]. Chimia verde încearcă astfel să reducă și să prevină poluarea în procesele chimice ca atare. Aceasta implică mai multe sub-discipline ale chimiei, cum ar fi chimia organică, chimia anorganică, chimia fizică, chimia analitică, biochimia și ingineria chimică. Printre principalele concepte preconizate se numără: proiectarea proceselor chimice prin care se încearcă maximizarea cantității de materii prime transformate în produs final, utilizarea ori de câte ori este posibil a solvenților nedăunători mediului, proiectarea proceselor eficiente din punct de vedere energetic, elaborarea de noi metode eficiente pentru gestionarea deșeurilor [12].

Paul Anastas și John Warner de la Agenția de Protecție a Mediului din Statele Unite ale Americii au elaborat cele 12 principii ale chimiei verzi care explică importanța acestora în practică [13].

1. *Reducerea cantității de deșeuri*: este de preferat să se prevină formarea deșeurilor, decât tratarea sau curățarea ulterioară a acestora.
2. *Producerea substanțelor chimice mai puțin periculoase*: producerea substanțelor chimice mai puțin toxice, dar care să își mențină proprietățile de funcționare.
3. *Proiectarea proceselor chimice mai puțin periculoase*: conceperea metodologiilor de generare a unor substanțe netoxice sau cu toxicitate scăzută asupra omului și mediului înconjurător.
4. *Utilizarea de materii prime regenerabile*: înlocuirea materiilor prime epuizabile cu cele regenerabile, eficiente din punct de vedere tehnic și economic.
5. *Folosirea catalizatorilor în locul reactanților stoechiometrici*: catalizatorii sunt utilizați în cantitate foarte mică, fiind reutilizabili în reacțiile chimice, în timp ce reactanții stoechiometrici se utilizează în exces și nu se pot reutiliza.
6. *Evitarea derivatizării*: grupările protectoare necesită reactivi suplimentari și generează deșeuri.
7. *Maximizarea transformării materiilor prime*: metodele sintetice trebuie să fie concepute pentru a îmbunătăți valorificarea tuturor materiilor prime folosite în proces, în produsul final.
8. *Utilizarea solvenților cu risc redus*: evitarea folosirii substanțelor auxiliare (de exemplu, solvenți, agenți de separare) atunci când nu sunt necesare.
9. *Proiectarea proceselor eficiente din punct de vedere energetic*: necesarul de energie ar trebui să fie recunoscut pentru impactul său asupra economiei și mediului, de aceea trebuie redus la minim; procesele ar trebui să fie efectuate la temperatură ambiantă și presiune redusă.
10. *Evitarea folosirii substanțelor chimice care se degradează înainte de utilizare*
11. *Evitarea poluării prin realizarea analizelor în timp real*: metodele analitice trebuie efectuate în mod continuu pentru a permite monitorizarea și controlul proceselor în timp real, înainte de formarea substanțelor periculoase.

12. *Minimizarea riscurilor de accidente:* substanțele utilizate în procesele chimice trebuie să fie alese astfel încât potențialul unor accidente, cum ar fi, explozii, emanații de gaze, incendii, să fie redus la minim.

1.3. Biocatalizatori enzimatici. Hidrolaze

Reacțiile chimice care au loc în organismele vii sunt mediate de biocatalizatori cu proprietăți remarcabile, cunoscuți sub denumirea de **enzime**. Capacitatea enzimelor de a crește de până la 10^7 ori viteza unei reacții, condițiile blânde de acțiune, specificitatea și posibilitatea de reglare a activității, constituie un avantaj major al acestora, comparativ cu catalizatorii chimici. Fiecare dintre reacțiile biochimice ale metabolismului celular sunt catalizate de câte o enzimă specifică. Enzimele sunt molecule proteice, care funcționează eficient în condiții blânde necesare pentru menținerea funcționalității și integrității sistemelor biologice. Astfel, acestea sunt adaptate în mod natural pentru a funcționa în condiții fiziologice.

Aplicațiile practice ale enzimelor în diferite sectoare de activitate au condus la necesitatea obținerii unor cantități ridicate de preparate enzimatiche cu diferite activități catalitice. Nomenclatura enzimelor se bazează pe natura reacției pe care o catalizează. Astfel acestea se clasifică în șase mari clase (Figura 1.1) [14]:

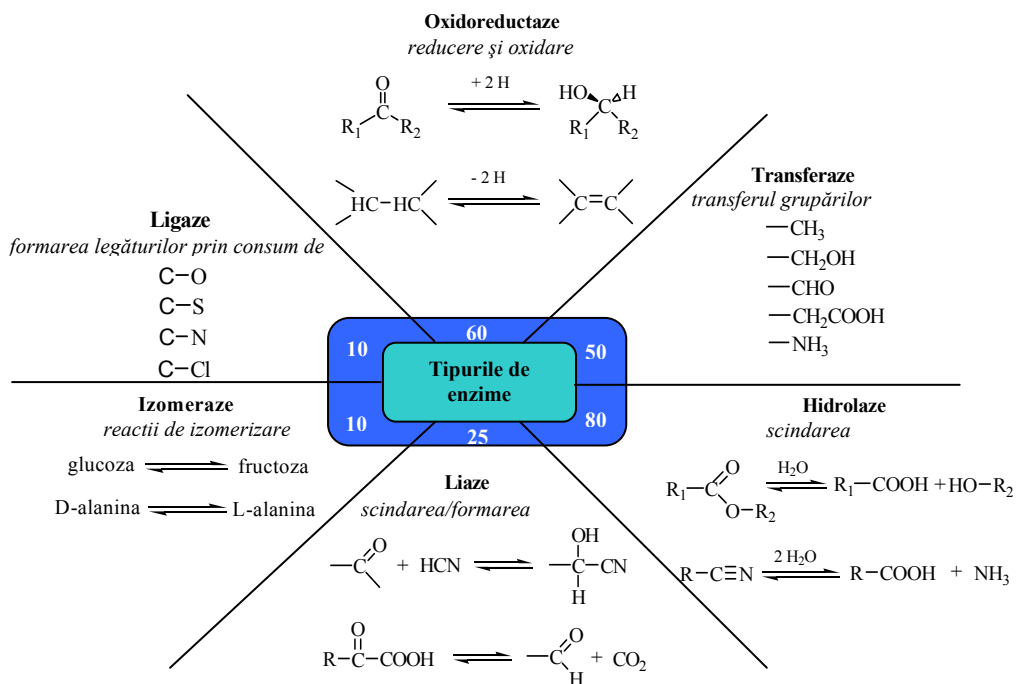


Figura 1.1. Clasificarea enzimelor

O provocare majoră în biocataliză este aceea de a transforma acești catalizatori fiziologici în catalizatori capabili să funcționeze în condiții artificiale (*in vitro*), și anume în condițiile dure ale proceselor industriale. Enzimele, ca orice alți catalizatori, acționează prin reducerea barierei de energie a reacțiilor biochimice, fără a se modifica pe parcursul acestora. Principalele avantaje și dezavantaje ale utilizării enzimelor în procesele industriale sunt prezentate în Tabelul 1.1.

Tabelul 1.1. Avantajele și dezavantajele biocatalizatorilor enzimatici

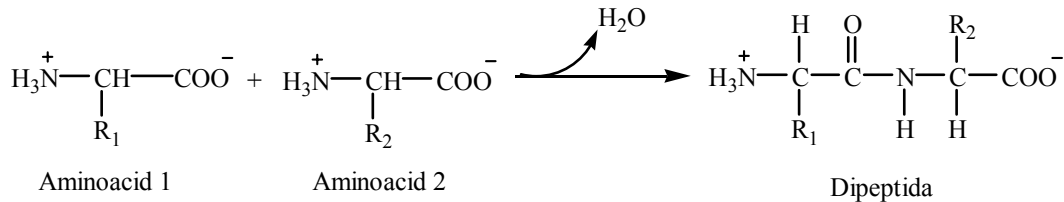
Avantaje	Dezavantaje
Specificitate ridicată	Complexitate moleculară
Activitate ridicată în condiții blânde	Costuri mari de producție
Eficiență catalitică (<i>turnover number</i>)	Fragilitate
Biodegradabilitate	
Considerate produse naturale	

Stabilizarea enzimelor în condițiile de proces reprezintă o problemă majoră în biocataliză, de aceea au fost dezvoltate mai multe strategii în vederea îmbunătățirii acestui parametru. Printre aceste se numără: modificarea chimică, imobilizarea în matrici solide, cristalizarea, agregarea, mutageneza directă, evoluția direcționată, etc. [15].

În zilele noastre, clasa hidrolazelor (EC 3.) joacă un rol important în procesele industriale enzimatiche. Hidrolazele catalizează scindarea hidrolitică a legăturilor C-O, C-N, C-C, precum și a altor legături, cum ar fi P-O în fosfați. Cele mai multe dintre aceste enzime industriale sunt utilizate în procesele de degradare a proteinelor, carbohidraților și lipidelor, în industria detergenților și industria alimentară, ca de exemplu lipaze, proteaze, nitrilaze.

1.4. Peptide – structură, proprietăți, aplicații

În natură au fost descoperiți peste 700 de aminoacizi, majoritatea dintre aceștia fiind α -aminoacizi. Bacteriile, fungi, algele și unele plante furnizează acești compuși fie în formă liberă, fie legată de molecule mari (constituenți ai peptidelor și proteinelor, compuși alchilați și esterificați). Cei 20 de aminoacizi, folosiți de către celulele vii pentru sinteza proteinelor sunt o categorie specială, fiind compuși fundamentali pentru toate formele de viață, unități structurale de bază pentru peptide și proteine. Peptidele și proteinele joacă un rol important în organismele vii și prezintă o gamă largă de proprietăți (de la activitatea hormonală a unor peptide mici, la suportul structural și protecția organismului, în cazul proteinelor). Importanța fiziologică a α -aminoacizilor asigură un interes susținut în chimie – în particular în industria farmaceutică în cazul obținerii de noi medicamente și de asemenea în sinteza și proprietățile fizice ale acestora. În plante, fungi și bacterii, α -aminoacizii sunt de asemenea utilizați ca structuri de bază în biosinteză. Majoritatea alcaloizilor sunt derivați de fenilalanină și tirozină. Pentru prima dată în 1902, Hofmeister și Fischer au arătat că în structura proteinelor, aminoacizii sunt uniți prin legături amidice secundare numite **legături peptidice**, constituite teoretic prin eliminarea unei molecule de apă dintre hidroxilul grupării carboxil al unui aminoacid și hidrogenul aminic al unui aminoacid vecin:



Structura care conține două resturi de aminoacizi se numește dipeptidă, cea care conține trei resturi tripeptidă, etc. Nomenclatura peptidelor se face pornind de la restul de aminoacid cu gruparea amino liberă (aminoacidul N-terminal) spre restul de la capătul carboxil terminal (Figura 1.2.).

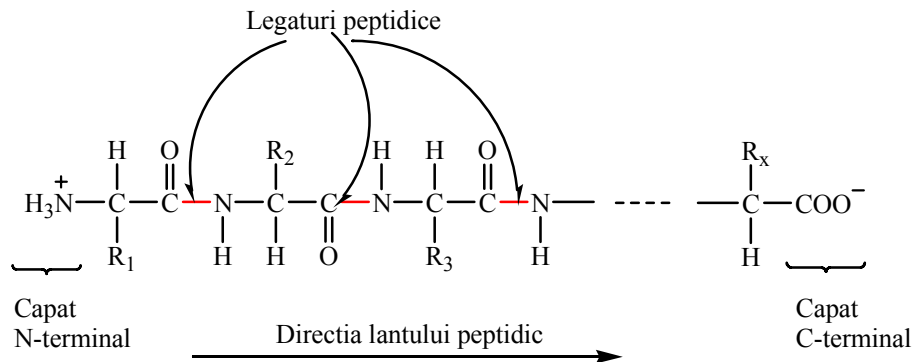


Figura 1.2. Fragment de peptidă. Legături peptidice și direcția lanțului peptidic (capăt N-terminal → capăt C-terminal)

Legătura peptidică are o serie de caracteristici care permit punerea ei în evidență. Substanța numită biuret $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ dă o reacție de culoare cu CuSO_4 în mediu alcalin, reacție pe care o dau toate substanțele care conțin legături peptidice. Proteinele manifestă spectre în infraroșu și ultraviolet îndepărtat (180-220nm) datorită acestor legături peptidice [16].

Studiile de cristalografie cu raze X ale unor polipeptide cristalizate au permis măsurători ale distanțelor interatomice într-o catenă polipeptidică, stabilind că lungimea legăturii C-O este de 1,24 Å, iar cea a legăturii C-N este de 1,32 Å, așa cum este prezentat și în Figura 1.3.

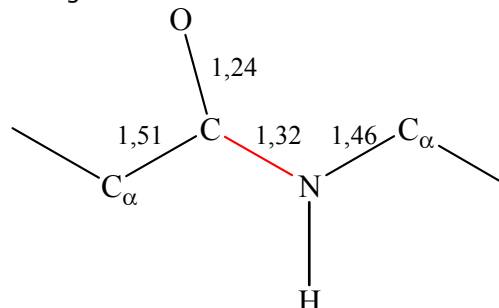


Figura 1.3. Schema legăturii peptidice

Deoarece lungimea normală a legăturii duble C=O este de 1,22 Å, iar cea a legăturii simple C-N 1,45 Å, rezultă că ambele legături sunt de fapt intermediare între legătura simplă și cea dublă. Linus Pauling a fost cel care a explicat această aparentă anomalie prin existența unor structuri de rezonanță (datorită stabilizării energiei de rezonanță formată din interacțiunea perechii de electroni a atomului de azot cu electronii n ai legăturii carbonil), sistemul de electroni n fiind de fapt delocalizat pe toți cei trei atomi O=C-N, așa cum se observă și din Figura 1.4.

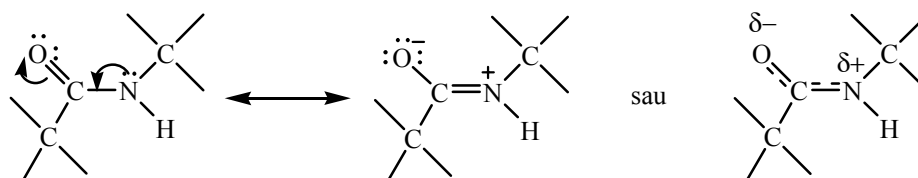


Figura 1.4. Structurile de rezonanță ale legăturii peptidice

Se poate afirma că legătura peptidică are în proporție de 60% caracter C=O și în proporție de 40% caracter C=N. Caracterul de 40% legătură dublă a legăturii carbon-azot din scheletul principal al lanțului polipeptidic înseamnă o stabilitate mai mare datorită unei energii de rezonanță cu 20 kcal/mol mai mici și o împiedicare semnificativă a liberei rotații în jurul acestei legături.

Datorită prezenței acestui fenomen de conjugare a dublei legături, cei șase atomi ai unei unități peptidice vor trebui să se găsească în același plan (să fie coplanari), ceea ce limitează configurațiile posibile pe care catena polipeptidică le poate adopta. O altă consecință a acestei planarități este existența a doi izomeri: cis, în care atomul de oxigen carbonilic și atomul de hidrogen legat de azot se găsesc de aceeași parte a axei legăturii C-N și trans, în care se găsesc de o parte și de alta a acestei axe. Din considerente termodinamice, practic toate legăturile peptidice care se întâlnesc în enzime se găsesc în configurație trans [17].

Peptidele active biologic constituie un grup divers (de la dipeptide simple la structuri complexe liniare sau ciclice), cu proprietăți fiziologic active, antibiotice și antivirale, neuroactive, imunoactive, inhibitori de enzimă și hormoni [18]. În ultimii ani, un număr impresionant de peptide active biologic provenite din bacterii, fungi, plante și animale au fost izolate și caracterizate. Tehnologia enzimatică a fost aplicată cu succes în sinteza unui număr mare de peptide cum ar fi: aspartamul, kiotorfina, angiotensina, encefalina și dinorfina.

În ultimele decenii s-a demonstrat că peptidele biologic active posedă anumite biofuncționalități care le conferă rolul de agenți terapeutici în organism [19, 20]. Acestea oferă o mulțime de avantaje comparativ cu moleculele mici datorită bioactivității și biospecificității către ținte, spectrului larg de acțiune terapeutică, toxicității scăzute, diversității structurale și absenței acumulării în țesuturi [21].

Peptidele antimicrobiene cu caracter cationic reprezintă acea clasă a peptidelor care diferă prin secvența de aminoacizi și structura secundară. Principalele caracteristici comune sunt determinate de numărul de aminoacizi din structura lanțului polipeptidic (cuprins între 12 și 50) și de masa moleculară care nu depășește 10000 Da. Aceste molecule au sarcină totală pozitivă determinată de resturile de arginină, activitate antimicrobiană, anticancerigenă și de vindecare a rănilor. Pe baza analizelor relaționale structură-activitate s-a demonstrat că activitatea antimicrobiană a acestor peptide este determinată de: sarcina pozitivă și caracterul amfipatic indus [22]. Această proprietate le permite să interacționeze

simultan cu lipidele și moleculele încărcate negativ prin intermediul grupărilor cationice, atașându-se astfel de membranele microbiene. Activitatea antimicrobiană poate fi asociată cu structura secundară și numărul resturilor de arginină din structura peptidică. Lesmes și colaboratorii [23] au demonstrat că fragmentele peptidice derivate din protamină au activitate diferită comparativ cu secvența parentală. Aceste fragmente păstrează un domeniu bogat în resturi de arginină (RRRR) care se poate asocia cu activitatea antimicrobiană, în special asupra bacteriilor gram-negative. Această proprietate poate fi asociată și cu structura secundară, conform analizelor de dicroism circular.

O importanță deosebită o reprezintă subclasa peptidelor bogate în resturi de arginină și triptofan, de exemplu indolicidina și tripticina. Prin proprietățile chimice ale acestor aminoacizi, devin componente adecvate peptidelor antimicrobiene. Triptofanul are o preferință distinctă pentru regiunea aflată la interfața straturilor bistratificate ale lipidelor, în timp ce arginina conferă sarcina cationică și determină formarea legăturilor de hidrogen necesare pentru interacțiunea cu componentele anionice ale membranelor bacteriene. Împreună, aceste două reziduuri sunt capabile să participe la interacțiuni π -cationice, îmbunătățind astfel interacțiunile peptidă-membrană [24].

Bertin și colaboratorii [25] au identificat și purificat o aminopeptidază din *Borrelia burgdorferi* care a fost ineficientă în sinteza aminoacizilor. Aminopeptidaza termofilică a acestei specii a jucat rolul de furnizare a aminoacizilor. Vazquez și colaboratorii [26] au sintetizat o nouă 4-(N,N'-dimetilamino)ftalimidă pentru sinteza peptidelor în fază solidă. Incorporarea acesteia în interiorul lanțurilor peptidice a avut o importanță deosebită pentru aplicațiile biologice, și anume în detectarea interacțiunilor proteină-proteină.

1.5. Metode de sinteză a peptidelor

1.5.1. Sinteza chimică

Sinteza unei dipeptide cu structura $\text{NH}_3^+\text{CHR}^1\text{CONHCHR}^2\text{COO}^-$ pornind de la aminoacizii constituenți implică formarea legăturii peptidice. În scopul obținerii unei structuri corecte și pentru a preveni formarea unui amestec de peptide mai lungi, gruparea aminică N-terminală și gruparea carboxil C-terminală sunt protejate. În general, sinteza unei dipeptide implică patru etape (Figura 1.5):

- I. protejarea grupărilor N- și C-terminale, cât și a celor reactive din catenele laterale;
- II. activarea grupării carboxilice a aminoacidului N-terminal și formarea legăturii peptidice;
- III. formarea legăturii peptidice;
- IV. deprotecția selectivă sau totală a grupărilor protectoare.

Etapa I

Pentru ca sinteza peptidică dorită să fie realizată, grupările funcționale ale lanțului principal, precum și din catenele laterale, care nu sunt implicate în reacție,

trebuie să fie protejate selectiv. Cele mai importante grupări protectoare folosite în sinteza chimică a peptidelor sunt descrise după cum urmează:

a) Grupări amino protectoare

Cbo sau *Z*. Gruparea benziloxycarbonil suferă foarte ușor scindarea homolitică în procesul de hidrogenarea catalitică. În general hidrogenarea are loc în prezența Pd depus pe cărbune, ca și catalizator. Există de asemenea și alte metode care se folosesc, de exemplu, reducerea cu Na în amoniac lichid și acidoliza.

Boc. Gruparea *terț*-butiloxycarbonil este similară cu gruparea *Cbo*, doar că restul benzil este înlocuit cu *terț*-butil. Această grupare poate fi scindată mai ușor de către acidul trifluoracetic, datorită cationului stabil care se formează în urma efectului inductiv respingător de electroni (I+) al celor trei grupări metilice.

Fmoc. Gruparea 9-fluorenilmetiloxycarbonil poate fi îndepărtată prin sustragerea protonului cu ajutorul aminelor secundare. Cele mai recomandate baze sunt piperidina și dietilamina.

b) Grupări carboxil protectoare

Metoda generală pentru protejarea grupării carboxil-terminală este esterificarea.

Esterul metilic (-OMe) și esterul etilic (-OEt). Acești esteri se obțin prin introducerea acidului clorhidric într-o suspensie alcoolică a aminoacidului sau prin adăugarea aminoacidului într-o soluție de clorură de tionil și metanol, răcită în prealabil. În general, esterii metilici și etilici sunt ușor hidrolizați în mediul alcalin.

Esterul terț-butilic (-OBu^t). Esterii *terț*-butilici se obțin prin adăugarea izobutenei la gruparea carboxilică sau prin reacția de transesterificare a esterilor acizilor carboxilici cu acetat de *terț*-butil. Sunt în general rezistenți la atacul nucleofil și de asemenea la hidroliza în mediul bazic și slab acid. Totuși, gruparea *terț*-butil esterică se poate îndepărta în mediu puternic acid, cum ar fi soluții diluate de acid clorhidric sau acid trifluoracetic.

Etapa a II-a

Formarea legăturii peptidice între doi aminoacizi necesită un aport de energie destul de ridicat. De aceea, grupările carboxil sau amino terminale trebuie activate pentru a evita folosirea temperaturilor ridicate. Până în prezent, nu a fost demonstrată activarea grupării aminice terminale. Activarea grupării carboxil se realizează prin înlocuirea grupării hidroxil cu un substituent (X) cu deficit în electroni. Acest substituent poate intensifica polarizarea grupării carbonil și, prin urmare, electrofilicitatea atomului de carbon. Astfel, atacul nucleofil al grupării aminice este îmbunătățit.

Etapa a III-a

Legătura peptidică este formată prin reacția de cuplare a componentei carboxilice a unui aminoacid cu cea aminică a celuilalt aminoacid. Metodele de cuplare sunt specificate mai jos:

Activarea sub formă de azidă. Această metodă este des întâlnită în sinteza peptidelor. Pentru activare se folosesc: acidul azotos, difenilfosforilazida, nitriții etc.

În cele mai multe cazuri de cuplare prin activare sub formă de azidă racemizarea este minimă. De aceea această metodă este folosită în procesul de cuplare a fragmentelor peptidice.

Utilizarea anhidridei mixte. Folosirea unui aminoacid cu gruparea amino protejată sau a anhidridei simetrice a unei peptide poate fi uneori un proces nerentabil din punct de vedere economic deoarece doar jumătate din acesta este exploatat pentru formarea legăturilor peptidice. În locul acestora se utilizează anumite anhidride asimetrice, care reacționează cu componentele aminice doar la gruparea carbonilică a componentei N-protejate.

Utilizarea carbodiimidei. Agentul de cuplare, dicitlohexilcarbodiimida (DCC), reacționează cu gruparea carboxilică a componentei aminice, având loc activarea cât și cuplarea în același timp. Aminele reacționează de asemenea cu carbodiimida, dar viteza acestui proces este neglijabilă în comparație cu cea observată în cazul aditiei acizilor carboxilici la dublele legături ale carbodiimidei. Prin reacția de adiție a acidului carboxilic la carbodiimidă se formează O-acil-izoureea ca intermediar. Produsul secundar de reacție, N,N'-dicitlohexilureea (DCU), format în reacție este insolubil și poate fi îndepărtat ușor prin filtrare. În anumite cazuri, poate să apară racemizarea, dar și formarea N-acil-ureei ca produs secundar. Acestea pot fi suprimate într-o anumită măsură, prin adăugarea unor compuși cu caracter nucleofil, cum ar fi 1-hidroxibenzotriazolul.

Utilizarea esterilor reactivi. Utilizarea p-nitrofenil esterilor în mod exclusiv în sinteza oxitocinei, demonstrează faptul că esterii activați se pot folosi în mod favorabil în sinteza secvențială a lanțului peptidic prin adăugarea treptată a unui singur rest de aminoacid.

Etapa a IV-a

La sfârșitul reacției de sinteză, grupările protectoare pot fi îndepărtate complet sau selectiv, în cazul în care sinteza se continuă.

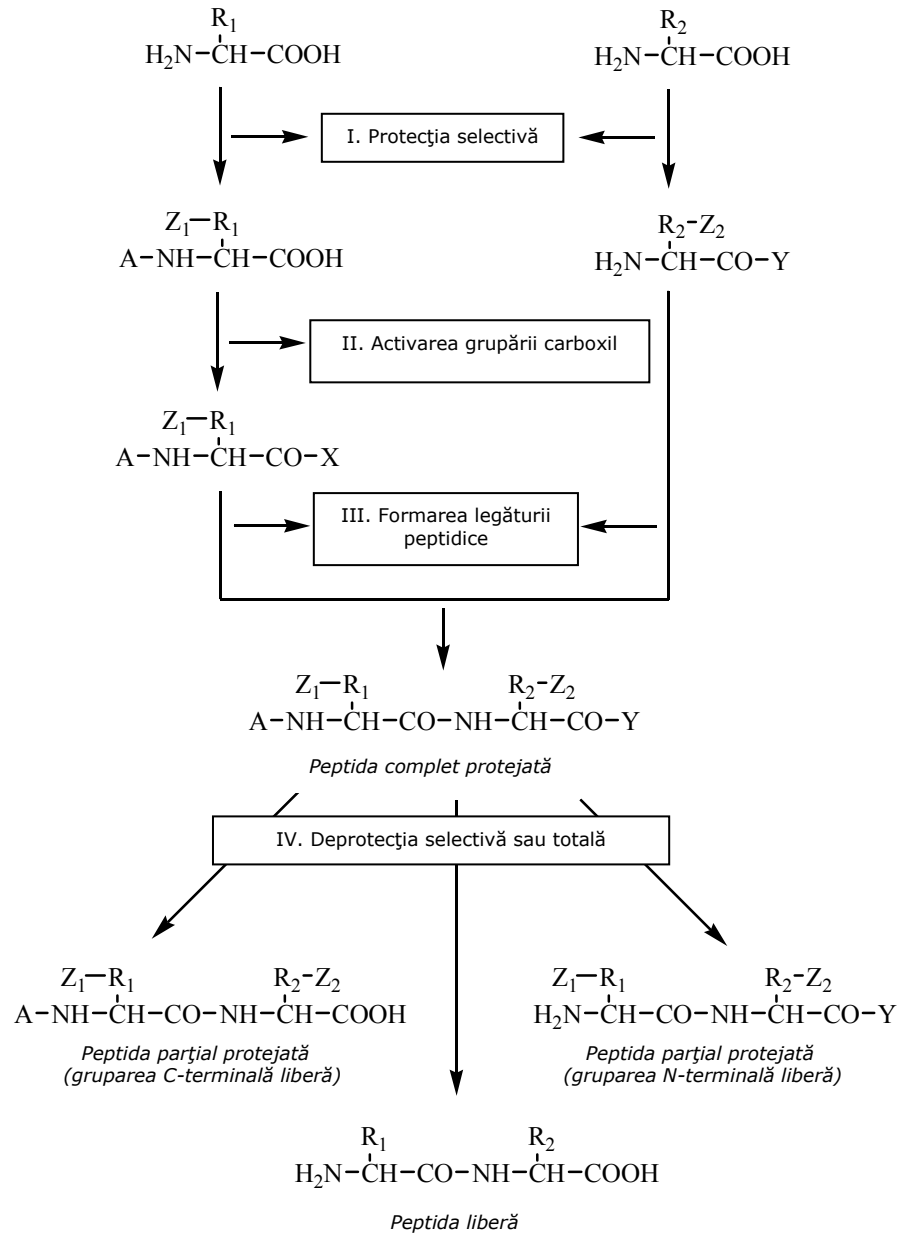


Figura 1.5. Schema generală de sinteză chimică a peptidelor; R_1 , R_2 , grupările funcționale ale catenelor laterale; A, gruparea α -amino protectoare; Y, gruparea α -carboxil protectoare; X, gruparea activantă

Dezavantajele sintezei chimice a peptidelor sunt următoarele [18]:

- fenomenul de racemizare care are loc în timpul formării legăturilor peptidice;

- protejarea catenelor laterale ale aminoacizilor, care conduce la creșterea costurilor substraturilor și a timpului de sinteză;
- dificultatea reutilizării agentului de cuplare și a donorului acil folosit pentru a obține acilarea completă a nucleofilului;
- toxicitatea ridicată a solvenților și agenților de cuplare în cazul sintezei compușilor folosiți în alimentație.

Sinteza chimică a peptidelor a fost inițial efectuată în soluție. Cu toate acestea, o dată cu introducerea sintezei în fază solidă, această tehnologie a câștigat teren în fața sintezei în soluție [27].

Sinteza în fază solidă (SPPS) constă în elongarea lanțului peptidic legat de o matrice solidă, prin adăugarea succesivă a resturilor de aminoacizi care formează o legătură peptidică între gruparea carboxilică a aminoacidului care se adaugă și gruparea aminică a aminoacidului legat anterior de matrice. Acest procedeu poate continua până la obținerea peptidei dorite [28]. Sinteza peptidelor în fază solidă prezintă următoarele avantaje în comparație cu metoda clasică de sinteză în soluție: reacția poate fi automatizată și problemele de solubilizare ale peptidelor dispar, acestea menținându-se atașate de matricea solidă. Strategia de sinteză (*Fmoc* sau *t-Boc*), natura suportului solid, agenții de cuplare și metoda de scindare a peptidei de matrice reprezintă cele mai importante variabile ale sintezei în fază solidă. Schema generală este prezentată în Figura 1.6.

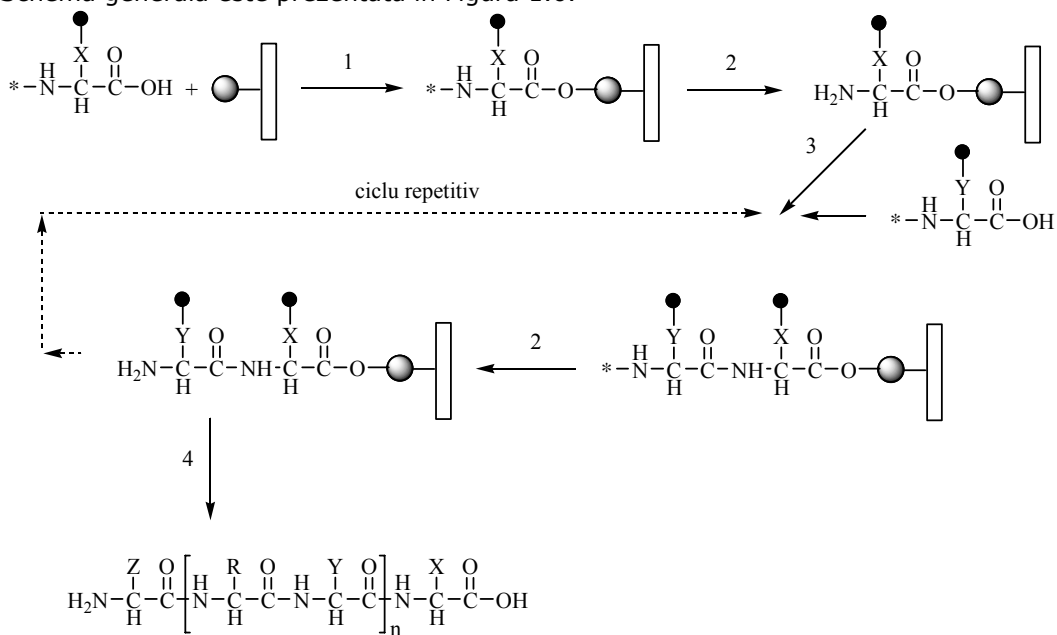


Figura 1.6. Etapele sintezei în fază solidă a peptidelor: ●: grupările protectoare ale catenelor laterale; ○: grupa funcțională a suportului solid (Cl sau NH₂); *: gruparea protectoare a grupării N-terminale; □: suportul solid; 1: reacția de cuplare a primului rest de aminoacid; 2: etapa de deprotezare a grupării N-terminale; 3: etapa de cuplare a următoarelor resturi de aminoacizi (ciclu repetitiv); 4: etapa de separare a peptidei și deprotecția catenelor laterale ale aminoacizilor

În prima etapă are loc legarea aminoacidului C-terminal de suportul solid. Gruparea protectoare N-terminală este apoi îndepărtată prin tratare cu acid trifluoracetic (în cazul metodei *t-Boc*) sau cu piperidină (în cazul metodei *Fmoc*). Următoarea etapă o reprezintă legarea peptidei nou formate de un nou aminoacid, în același timp având loc și deprotecția grupării N-terminale. Acest ciclu de cuplare-deprotecție este repetat până la obținerea secvenței dorite de aminoacizi. În final, complexul peptidă-matrice este scindat, iar grupările protectoare ale catenelor laterale sunt îndepărtate.

Suporturile solide trebuie să îndeplinească următoarele condiții: particulele trebuie să aibă dimensiune și mărime convențională, să fie rezistente mecanic, ușor de filtrat, inerte chimic, stabile în condițiile sintezei și extrem de accesibile pentru a permite extinderea lanțului peptidic în interiorul microstructurii sale. De asemenea, nu trebuie să interacționeze cu lanțul peptidic în timpul sintezei acestuia [15]. Principalele strategii folosite în sinteza peptidelor în fază solidă sunt: sinteza secvențială, sinteza convergentă și sinteza prin atașare chimică.

Sinteza secvențială presupune adăugarea treptată a aminoacizilor până la obținerea secvenței dorite. Această strategie se folosește pentru sinteza peptidelor mici, formate din maxim 50 de resturi de aminoacizi. Cu toate acestea, polipeptidele de dimensiuni mai mari pot fi construite prin tehnica de polimerizare a cisteinei, formarea dendrimerilor folosind matrici de lizină sau prin asamblarea modelelor de proteine sintetice (Template-Assembled Synthetic Protein) [29].

Sinteza convergentă presupune îmbinarea în soluție sau în fază solidă a fragmentelor peptidice obținute în prealabil prin sinteza secvențială (până la 50 de resturi de aminoacizi). Avantajul principal al acestei metode constă în faptul că, fiecare fragment peptidic este purificat și caracterizat înainte de a fi legat. Cu toate acestea, sinteza convergentă prezintă câteva dezavantaje: solubilitatea scăzută a fragmentelor protejate în mediu apos folosit la purificarea prin HPLC și în solvenții organici folosiți în reacțiile de cuplare. Un alt dezavantaj constă în viteza foarte mică a reacțiilor de cuplare a fragmentelor, în comparație cu formele activate ale aminoacizilor folosiți în sinteza secvențială și racemizarea fragmentelor în timpul procesului de cuplare. Unele din aceste probleme pot fi rezolvate prin folosirea amestecurilor de solvenți pentru a crește solubilitatea, prin mărirea timpului de reacție și utilizarea glicinei și prolinei pentru a evita problema racemizării. În acest fel, sinteza convergentă reprezintă cea mai bună opțiune pentru sinteza chimică a peptidelor și proteinelor [30].

Sinteza prin atașare chimică este o strategie deosebit de atrăgătoare folosită în sinteza chimică a peptidelor mari și a proteinelor [31, 32]. Se bazează pe legarea chimică a peptidelor scurte neprotejate, care sunt ușor de manevrat datorită solubilității ridicate în solvenții utilizați la sinteză. O serie de proteine și peptide de interes biologic au fost sintetizate prin această metodă folosind o varietate de liganzi cu formare de tioesteri [33], oxime [34], legături disulfidice sau tiazolidinice [35].

Aplicațiile peptidelor native în industria farmaceutică pot avea unele restricții datorită degradării produse de proteazele endogene, efectelor secundare nedorite datorate interacțiunilor cu diferiți receptori, permeabilității reduse a membranelor cu caracter hidrofил. Cea mai simplă abordare de rezolvare a acestei probleme este de a modifica structura catenelor laterale ale unui singur aminoacid sau a lanțului

peptidic [36]. Există un mare interes pentru această categorie de produse, datorită gamei foarte largi de proprietăți biologice, cum ar fi, activitatea imunosupresantă, antibiotică, antifungică, antiinflamatoare și antitumorale [37, 38].

1.5.2. Obținerea peptidelor prin hidroliza enzimatică a proteinelor

1.5.2.1. Enzime proteolitice

Un loc important în producția mondială de enzime îl ocupă tehnologiile care vizează obținerea de preparate proteice cu activitate proteolitică. Enzimele proteolitice constituie un grup al hidrolazelor numite peptidaze (EC 3.4), care au o caracteristică comună, aceea de a scinda legături peptidice. Aceste enzime se numesc **proteaze** și se clasifică în șase familii, în care serina, cisteina, acidul aspartic, treonina, acidul glutamic și gruparea metalică joacă rolul catalitic principal. Serin-, cistein- și treonin-proteazele diferă de proteazele glutamice, aspartice și de metalo-proteaze prin faptul că gruparea nucleofilă din centrul catalitic aparține unui rest de aminoacid. În cea de-a doua grupă, nucleofilul este reprezentat de o moleculă de apă activată. În cazul cistein-proteazelor, agentul nucleofil este o grupare sulfhidril, mecanismul catalitic fiind același ca și în cazul serin-proteazelor, în care donorul de protoni este restul de histidină [15].

Proteazele reprezintă o clasă de enzime cu rol important în procesele fiziologice. Din punct de vedere comercial, ele reprezintă 60% din totalul vânzărilor de enzime la nivel mondial (cca. 3 miliarde \$) [39]. În termeni de evoluție, aceste enzime sunt responsabile de multe procese biologice esențiale, dar în zilele noastre ele sunt de asemenea implicate într-o gamă largă de aplicații, în principal în industria alimentară și a detergenților [40, 41, 42]. Proteazele microbiene și cele din plante au fost larg utilizate în medicină și în diferite procese industriale. Proteazele sunt active în condiții blânde, pH-ul optim fiind cuprins între 6 și 8, sunt stabile, stereo- și regioselective și nu necesită cofactori [43]. Aceste proprietăți sunt destul de relevante pentru folosirea lor drept catalizatori în sintezele organice. Acest lucru este posibil deoarece proteazele pot cataliza nu doar scindarea legăturilor peptidice, ci și formarea acestora [44, 45], precum și alte reacții importante în sintezele organice, de exemplu: hidroliza regioselectivă a esterilor și rezoluția cinetică a amestecurilor racemice [46].

Proteazele conțin de obicei la suprafață un canal care leagă substratul polipeptidic. Regiunile diferite din interiorul acestui canal au fost numerotate în conformitate cu resturile de aminoacizi care se leagă și de distanța acestora față de legătura amidică care urmează să fie scindată (Figura 1.7). Astfel, gruparea acil a aminoacidului care urmează să se scindeze la poziția S_1 se notează cu P_1 . Gruparea aminică care urmează să fie eliberată aparține restului P_1' care se leagă la poziția S_1 .

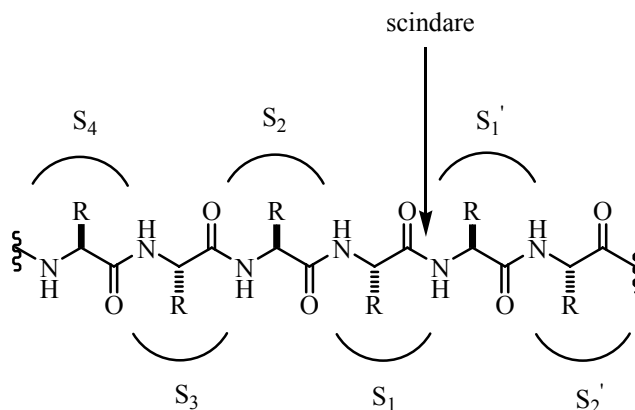


Figura 1.7. Siturile de legare ale proteazelor. Gruparea acil a lanțului amidic care urmează să fie scindată se află în pozițiile S₁, S₂, S₃ etc. ale situsurilor de legare, în timp ce gruparea aminică în pozițiile S₁' și S₂'

Spre deosebire de lipaze, proteazele acționează doar asupra substraturilor solubile. Majoritatea substraturilor folosite în sinteza organică se dizolvă doar parțial în apă, de aceea pentru solubilizarea acestora se adaugă adesea co-solvenți, cum ar fi DMF, DMSO sau acetonă. Atât subtilizinele cât și chimotripsina tolerează concentrații scăzute de solvenți organici (de obicei < 10% volum). Unii solvenți, de exemplu dioxanul, reduc drastic activitatea catalitică chiar și la concentrații scăzute [47]. Cele două aplicații majore ale proteazelor în sinteza organică sunt: hidroliza enantioselectivă a α -esterilor aminoacizilor naturali sau sintetici, precum și a altor esteri ai acizilor carboxilici și sinteza di- și oligopeptidelor prin cuplarea unui aminoacid N-protejat cu esteri peptidici. Într-o măsură mult mai mică, chimiștii organicieni folosesc proteazele și pentru hidroliza enantioselectivă a alcoolilor secundari și pentru reacții regioselective ale zaharurilor. Subtilizina, compușii înrudiți, chimotripsina și penicilin amidazele sunt serin-proteaze. Papaina este o cistein-protează, pe când acilaza, termolizina și aminopeptidaza sunt metalo-proteaze. Cercetătorii folosesc foarte rar proteazele aspartice în sintezele organice [48].

1.5.2.2. Determinarea activității proteazelor

Determinarea activității proteazelor este efectuată de obicei folosind derivați de tip p-nitrofenil ai aminoacizilor. Substraturile cromogenice reprezentative sunt prezentate în Figura 1.8 pentru tripsină, chimotripsină și subtilizină. O unitate enzimatică reprezintă cantitatea de protează care eliberează 1 μ mol de p-nitrofenilanilidă într-un minut în condițiile de reacție [49].

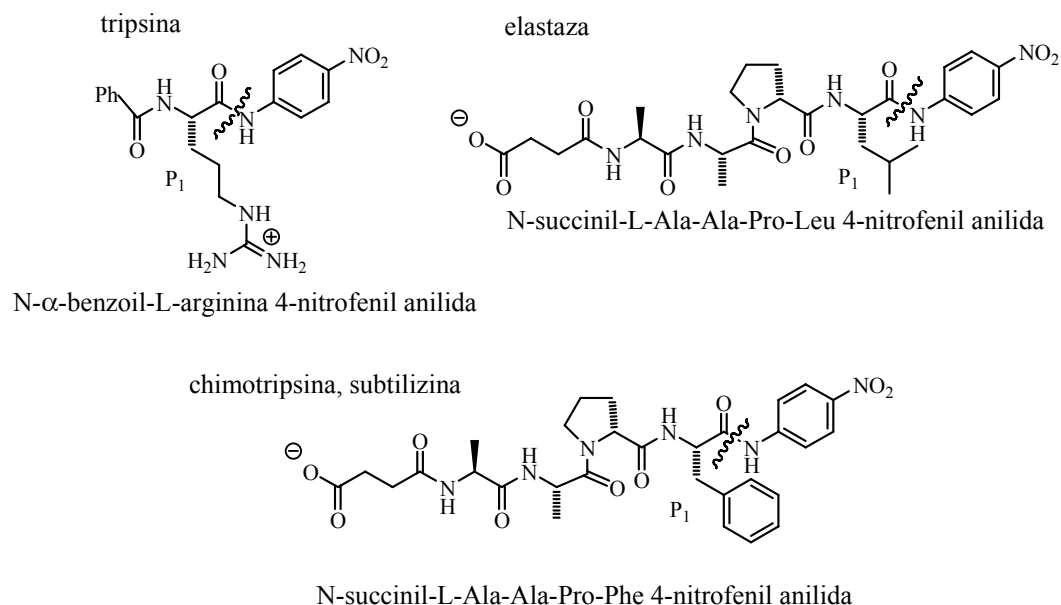


Figura 1.8. Substraturi cu grupări cromogenice utilizate adesea pentru analiza subtilizinei sau chimotripsinei; rezidul hidrofob Phe, se află în poziția P₁

1.5.2.3. Metode folosite pentru îmbunătățirea proprietăților proteazelor

Specificitatea și selectivitatea proteazelor ar putea limita potențialul lor, în special în cazul sintezei peptidelor mari unde pot avea loc reacții hidrolitice nedorite ale substratului și produsului format. În plus, mediile neconvenționale, precum și condițiile de temperatură și pH pot fi defavorabile pentru activitatea și stabilitatea proteazelor [43, 50, 51, 52]. Cu toate acestea, există diferite strategii pentru rezolvarea acestor probleme, cum ar fi: ingineria mediului de reacție, a biocatalizatorului și a substratului [53].

Ingineria mediului de reacție se referă la alegerea rațională a mediului de reacție pentru a influența în mod pozitiv proprietățile enzimei folosite în sinteza peptidelor [15]. Acest lucru implică frecvent înlocuirea mediului apos cu unul neconvențional, în care apa este înlocuită parțial sau aproape în totalitate de către un alt solvent. Co-solvenții organici inactivează de obicei enzimele atunci când sunt folosiți la concentrații relativ ridicate. Cu toate acestea, polioli sunt cei mai utilizați, existând mai multe exemple de sinteză enzimatică a peptidelor în astfel de medii [54, 55, 56]. Sistemele bifazice au devenit des folosite în sinteza peptidelor, reprezentând o strategie avantajoasă, deoarece sunt extrem de flexibile și se pot adapta proprietăților substraturilor și ale produșilor [50, 57]. În medii aproape anhidre, activitatea proteazelor se poate reduce [52]. Cu toate acestea, activitatea catalitică a fost îmbunătățită prin adăugarea unor compuși care imită apa, cum ar fi, formamida sau etilenglicolul sau prin adăugarea eterilor în timpul liofilizării enzimei

[58, 59]. O creștere de 425 ori mai mare a activității a fost observată prin adăugarea eterului 18-crown-6 chimotripsinei în sinteza dipeptidelor în acetonitril [60].

Ingineria biocatalizatorului se referă la strategiile folosite pentru obținerea unor biocatalizatori care să fie adaptabili în condițiile de sinteză a peptidelor. Insolubilizarea biocatalizatorului prin imobilizare pe un suport solid reprezintă cea mai relevantă metodă de a obține catalizatori stabili, care să reziste la condițiile dure din timpul sintezei. Imobilizarea a fost folosită foarte des în producerea proteazelor pentru sinteza peptidelor [61]. Imobilizarea pe suporturi de agaroză reprezintă o modalitate de stabilizare a alcalazei prin legare covalentă [62, 63]. Legarea covalentă a alcalazei de suporturi de silice, folosind glutaraldehida ca agent bifuncțional, a determinat creșterea stabilității operaționale și de păstrare comparativ cu enzima nativă [64]. Imobilizarea α -chimotripsinei în gel de poli(acrilamidă) protejează enzima de inactivarea provocată de solvenții organici, îmbunătățește stabilitatea la temperatura camerei și la temperaturi de până la 70°C [65]. Sangeetha și colaboratorii au raportat imobilizarea subtilizinei în matrici de sol-gel obținute din viniltrimetoxisilan. Preparatul enzimatic obținut s-a folosit ca biocatalizator în sinteza peptidelor [4]. Cristalele de enzimă imobilizate prin înrețelare (CLECs) sunt biocatalizatori robuști obținuți prin cristalizarea enzimei urmată de înrețelare cu un agent bifuncțional, glutaraldehida. Subtilizina astfel imobilizată a fost folosită cu succes în sinteza organică, atât în proces discontinuu, cât și continuu [66]. Proprietățile agregatelor de enzimă imobilizate prin înrețelare (CLEAs) sunt similare cu cele ale CLECs având avantajul simplității de preparare și costului scăzut, deoarece în acest caz enzima nu necesită purificare [67, 68]. CLEAs obținute prin agregare cu un polimer poliionic și CLEAs încapsulate în geluri de polivinilalcool [69] au fost folosite cu succes în sinteza β -lactam antibioticelor în medii neapoase. Substituția aminoacizilor din structura nativă a tripsinei și α -chimotripsinei cu analogi fluoroalchil, reprezintă o nouă metodă de obținere a peptidelor biologic active cu stabilitate îmbunătățită [70]. Mutageneza direcționată a fost de asemenea adoptată pentru creșterea performanțelor biocatalitice ale tripsinei în sinteza peptidelor [53]. Evoluția direcționată a fost aplicată pentru îmbunătățirea stabilității termice a subtilizinei [71].

Ingineria substratului se referă la modificarea substratului în vederea creșterii eficienței reacției. Chiar dacă majoritatea proteazelor sunt capabile să recunoască mai mult de un aminoacid, nu toate sunt în măsură să lege anumite secvențe de aminoacizi. Datorită specificității proteazelor, doar acei donori acil care posedă un anumit aminoacid special în poziția C-terminală pot fi cuplați fără a genera reacții secundare. De exemplu, tripsina preferă resturile de arginină sau lizină la carbonul C-terminal în structura donorului acil [43]. Influența structurii donorului acil asupra selectivității α -chimotripsinei și eficiența nucleofilului în sinteza peptidelor în solvenți organici, au fost raportate [72].

O altă strategie este utilizarea de substraturi mimetice. Principalul avantaj al acestei metode este acela că substraturile mimetice permit formarea unei legături peptidice, care nu poate fi hidrolizată deoarece nu corespunde specificității proteazei [53].

1.5.2.4. Serin-proteaze - mecanism catalitic

Serin-proteazele sunt enzime proteolitice care conțin în structura centrului catalitic un rest de serină. Ele reprezintă clasa enzimelor care catalizează, în general, scindarea specifică a legăturilor peptidice. Mecanismul catalitic de acțiune este același în cazul tuturor serin-proteazelor, necesitând o triadă de aminoacizi în centrul catalitic al enzimelor. Restul de serină acționează ca agent nucleofil primar în scindarea legăturii peptidice, nucleofilicitatea acestei grupări fiind intensificată de interacțiunile cu catena laterală a histidinei care, la rândul său, interacționează cu catena laterală a restului aspartat. Aceste enzime joacă un rol important în funcțiile catalitice ale organismelor, cum ar fi procesele digestive, coagularea sângelui, vindecarea rănilor și alte procese fiziologice importante. Legătura peptidică care trebuie scindată este formată din restul P_1 și P_1' corespunzător substratului (P_1 este restul de aminoacid N-terminal corespunzător legăturii care se scindează, iar P_1' este restul C-terminal care se hidrolizează). Restul de aminoacid adiacent poziției P_1 , la capătul N-terminal al legăturii care se scindează, este denumit P_2 . Subsite-ul din interiorul situsului activ al enzimei în care restul P_1 se fixează este notat cu S_1 . Numerotarea continuă în acest mod, fiind reprezentată în Figura 1.9.

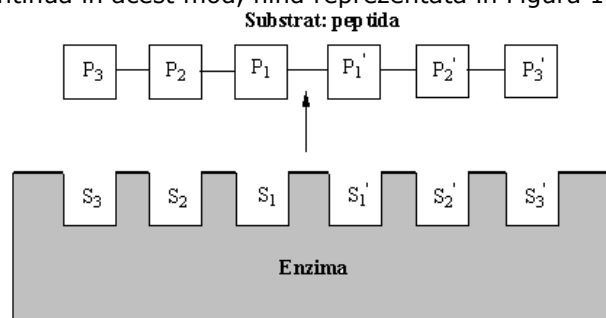


Figura 1.9. Nomenclatura subsituri-lor componente ale centrului activ și ale resturilor peptidice corespunzătoare

În funcție de proprietățile structurale, serin-proteazele se împart în trei clase distincte: chimotripsine, subtilizine și carboxipeptidaze II. Structura secundară și terțiară a proteinelor diferă în funcție de clasă, însă situsul activ format din histidină, serină și aspartat, precum și mecanismul catalitic sunt aceleași. Aceste enzime catalizează hidroliza legăturilor peptidice prin același mecanism de transfer al unei grupări acil (Figura 1.10), cu o viteză de reacție de 10^9 ori mai mare decât a reacției necatalizate. Câteva exemple de serin-proteaze sunt redată în Tabelul 1.2 [73].

Tabelul 1.2. Sursa și rolul unor serin-proteaze

Enzima	Sursa	Funcția
Tripsina	Pancreas	Digestia proteinelor
Chimotripsina	Pancreas	Digestia proteinelor
Elastaza	Pancreas	Digestia proteinelor
Trombina	Ser vertebral	Coagularea sângelui
Plasmina	Ser vertebral	Dizolvarea cheagurilor de sânge
Kalikeina	Sânge și țesuturi	Controlul debitului de sânge
Lizozomal proteaza	Celulele animale	Circulație proteinelor în celulă
Coconaza	Larve de molie	Dizolvarea coconului după metamorfoză
Proteaza A și B	<i>Streptomyces griseus</i>	Digestie
Subtilizina	<i>Bacillus subtilis</i>	Digestie

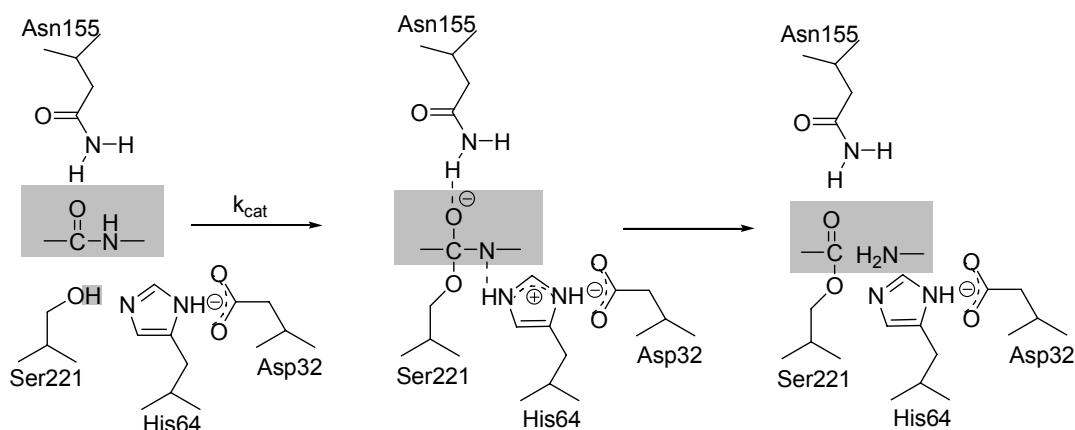


Figura 1.10. Reprezentarea schematică a mecanismului catalitic general al serin-proteazelor

După formarea complexului enzimă-substrat (ES), carbonul (C=O) corespunzător legăturii ce se scindează este atacat de serină (componentă a situsului catalitic), formând un intermediar tetraedric cu centrul oxianionic. Starea de tranziție este stabilizată prin legăturile de hidrogen formate între resturile de aminoacizi din centrul activ al enzimei și centrul oxianionic al substratului. În cazul subtilizinei, legăturile de hidrogen se formează între atomul de azot din structura serinei (componentă a centrului activ) și catena laterală a asparaginei (Asn155). Studiile cristalografice realizate pentru subtilizină au demonstrat formarea unei legături slabe de hidrogen între Asn155 și substrat sub forma complexului ES, această legătură fiind consolidată în starea de tranziție.

Rolul restului aspartat, din structura centrului activ al serin proteazelor, nu a fost elucidat în totalitate. Studiile anterioare au demonstrat că acest rest de aminoacid formează împreună cu restul de serină și histidină „triada” catalitică care acționează ca proton de transfer. Orientarea relativă a restului aspartat în centrul catalitic diferă considerabil pentru cele trei clase de serin-proteaze, fiind astfel puțin probabil ca transferul de protoni să aibă loc între resturile de histidină și aspartat în toate cele trei cazuri. Datele experimentale au demonstrat că prezența anionului

carboxilat din structura aspartatului influențează reactivitatea restului de histidină, având o influență considerabilă pentru cataliză. Diferențele dintre chimotripsină și subtilizină, în ceea ce privește specificitatea de substrat, pot fi explicate pe baza structurii centrului catalitic. În toate cazurile, legarea substratului este facilitată de formarea legăturilor de hidrogen, formându-se astfel structuri β -pliate între resturile de aminoacizi din centrul activ și resturile P_1 - P_4 din structura substratului. Interacțiunile dintre situsurile P_1 - S_1 joacă un rol foarte important în definirea specificității de substrat a acestor enzime [74].

1.5.2.5. Subtilizina - structură și proprietăți

Cele mai importante proteaze comerciale sunt subtilizinele. Acestea sunt o familie de serin-proteaze bacteriene secretate de mai multe specii de *Bacillus* (Tabelul 1.3). Subtilizina matură conține aproximativ 270 aminoacizi. Sunt endopeptidaze cu specificitate variată ce conțin în structura lor un ion de calciu. La fel ca și chimotripsina, ele preferă reziduurile hidrofobe în poziția P_1 , de exemplu fenilalanina. O ordine aproximativă a preferinței este: Tyr, Phe>Leu, Met, Lys>His, Ala, Gln, Ser>>Glu, Gly [75]. Subtilizinele prezintă afinitate scăzută pentru aminocizii din pozițiile P_2 și P_3 , dar favorizează resturile hidrofobe din poziția P_4 . Situsul S_1 al subtilizinei apare ca o despăcătură largă, puțin adâncă, format din două lanțuri β -pliate și o regiune sub formă de buclă de dimensiuni variabile (Figura 1.12) [74].

Tabelul 1.3. Proteaze disponibile comercial

Enzima	Sursa biologică	Sinonime
Subtilizine		
Subtilizina BL	<i>Bacillus lentus</i>	Savinase
Subtilizina BPN'	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Subtilizina Novozymes
Subtilizina Carlsberg	<i>Bacillus licheniformis</i>	Alcalază, subtilizina A, Optimase
Proteaze înrudite structural cu subtilizinele		
Thermitase	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	
Proteinaza K	<i>Tritirachium album</i> Limber	
Alte proteaze		
Chimotripsină	Pancreas de bovină	
Termolizină	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	
Papaină	Papaya	

Cele mai importante subtilizine comerciale sunt subtilizina BL (subtilizina din *Bacillus lentus*), subtilizina Carlsberg (subtilizina din *B. licheniformis*) (Figura 1.11) și subtilizina BPN' (subtilizina din *B. amyloliquefaciens*). În ciuda diferențelor din secvența de aminoacizi (84 dintre cei 275 de aminoacizi diferă între subtilizinele Carlsberg și BPN'), structurile și specificitatea de substrat sunt similare. Activitatea

catalitică diferită a acestora este determinată de diferențele în structura primară a proteinelor [76].

Subtilizinele sunt serin-proteaze alcaline, adică proteaze care prezintă activitate maximă la pH alcalin. Nu există un pH optim. Viteza de reacție crește în domeniul de pH 6-9, apoi rămâne constantă. La pH>11, atât subtilizina Carlsberg cât și subtilizina BPN' sunt denaturate, dar subtilizina BL rămâne stabilă până la valori ale pH-ului de cel puțin 12. Este foarte probabil ca această diferență să provină de la faptul că *Bacillus lentus* este o bacterie alcalofilă ce se poate dezvolta la pH mai ridicat decât alte specii de *Bacillus* [48].

Detergenții de rufe conțin proteaze de tip subtilizină folosite pentru îndepărtarea petelor pe bază de proteine. Sunt produse la scară industrială la nivel de tone și de aceea sunt foarte ieftine. Acestea sunt comercializate sub denumirea de alcalază, de către Novozymes. Datorită importanței lor comerciale, o mulțime de eforturi au fost consacrate în ingineria subtilisizinelor, în special pentru îmbunătățirea stabilității și activității la pH și temperaturi ridicate. Prima subtilizină, folosită în industria detergenților și obținută prin inginerie genetică, a fost subtilizina BPN' descoperită de către Genencor și Procter & Gamble. La ora actuală, subtilizinele folosite în industria detergenților tolerează pH-ul și temperaturile ridicate, surfactanții, oxidanții și co-solvenții organici.

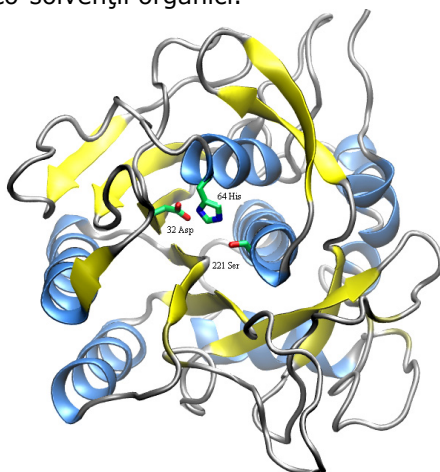


Figura 1.11. Structura și triada catalitică a subtilizinei Carlsberg [77]

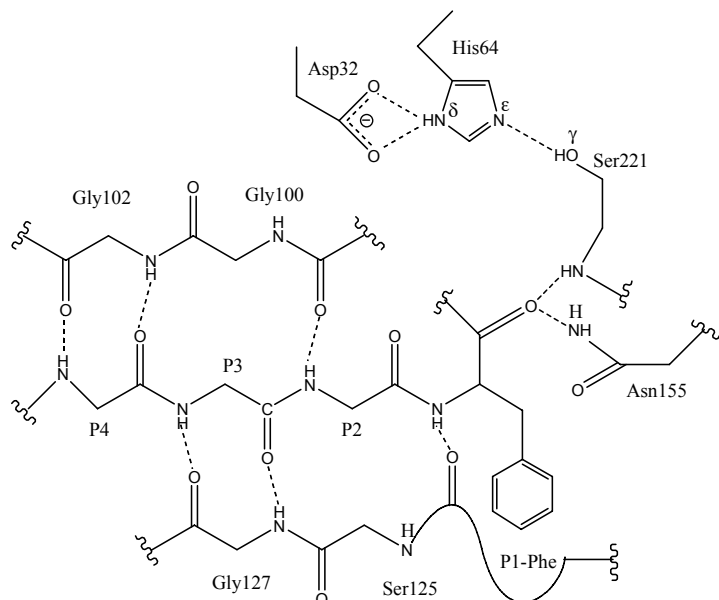


Figura 1.12. Interacțiunile dintre centrul activ al subtilizinelor și substrat

1.5.2.6. Peptide active biologic obținute prin hidroliza enzimatică a proteinelor

Una dintre metodele de modificare a proprietăților fizice, chimice, funcționale și nutriționale ale proteinelor alimentare este hidroliza parțială a acestora. Hidrolizatele proteice reprezintă amestecuri de oligopeptide, polipeptide și aminoacizi liberi. Procesul este însă unul complicat datorită diversității componentelor de reacție (amestecuri de fragmente peptidice, care pot fi atât produși de reacție, cât și reactanți pentru reacția următoare), multiplicității tipurilor de reacție, complexității schemei de reacție (existența inhibiției de substrat, diversitatea produșilor de reacție, inactivarea enzimei în timpul hidrolizei) și influența pH-ului, temperaturii, tăriei ionice și a presiunii asupra vitezei de reacție.

În prezent, peptidele obținute prin hidroliza enzimatică a proteinelor sunt folosite în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică [78, 79].

Studiile recente au demonstrat că majoritatea peptidelor înglobate în proteinele alimentare și eliberate în timpul hidrolizei enzimatică, conferă proprietăți biologic active. Peptidele biologic active obținute prin hidroliza proteinelor alimentare pot avea proprietăți antioxidative, antimicrobiene, antihipertensive, citomodulatorii și imunomodulatorii, atât *in vivo*, cât și *in vitro* [80]. În Tabelul 1.4 sunt prezentate câteva peptide cu activitate biologică [81]. De exemplu, peptidele cu mase moleculare mai mici (10-50 resturi de aminoacizi), cu proprietăți cationice și hidrofobe, sunt cunoscute ca potențiali agenți de apărare având acțiune antimicrobiană asupra unui spectru larg de microorganisme patogene, cum ar fi bacteriile gram-pozitive și gram-negative, fungi, virusuri și paraziți [82].

Tabelul 1.4. Peptide active biologic obținute prin hidroliza enzimatică a proteinelor animale

Proteina	Peptida/Compoziția în Aminoacizi	Activitatea biologică	Proteaza
Jesut muscular (pasăre)	Leu-Pro-Lys	Inhibitor ACE	Termolizina
Hidrolizate din stridii (10-5 kDa)	Leu, Glu, Asp, Phe, Tyr, Ile, Gly	Antivirală	Alcalaza și bromelanina
α -cazeina (lapte de bovină)	Tyr-Lys-Val-Pro-Glu-Leu	Inhibitor ACE	Proteinaza din <i>Lactobacillus helveticus</i> CP790
Para- κ -cazeina (lapte de bovină)	Phe-Phe-Ser-Asp-Lys f(17-21)	Imunomodulatoare	Tripsina
Lizozima (ou)	Lizozima f(98-112) Ile-Val-Ser-Asp-Gly-Asn-Gly-Met-Asp-Ala-Trp-Val-Ala-Trp-arg	Antimicrobiană	Clostripaina
Albumina (orez)	Orizatensina Gly-tyr-Pro-Met-Tyr-Pro-Leu-Arg	Imunomodulatoare	Tripsina
β -lactoglobulina (lapte de bovină)	Ile-Ile-Ala-Glu-Lys	Hipocolesterolemică	Tripsina

Studiile privind utilizarea peptidelor în tratarea cancerului au câștigat de asemenea mult teren, oferind rezultate remarcabile. Jang și colaboratorii au identificat patru peptide cu activitate ACE inhibitoare în hidrolizatele obținute din sarcoplasma de vită. Acestea au demonstrat activitate antimicrobiană și anticancerigenă [83].

În 2003, Campina, una dintre cele mai mari companii de lactate la nivel mondial, a lansat pe piață produsul C12 peption (peptidă biologic activă formată din 12 aminoacizi), cu acțiune în reducerea presiunii arteriale. Un alt produs cu proprietăți remarcabile este Valess, substituent al cărnii obținut din lapte degresat și fibre din alge, prin care se obține o textură fermă prin același proces de coagulare folosit pentru obținerea brânzeturilor.

Prin utilizarea peptidelor biologic active în industria medicamentelor se reduce costul și timpul de desfășurare a studiilor de toxicitate necesare pe parcursul procesului, precum și încercările clinice. Hidroliza enzimatică este preferată în industria alimentară și farmaceutică datorită absenței urmelor de solvenți organici în produsul final [20].

Producția la scară industrială este favorizată de folosirea enzimelor imobilizate, deoarece acestea oferă o serie de avantaje comparativ cu cele solubile: condiții blânde de reacție, reutilizarea biocatalizatorului, evitarea autolizei enzimei care ar putea determina formarea metaboliților secundari [84]. Un alt avantaj al enzimelor imobilizate este operarea în regim continuu, acest procedeu fiind utilizat în mare măsură pentru hidroliza totală a proteinelor [85].

Procedeele de modificare chimică a peptidelor și încorporarea aminoacizilor naturali (incluzând D-aminoacizi) au fost aplicate în vederea îmbunătățirii stabilității peptidelor susceptibile degradării proteolitice. Shen și colaboratorii au descoperit o nouă metodă chimică de sinteză a peptidelor, care poate fi folosită pentru a introduce un aminoacid nenatural în interiorul unei molecule de proteină [86].

Jang și colaboratorii au identificat un număr de patru peptide (GFHI, DFHING, FHG, GLSDGEWQ) cu activitate biologică, obținute prin hidroliza enzimatică a sarcoplasmei de vită. Acestea au avut activitate antimicrobiană, efect citotoxic împotriva celulelor cancerigene și efect macrofag-stimulator [87].

1.5.3. Sinteza enzimatică

Creșterea gradului de conștientizare cu privire la importanța reglementărilor și siguranței în domeniul sănătății, precum și creșterea cererii peptidelor biologice active, au solicitat căutarea intensivă a alternativelor biotehnologice de producere a oligopeptidelor de interes. Specificitatea ridicată a proteazelor a condus la creșterea interesului în dezvoltarea de noi metode de sinteză pe cale enzimatică a peptidelor. Potențialul său se bazează pe obținerea peptidelor foarte mici, în cele mai multe cazuri, dipeptide și tripeptide [88].

Sinteza peptidelor catalizată de proteaze a fost raportată pentru prima dată în 1901 de către Savjalov. Până la sfârșitul anilor 1930 cercetătorii au crezut că biosinteza proteinelor implică acțiunea inversă a proteazelor. La sfârșitul anilor 1970 chimiștii au început să folosească proteazele pentru a simplifica sinteza peptidelor, acest domeniu fiind în continuare foarte atractiv. Există mai multe lucrări în care s-a studiat sinteza legăturilor amidice cu ajutorul proteazelor și amidazelor [89, 90, 91, 92].

Printre avantajele sintezei enzimatică se numără:

- enantioselectivitatea ridicată;
- eliminarea etapelor de protecție-deprotecție a catenelor laterale ale aminoacizilor;
- realizarea sintezelor în condiții blânde de reacție.

În prezența apei, proteazele catalizează hidroliza legăturilor peptidice, dar reacția poate avea loc și în sens invers (sinteza legăturilor peptidice) în prezența unei concentrații mici de apă în sistemul de reacție (Figura 1.13) [88].

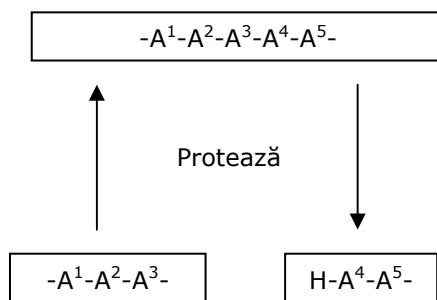


Figura 1.13. Reprezentarea schematică a reacției de hidroliză și formare a legăturii peptidice A^3-A^4 catalizată de proteaze

Biocataliza în medii neconvenționale (neapoase) a extins spectrul de aplicare al proteazelor în acele reacții care nu pot avea loc în medii apoase, și anume sinteza peptidelor în schimbul hidrolizei lor. Solvenții organici, fluidele supercritice,

amestecurile eutectice [15] și lichidele ionice [93, 94] au fost folosite ca medii de reacție în sinteza enzimatică a peptidelor.

Dipeptidele și tripeptidele sintetizate enzimatic au fost folosite cu succes în nutriție, produse farmaceutice și agrochimice. Câteva exemple relevante sunt: sinteza aspartamului, kiotorfinei, angiotensinei, encefalinei, dinorfinei și a unor di- și tripeptide nutriționale [15]. Au fost raportate mai multe exemple de peptide active biologic sintetizate pe cale enzimatică [50, 95, 96].

Din punct de vedere nutrițional și fiziologic, peptidele se comportă diferit spre deosebire de aminoacizi și proteine. Tripeptida RGD (Arg-Gly-Asp) a fost descoperită de Telios Pharmaceuticals Co. ca fiind un medicament împotriva arsurilor, ulcerului duodenal, etc. Această tripeptidă este formată din doi aminoacizi cu caracter hidrofил (Arg și Asp) și unul neutru (Gly). O serie de peptide biologic active sintetizate pe cale enzimatică sunt prezentate în Tabelul 1.5 [88].

Tabelul 1.5. Peptide active biologic sintetizate pe cale enzimatică

Peptida	Legătura peptidică formată	Enzima folosită
Insulina	Arg-Gly	Tripsina
Aspartam	Asp-Phe	Termolizina
Kiotorfina	Tyr-Arg	α -Chimotripsina
Leu-encefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	α -Chimotripsina, papaina
Dinorfina (1-8)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Arg-Arg-Ile	α -Chimotripsina, tripsina, papaina
Ceruleina	Asp-Tyr-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe	α -Chimotripsina, papaina, termolizina, subtilizina
Tripeptida RGD	Boc-Arg-Gly-OEt	Alcalaza, tripsina, papaina, chimotripsina
Somatostatina	(-Ala-Gly-Cys-Lys-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys-) ^a	Termolizina, chimotripsina
Vasopresina	Tyr-Phe Phe-Gln	Termolizina, chimotripsina
Oxitocina	Cys-Tyr-Tyr-Ile Pro-Leu-Leu-Gly	Papaina, termolizina, chimotripsina

^a legătura peptidică formată între primul și ultimul rest de aminoacid formându-se astfel oligopeptida ciclică, somatostatina

Utilizarea substraturilor protejate în sinteza oligopeptidelor a condus la o pierdere de continuitate în secvența de reacție și la o reducere a randamentului de produs și a productivității, limitând astfel sinteza continuă a oligopeptidelor cu ajutorul enzimelor. De aceea este nevoie de dezvoltarea de noi strategii și metode în vederea depășirii dificultăților întâmpinate în timpul amidării peptidelor la carbonul C-terminal și exprimării activității biologice complete.

Proteazele folosite în sinteza peptidelor sunt selectate în funcție de specificitatea lor față de resturile de aminoacizi implicate în legătura peptidică care se scindează (Tabelul 1.6). Majoritatea proteazelor disponibile comercial, cum ar fi: metalo-, serin-, aspartat-, endo- și exopeptidazele sunt folosite în sinteza peptidelor. Kumar și colaboratorii au investigat eficiența proteazei din *Bacillus sp.* APR-4 în diferite sinteze ale peptidelor. [97]. Subtilizina, chimotripsina, tripsina și papaina au fost proteazele cele mai utilizate în sinteza peptidelor. Cu toate acestea, specificitatea largă de substrat restricționează folosirea lor în sinteza peptidelor, deoarece produsul care se acumulează în timpul reacției poate fi atacat simultan de proteaze [43].

Tabelul 1.6. Specificitatea proteazelor

Enzima	Legătura peptidică scindată
Proteaze serinice	↓
Tripsina	-A-A'- (-A=Lys, Arg, -A'=nespecific)
Chimotripsina	-A-A'- (-A=Trp, Phe, Leu, -A'=nespecific)
Catepsina	-A-A'- (-A=Phe, Leu, Trp -A'=nespecific)
Elastaza	-A-A'- (-A=Ala, Ser, Leu, -A'=nespecific)
Subtilizina	-A-A'- (-A=neutru, sunt preferați aminoacizii cu caracter acid, -A'=nespecific)
Carboxipeptidaza Y	-A-A'- (nespecific)
Proteaza prolin-specifică	-A-A'- (-A=Pro)
Proteaze cisteinice	
Papaina	-A-A'- (-A=Arg, Lys, -A'=nespecific)
Bromelaina	-A-A'- (nespecific)
Clostripaina	-A-A'- (-A=Arg, -A'=Pro)
Catepsina B	-A-A'- (dependentă de substrat)
Metaloproteaze	
Termolizina	-A-A'- (-A=Leu, Phe, -A'=Leu, Phe, Val, Met, Ala, Ile)
Proteaze aspartice	
Pepsina	-A-A'- (-A=Phe, Tyr, Leu, -A'=Trp, Phe, Tyr)
Catepsina D	-A-A'- (-A=Phe, Leu, -A'=nu poate fi val, Ala)

Principalele strategii folosite în sinteza peptidelor pe cale enzimatică sunt:

- Sinteza prin control termodinamic;
- Sinteza prin control cinetic (Figura 1.14).

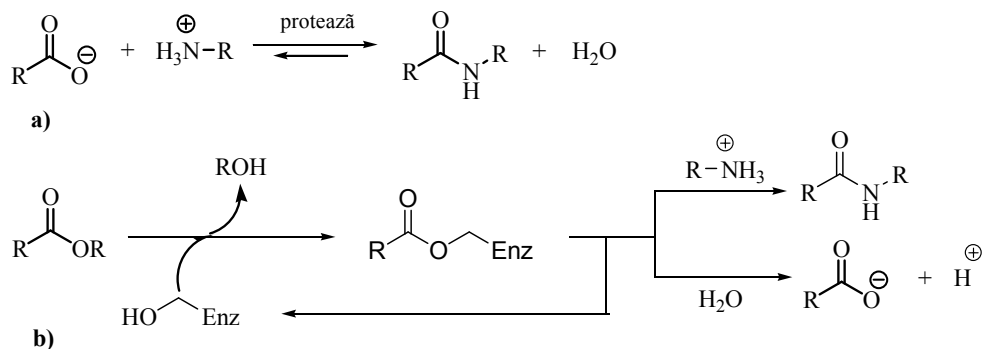


Figura 1.14. Sinteza legăturilor peptidice catalizată de proteaze. a) Reacția controlată termodinamic, în care echilibrul poate fi deplasat prin modificarea condițiilor de reacție. b) Reacția controlată cinetic, în care se pornește de la o componentă carboxilică activată (de exemplu, ester)

În cazul **sintezelor controlate termodinamic**, se modifică condițiile de reacție pentru a deplasa echilibrul spre sinteză, în defavoarea hidrolizei. Hidroliza peptidelor este favorizată de $\sim 2,2$ kcal/mol și este condusă în principal de solvatarea ionilor carboxilat și amoniu. Metoda cea mai des folosită de deplasare a

echilibrului spre sinteză, este înlocuirea apei cu un solvent organic. Solventul organic împiedică ionizarea materiilor prime și de asemenea reduce concentrația de apă. Alte metode utilizate frecvent pentru a deplasa echilibrul sunt: creșterea concentrațiilor de materii prime sau alegerea grupărilor protective care promovează precipitarea produsului [48].

În cazul **sintezelor controlate cinetic**, se pornește de la un compus carboxilic activat, de obicei un ester. Esterul reacționează cu enzima pentru a forma un intermediar acil-enzimă, care reacționează apoi fie cu o amină pentru a forma amida dorită, fie cu apă formându-se acidul carboxilic. Deoarece materia primă este un compus carboxilic activat, reacțiile sunt mai rapide decât în cazul controlului termodinamic. Abordarea controlului cinetic necesită un intermediar acil-enzimă, de aceea în acest caz se utilizează doar serin-hidrolazele (de exemplu subtilizina, lipazele). Metalo-proteazele, cum ar fi termolizina, acționează doar în sintezele controlate termodinamic [48]. Folosind un substrat activat, proteazele acționează ca transferaze catalizând transferul grupării acil unui nucleofil. Hidroliza substratului activat este o reacție concurentă sintezei legăturii peptidice, peptida formată putând fi hidrolizată de către protează. Randamentul produsului depinde de raportul aparent dintre constantele vitezelor de reacție (sinteză și hidroliză) și de viteza cu care produsul format se hidrolizează. În 1991, Chen și colaboratorii au raportat sinteza peptidelor în soluție etanolică, catalizată de preparatul enzimatic comercial alcalază [98].

Cea mai importantă aplicație a sintezei peptidelor catalizată de proteaze (la nivel de sute de mii de tone) este sinteza aspartamului (un îndulcitor cu conținut caloric redus), prin biocatalizată cu termolizina (Figura 1.15) [99]. Această sinteză controlată termodinamic are loc prin precipitarea produsului. Datorită regioselectivității ridicate a termolizinei, nu este necesară protejarea β -carboxilatului, având loc doar reacția grupării α -carboxil din aspartat. Enantioselectivitatea crescută permite utilizarea aminoacizilor racemici, deoarece doar L-enantiomerul reacționează.

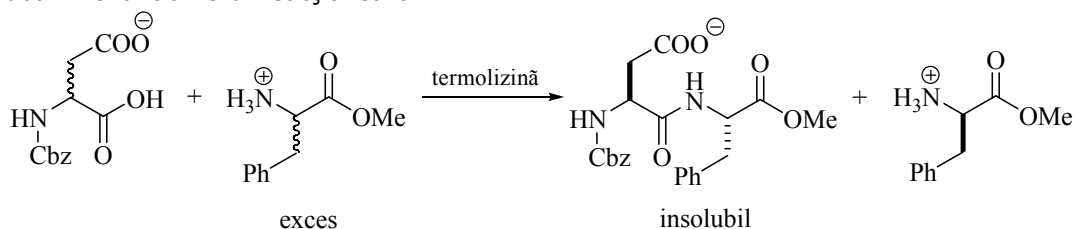


Figura 1.15. Procedura comercială de obținere a aspartamului (esterul metilic al α -L-aspartil-L-fenilalaninei). Reacția de cuplare a acidului aspartic N-Cbz protejat cu esterul metilic al fenilalaninei catalizată de termolizina

Un exemplu de sinteză controlată cinetic este producerea chiotorfinei (Tyr-Arg) catalizată de α -chimotripsină (Figura 1.16) [100]. Pentru a minimiza reacția secundară de hidroliză s-a folosit o concentrație ridicată de agent nucleofil.

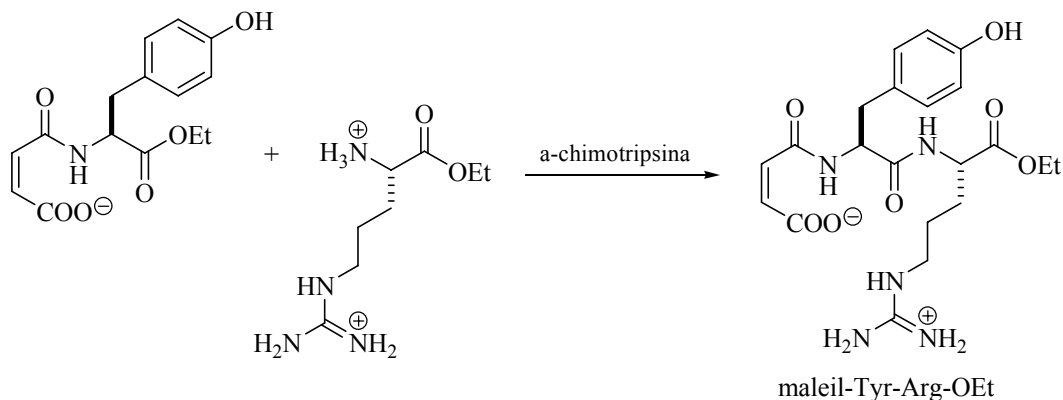


Figura 1.16. Schema reacției de sinteză a dipeptidei chiotorfinei catalizată de α -chimotripsină

Subtilizina acceptă o gamă mai largă de substraturi comparativ cu alte proteaze. Aceasta se utilizează de obicei pentru cuplările amidice care implică substraturi sintetice [101]. La cuplarea unui D-aminoacid este recomandată utilizarea unui nucleofil, și nu a unui donor carboxil, deoarece subtilizina este mai tolerantă la modificările nucleofilului decât la modificările grupării carboxil.

Cercetătorii au cuplat de asemenea și peptide mai lungi cu ajutorul proteazelor. De exemplu, subtilizina a scindat o proteină cum ar fi lizozimul și ranaza în mai multe peptide [102]. Apoi, adăugarea unui solvent organic a deplasat echilibrul spre sinteza peptidei, aceeași subtilizină catalizând formarea proteinei. În viitor, această condensare ar putea duce la formarea de proteine cu conținut de aminoacizi sau zaharuri sintetice.

1.6. Procese industriale de obținere a peptidelor

Producția la scară industrială a peptidelor reprezintă scopul final al dezvoltării tehnologice în acest domeniu.

1.6.1. Procese chimice industriale

În cazul producției la scară industrială a peptidelor trebuie luate în considerare următoarele aspecte: costul ridicat al materialelor și efectul toxic la reziduurilor asupra mediului înconjurător [1].

Peptidele cu activitate terapeutică au un potențial foarte ridicat, multe dintre ele fiind produse la scară industrială. Principalele dezavantaje ale sintezei în fază solidă se referă la apariția procesului de racemizare, necesitatea protejării catenelor laterale ale aminoacizilor, care determină creșterea costului substratului și reduce randamentul de produs, dificultatea reutilizării agentului de cuplare și a donorului acil folosit în exces pentru a avea loc acilarea totală și rapidă a nucleofilului, toxicitatea solvenților și agenților de cuplare [28]. În ciuda acestor restricții, sinteza în fază solidă (SPPS) poate fi considerată o tehnologie atrăgătoare pentru producția pe scară largă a peptidelor de dimensiuni medii, de până la 100 de resturi de aminoacizi, cele mai multe dintre ele de importanță terapeutică [103]. De obicei,

peptidele alcătuite din maxim 30 de resturi de aminoacizi sunt obținute prin metoda secvențială [104], în timp ce peptidele mai lungi (mai mult de 60 de aminoacizi) ar trebui produse prin sinteza convergentă în care fragmentele protejate sunt sintetizate în fază solidă, apoi asamblate prin metoda în fază lichidă [105]. Peptidele mai mari și proteinele sunt obținute, în general, prin legare chemoselectivă [106], în care toate fragmentele neprotejate sunt sintetizate anterior prin SPPS. O nouă metodă de sinteză în soluție a peptidelor la scară industrială a fost procesul dezvoltat de una dintre cele mai importante companii de sinteză a peptidelor, Dyosynth. Procesul denumit DioRaSSP (Diosynth Rapid Solution Synthesis of Peptides) combină avantajele sintezei în soluție cu cele ale sintezei în fază solidă [107].

1.6.2. Procese enzimatiche industriale

Intensificarea normelor de sănătate și siguranță a determinat căutarea intensivă a alternativelor biotehnologice de sinteză a peptidelor folosite în industria alimentară și medicină. În ultimul deceniu s-a pus accentul pe dezvoltarea noilor metode de producție pe scară largă a peptidelor biologice active cu ajutorul proteazelor. În general, enzimele sunt catalizatori labili, de aceea procesele trebuie proiectate cu atenție. Acest lucru presupune optimizarea parametrilor operaționali: pH, temperatură, concentrația solventului organic, precum și evaluarea activității și stabilității biocatalizatorului în condiții de funcționare, solubilitate și stabilitate a reactanților și produșilor de reacție.

Dezvoltarea proceselor de sinteză enzimatică a polipeptidelor necesită alegerea adecvată a proteazei care urmează să fie utilizată în etapele de cuplare. Această selectare se face în funcție de specificitatea lor, succesiunea de formare a legăturilor peptidice, mediul de reacție și aminoacidul sau peptida care acționează ca donori acil și nucleofili [88]. Procesul de sinteză enzimatică al peptidelor trebuie să îndeplinească următoarele cerințe:

- optimizarea randamentului total prin reducerea etapelor;
- integritatea reacției și a etapelor de separare (de exemplu, produsul obținut într-o reacție să fie folosit ca substrat pentru următoarea reacție, cu modificări minime);
- protecție minimă și utilizarea alternativă a grupărilor protectoare ușor de introdus și eliminat (prin cataliză enzimatică, dacă este posibil).

Specificitatea și reactivitatea ridicată în condiții blânde de reacție pot avea un impact puternic asupra economiei proceselor catalizate enzimatic, deoarece acestea vor reduce numărul etapelor necesare sintezei și a energiei necesare și va avea un impact nesemnificativ asupra mediului înconjurător, ca o consecință a cantității și toxicității reduse a deșeurilor [108].

Mărimea peptidelor reprezintă o condiție majoră în sinteza enzimatică, deoarece procesele nu au fost încă elaborate și automatizate. Astfel, doar peptidele mici (mai puțin de 10 resturi de aminoacizi) au fost sintetizate enzimatic cu succes. În aceste condiții există o concurență strânsă între sinteza chimică și cea enzimatică, cu excepția cazului în care proprietățile remarcabile ale enzimelor au implicații profunde în proces. Acest lucru este ilustrat în cazul obținerii enzimatică a aspartamului folosind proteaza termolizină [109]. Alte exemple remarcabile ale tehnologiei enzimatică de obținere a peptidelor biologice active sunt: producerea chiotropinei cu ajutorul chimotripsinei imobilizate [110], obținerea di-, tri- și a

tetrapeptidelor bioactive cu chimopapaină și subtilizină adsorbite pe Celite cu un randament 73%, 74%, respectiv 67% [111]. Un exemplu reprezentativ care pune în evidență potențialul sintezei enzimatică este cazul colecistochininei C-terminale (CCK-8). CCK-8 este o octapeptidă (H-Asp-Tyr [SO₃]-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) a colecistochininei (CCK), un hormon polipeptidic alcătuit din 33 de resturi de aminoacizi, responsabil pentru stimularea digestiei grăsimilor și proteinelor în intestinul subțire [112]. În cazul acestui proces, reacțiile enzimatică au fost catalizate de proteaze immobilizate prin adsorbție pe un suport solid (Celite și poliamidă). Toate acestea au avut un cost scăzut. Acest proces de sinteză constituie un exemplu reprezentativ al aplicațiilor biocatalizatorilor în sinteza peptidelor biologic active, ce implică șapte reacții catalizate de proteaze și etapele de separare corespunzătoare.

În ciuda progreselor tehnologice, productivitatea scăzută, conversia mică și costul ridicat al enzimelor reprezintă problemele care trebuie rezolvate pentru a face competitivă sinteza enzimatică a peptidelor pentru un spectru mai larg de procese.

În anii '70 s-au dezvoltat diferite metode pentru obținerea insulinei umane (hormonul împotriva diabetului), printre care sinteza chimică a polipeptidei (în soluție sau SPPS), proces neeconomic datorită numărului mare de etape de protecție/deprotecție a aminoacizilor și peptidelor intermediare, transformarea enzimatică a insulinei porcine în insulina umană (proces viabil din punct de vedere tehnologic și economic) și sinteza utilizând tehnologia ADN recombinant. Prin această ultimă abordare s-a obținut insulina recombinantă, primul preparat terapeutic obținut prin această tehnologie și folosit pe scară largă. Avantajele acestui proces au fost: productivitatea ridicată, producerea insulinei nu depinde de numărul animalelor sacrificate și eliminarea riscului transmiterii accidentale a bolilor virale. Tehnologiile de obținere a insulinei prin ADN recombinant constă în obținerea catenelor A și B ale insulinei prin inserția cADN codificat pentru catenele A și B în *E. coli* (tulpina K12), purificarea catenelor și cuplarea acestora prin punți disulfidice.

Secvențele de aminoacizi ale insulinei obținute din diferite specii de animale sunt similare, dar nu identice. De exemplu, insulina porcine diferă printr-un aminoacid (carboxilul terminal al lanțului B) de insulina umană (Ala vs. Thr) (Tabelul 1.7).

Tabelul 1.7. Diferența secvenței de aminoacizi între insulina umană și porcine

Specia	Catena A				Catena B			
	4	8	9	10	1	3	29	30
Umană	E	T	S	I	F	N	K	T
Porcină	E	T	S	I	F	N	K	A

Inouye și colaboratorii au dezvoltat o metodă de semisinteză a insulinei umane în care tripsina a fost folosită ca și catalizator pentru reacția de cuplare a desooctapeptidei-(B23-B30) a insulinei (DOI) cu o octapeptidă sintetică corespunzătoare pozițiilor B23-B30 ale insulinei umane. DOI a fost obținută prin hidroliza enzimatică cu ajutorul tripsinei a insulinei porcine (Figura 1.17) [113].

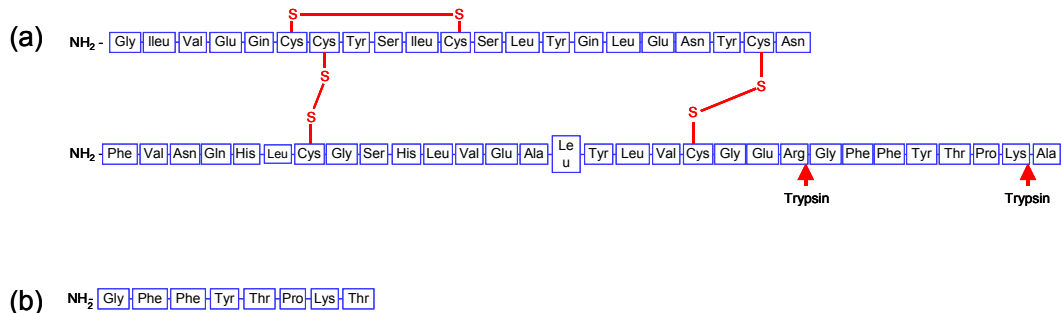


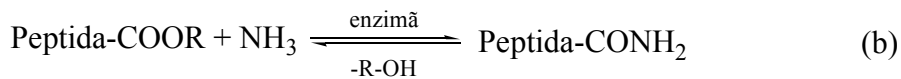
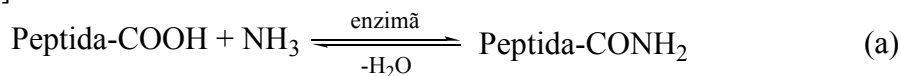
Figura 1.17. Transformarea enzimatică a insulinei porcine în insulina umană; (a) secvența de aminoacizi a insulinei porcine; (b) octapeptida sintetică corespunzătoare secvenței de aminoacizi (B23-B30) a insulinei umane

1.7. Modificarea peptidelor la carbonul C-terminal

1.7.1. Amidarea

Majoritatea peptidelor active biologic conțin o grupare amidică la carbonul din poziția C-terminală. Printre acestea se numără: desmopresina, gonadorelina, oxitocina, calcitonina și arginin-vasopresina. Amidele peptidelor pot fi obținute prin sinteza în fază solidă folosind rășini de benzohidrilamină [114, 115]. La scară industrială se folosește metoda sintezei în soluție. În acest caz se pornește de la aminoacilamida C-terminală, păstrând gruparea amidică liberă pe întreg parcursul sintezei. Aceasta metodă este de obicei însoțită de probleme de solubilitate și de pierderi ale produsului în apele de spălare. O altă abordare este amonoliza chimică la un pH ridicat a esterilor C-terminali ai peptidelor, care pot fi obținuți prin sinteza convențională a peptidelor, dar aceasta implică riscul racemizării și formarea produșilor secundari de reacție. Utilizarea enzimelor pentru sinteza amidelor C-terminale a peptidelor pot preveni aceste limitări datorită condițiilor blânde de reacție, chemo- și regioselectivității ridicate.

Sinteza enzimatică poate fi realizată prin amonoliza peptidelor libere la poziția C-terminală printr-o reacție controlată termodinamic (Figura 1.18a), sau prin amonoliza alchil- sau aril-esterilor peptidelor prin control cinetic (Figura 1.18b) [116].



unde, R = alchil, aril

Figura 1.18. Sinteza enzimatică a amidelor peptidelor

În majoritatea cazurilor α -amidarea neuropeptidelor și hormonilor este esențială pentru activitatea biologică. În natură, mecanismul de sinteză al peptidelor amidate implică modificarea posttranslațională a precursorului glicinic. Scindarea oxidativă este catalizată de monoxigenaza de α -amidare a peptidilglicinei (PAM), enzimă localizată în țesuturile glandelor endocrine și neurale. PAM este o enzimă bifuncțională formată din două domenii: (1) monoxigenaza de α -hidroxilare a peptidilglicinei (PHM, EC 1.14.17.3) și (2) liaza de α -amidare a peptidil- α -hidroxiglicinei (PAL, EC 4.3.2.5). Aceste enzime acționează secvențial generând peptida activă α -amidată (Figura 1.19). [115, 117].

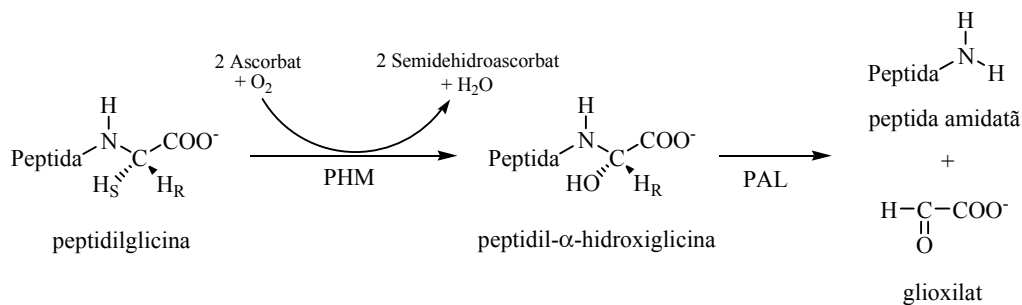


Figura 1.19. Reacția de formare a peptidelor α -amidate catalizată de PHM și PAL

În ultimii ani, au fost realizate mai multe studii cu privire la sinteza enzimatică a peptidelor amidate și a aminoacizilor utilizând fie metoda (a) fie metoda (b). Čeřovský și Kula [118, 119] au raportat sinteza amidelor peptidelor prin amidarea carbonului C-terminal al grupării acide din substratul peptidei utilizând o peptidamidază extrasă din coaja de portocală. Chiar dacă condițiile de reacție au fost optimizate, randamentele nu au depășit 35%.

Randamentele de amidare sunt puternic influențate de natura aminoacidului terminal, cele mai ridicate fiind obținute pentru peptidele în care aminoacidul terminal este Phe, Met și Leu. Amidaza utilizată în aceste studii a demonstrat o preferință ridicată pentru resturile de aminoacizi hidrofobi din poziția terminală și o activitate scăzută pentru resturile de aminoacizi hidrofilii sau încărcăți electric. Deși posibile, aplicațiile acestei metode în sinteza amidelor peptidelor în fază lichidă sunt împiedicate de randamentele mici, de disponibilitatea limitată a enzimei și de etapa adițională de deprotejare a esterilor peptidei care are loc de obicei în etapa de sinteză în fază lichidă înainte de amidarea efectivă.

Amidarea aminoacizilor N-protejați, cum ar fi Z-Phe-NH₂, Moz-Asp(Bzl)-NH₂, Moz-Glu(Bzl)-NH₂, Z-Ala-NH₂ și Moz-Leu-NH₂ prin amonoliza esterilor metilici sau benzilici, utilizând proteaza alcalină industrială alcalază, a fost realizată de Chen și colaboratorii săi [120]. Reacțiile au fost realizate în *tert*-butanol, utilizând clorură de amoniu ca sursă de amoniac, în prezența trietilaminei, la pH 10,6 sau mai mare. Randamentele obținute au fost cuprinse între 50 și 70%. Chen a mai realizat de asemenea și sinteza dipeptidei Ala-Phe-NH₂ cu o conversie de 68% în 12 ore. Aceeași metodă a fost aplicată și la sinteza unei tripeptidamide, și anume Z-Ala-Phe-Leu-NH₂, dar conversia nu a fost menționată. În toate cazurile a fost observată formarea unei cantități mici (3-8%) de produs secundar de hidroliză. Reacția a fost regio- și enantioselectivă. Utilizarea unui pH alcalin este nefavorabilă în sinteza

peptidelor în fază lichidă, deoarece pot avea loc reacții în lanț în funcție de secvența existentă.

Lipazele au fost de asemenea utilizate în reacțiile de amidare ale aminoacizilor și ale unor acizi organici. Hacking și colaboratorii [121], precum și Wegman și colaboratorii [122], au descris sinteza D-fenilglicinamidei utilizând Novozyme 435, lipaza imobilizată din *Candida antarctica* B (Cal-B), cu carbamat de amoniu sau amoniac (sursă nucleofilă de amoniac). Randamentele au variat între 17 și 70%, în funcție de lungimea lanțului alchil al esterului și de condițiile de reacție.

Metoda chemo-enzimatică de sinteză a arilamidelor C-terminale ale aminoacizilor și peptidelor a fost descrisă de Nuijens și colaboratorii [123] folosind preparatul enzimatic comercial alcalază (Figura 1.20). În condiții aproape anhidre, se pot obține arilamide ale aminoacizilor sau peptidelor protejate la gruparea N-terminală (N-Cbz, N-benzioxycarbonil) pornind de la acizii sau esterii (metil sau benzil) corespunzători. Randamentele obținute au fost cuprinse între 50 și 95%, în funcție de dimensiunea substituentului aril. Reacția a avut loc cu selectivitate ridicată chiar și în prezența grupelor funcționale (β/γ -carboxil, hidroxil și grupări guanidinice) din catenele laterale. În plus, folosirea proteazei cisteinice papaina și a lipazei Cal-B, a dus la obținerea anilidelor cu randamente ridicate.

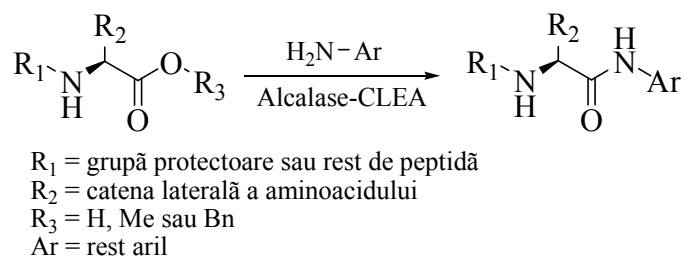


Figura 1.20. Schema de sinteză a arilamidelor peptidelor catalizată de alcalase-CLEA

Recent, Boeriu și colaboratorii au descris o nouă metodă eficientă de sinteză a amidelor peptidelor C-terminale prin amonoliza esterilor metilici corespunzători folosind carbamat de amoniu și subtilizina A din *Bacillus licheniformis*, în mediu de solvent organic polar, cu un conținut redus de apă (Figura 1.21). Condițiile optime pentru sinteza Z-Ala-Phe-NH₂ au fost: temperatura 30°C, compoziția solventului Bu^tOH/DMF, 82,5:17,5 (% vol), conținutul de apă 0,2% (% vol) și raportul carbamat de amoniu/Z-Ala-Phe-OMe 10:1. Randamentul maxim de produs (87%) a fost obținut după 21 de ore de reacție [116].

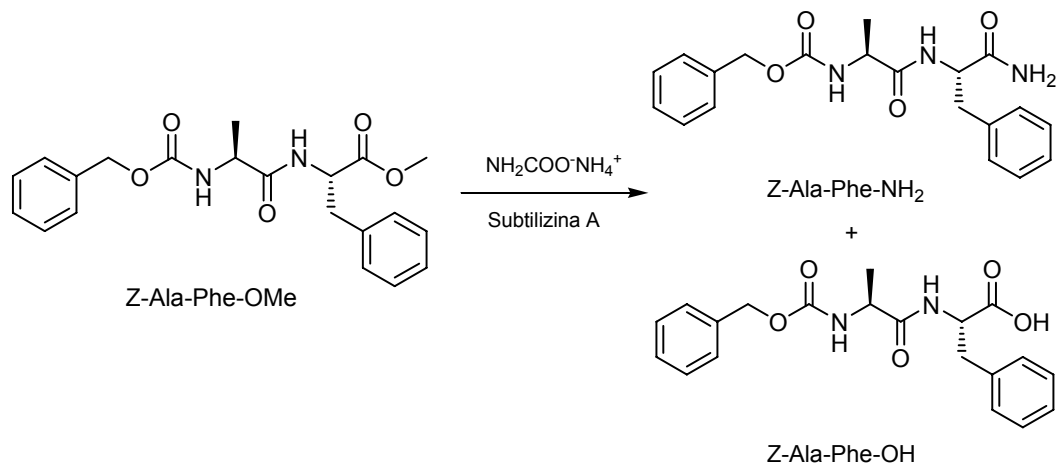


Figura 1.21. Schema de sinteză a Z-Ala-Phe-NH₂ catalizată de subtilizina A

Importanța amidelor C-terminale în bioactivitate

Activitatea biologică a amidelor C-terminale este determinată de raportul dintre intensitatea relativă de acțiune a amidei peptidei și intensitatea relativă a peptidei libere corespunzătoare. Pentru cele mai cunoscute peptide amidate obținute *in vivo*, respectiv *in vitro*, acest parametru este prezentat în tabelele 1.8 și 1.9.

Tabelul 1.8. Activitatea biologică a peptidelor amidate obținute *in vivo*

Peptida	Sursa	Numărul de aminoacizi	Aminoacidul C-terminal	Activitate
Neurokinina	Mamifere	10	Met-NH ₂	> 10000
Alatostatina	Gândaci de bucătărie	13	Leu-NH ₂	> 10000
TRH	Porcine, ovine	3	Pro-NH ₂	4400
Calcitonina	Om	32	Pro-NH ₂	1670
CRF	Ovine	41	Ala-NH ₂	1000
Gastrina I	Om	17	Phe-NH ₂	> 500
Oxitocina	Mamifere	9	Gly-NH ₂	130-2500
Calcitonina	Porcine	32	Pro-NH ₂	33

Amidarea *in vitro* a precursorului glicină este cea mai convenabilă metodă pentru producerea peptidelor mai lungi și a peptidelor scurte conținând secvențe de aminoacizi care prezintă dificultăți în sinteză, scindare sau deprotecție [115].

Tabelul 1.9. Activitatea biologică a peptidelor amidate obținute *in vitro*

Peptida	Sursa	Numărul de aminoacizi	Aminoacidul C-terminal	Activitate
Morficeptina	Bovine	4	Pro-OH	6,6
ATCH (1-17)	Om	17	Met-OH	6,3
[Met] Enkefalina	Om	5	Met-OH	3,0
PTH (1-34)	Bovine	34	Phe-OH	2,6
γ -Endorfina	Om	17	Leu-OH	2,2
α -Endorfina	Om	16	Thr-OH	2,0
Megainina 2	Broască	23	Ser-OH	2,0
Cecropina P1	Porcine	31	Arg-OH	0,7-2,9

Datele prezentate în aceste tabele sprijină ferm ipoteza că amidarea la carbonul C-terminal este necesară pentru exprimarea activității biologice totale.

1.7.2. Deprotecția enzimatică a carboxilului terminal

În ultimii ani a crescut foarte mult interesul pentru dezvoltarea metodelor enzimatică în sinteza peptidelor. Este cunoscut faptul că enzimele au capacitatea de a scinda anumite grupări protectoare, deci pot fi utilizate în deprotecția peptidelor. De exemplu, grupările esterice C-terminale ale peptidelor pot fi hidrolizate de către lipaze, esteraze și proteaze. Dintre acestea, lipazele și esterazele sunt considerate a fi favorabile în sinteza peptidelor, în timp ce proteazele prezintă dezavantajul capacității de hidroliză a legăturilor peptidice (activitate endopeptidazică).

În sinteza convergentă a peptidelor toate fragmentele C-terminale trebuie să fie protejate cu o funcțiune care poate fi deprotejată selectiv în timpul sintezei. Fragmentul trebuie să fie stabil în condițiile sintezei peptidei și de asemenea în condițiile deprotecției temporare a grupării N-terminale, care se repetă la fiecare ciclu al sintezei. Mai mult, gruparea protectoare N-terminală și cele corespunzătoare catenelor laterale trebuie să rămână neafectate atunci când gruparea esterică C-terminală este îndepărtată. Datorită stabilității ridicate, ușurinței de introducere și disponibilității comerciale, esterii *tert*-butilici sunt preferați.

Câțiva ani în urmă, s-a descoperit că anumite lipaze și esteraze care dețin în structura lor secvența de aminoacizi GGG(A)X (G-glicină, X-aminoacid oarecare; în cazul unor enzime, aminoacidul glicină este înlocuit cu alanina, A) prezintă activitate în deprotecția selectivă a esterilor *tert*-butilici ai aminoacizilor și compușilor înrudiți. *p*-nitrobenzil esteraza din *Bacillus subtilis* produsă de bacteria *E. coli* (BsubpNBE) și lipaza A din *Candida antarctica* (CaL-A) s-au dovedit a fi cele mai eficiente în reacția de hidroliza a esterilor *tert*-butilici ai aminoacizilor (de exemplu, Boc-Tyr-O^tBu, Z-GABA-O^tBu, Fmoc-GABA-O^tBu) [124]. Aceste enzime nu au fost testate în reacția de hidroliză a esterilor *tert*-butilici ai peptidelor, cu excepția unei dipeptide pentru care acestea nu au prezentat activitate. În general, peptidele protejate se dizolvă în solvenți organici polari (de exemplu, DMF, diclorometan, metanol, acetonitril).

În ciuda faptului că proteazele sunt mai puțin preferate în deprotecția peptidelor, *thermitaza*, o serin-protează din *Thermoactinomyces vulgaris*, a dovedit a avea specificitate ridicată pentru hidroliza esterilor metilici, etilici, benzilici, metoxibenzilici- și *tert*-butilici ai di- și oligopeptidelor N-protejate la pH 8,0, 55°C, 10-60% solvent organic [125, 126, 127]. Acesta protează a fost de asemenea

utilizată în deprotecția esterilor *terț*-butilici C-terminali ai glicopeptidelor (Figura 1.22) [128].

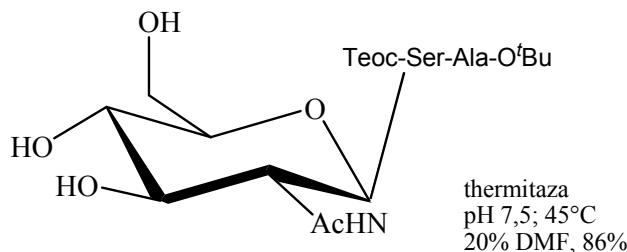
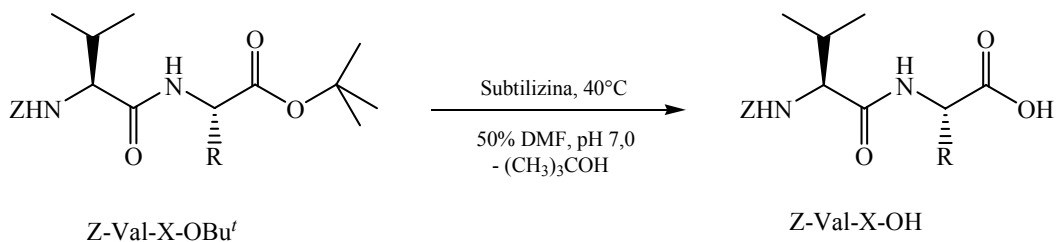


Figura 1.22. Deprotecția selectivă a esterilor *terț*-butilici ai glicopeptidelor catalizată de proteaza thermitază

Subtilizina, protează din *Bacillus licheniformis*, a fost utilizată cu succes pentru deprotecția selectivă a 25 de dipeptide cu structura generală Z-Val-X-O^tBu, unde X a fost un aminoacid natural, cu sau fără catenă laterală protejată (Figura 1.23) [8].



R = catena laterială a aminoacidului rezidual

Figura 1.23. Hidroliza selectivă a dipeptidelor model având structura generală Z-Val-X-O^tBu

Optimizarea ulterioară a procesului a condus la obținerea conversiei totale în cazul anumitor substraturi, în 50% DMF, 0,1 M tampon fosfat de pH 7,0 și temperatura de 40°C. Prezența substituenților voluminoși la carbonul din poziția α a aminoacidului X a determinat scăderea concentrației de produs obținut.

Deoarece proteazele sunt capabile să scindeze legăturile peptidice, pentru a identifica fragmentele susceptibile scindării, reactivitatea tetrapeptidelor cu formula generală Z-Val-Val-X-Leu-O^tBu a fost investigată. S-a observat că activitatea endopeptidazică depinde de aminoacidul din poziția P₂, Gln, Leu, Met, Lys(Boc), Trp(Boc), Tyr(^tBu), Ala, fiind cei mai reactivi [8].

1.8. Imobilizarea enzimelor

Enzimele și celulele întregi sunt catalizatori ce prezintă proprietăți excelente, capabile să catalizeze majoritatea proceselor chimice complexe în diferite condiții experimentale. Cu toate acestea, utilizarea industrială a enzimelor este destul de limitată datorită instabilității termice și chimice, dificultății de a fi recuperate din mediul de reacție, costului ridicat al biocatalizatorului, etc [129].

Aceste dezavantaje pot fi eliminate prin imobilizarea enzimelor. Metodele de imobilizare pe un suport solid (silice, aluminiu, sticlă, agaroză sau celuloză) prezintă avantajele fixării moleculelor de enzimă în interiorul suportului, ceea ce reduce pierderea activității catalitice determinată de procesul de autoliză și îmbunătățește stabilitatea termică și operațională a enzimelor [130].

Principalele avantaje ale enzimelor imobilizate în raport cu cele solubile sunt următoarele:

- toxicitate scăzută;
- costuri scăzute;
- activitate și selectivitate ridicată;
- stabilitate din punct de vedere chimic și termic în condițiile de proces și de păstrare;
- insolubilitate în mediul de reacție;
- stabilitate mecanică;
- rezistență la atacurile microbiene;
- posibilitate de reutilizare.

În funcție de proprietățile enzimelor, cum ar fi, dimensiunea, reactivitatea chimică a grupelor funcționale, grupările ionice și domeniile hidrofobe, există diferite forme de imobilizare a enzimelor:

- legare necovalentă (adsorbție);
- legare covalentă și înrețelare (cross-linking);
- entrapare [131].

Studiile recente au demonstrat că, prin combinarea rațională a diferitelor metode de imobilizare se pot elimina anumite dezavantaje, care nu pot fi excluse folosind metoda individuală.

1.8.1. Imobilizarea prin entrapare

Pe lângă reutilizarea enzimei, tehnicile de imobilizare oferă, în plus, avantaje cum sunt separarea produsului și operarea în sistem continuu. În cazul obținerii cu succes al unui biocatalizator care să prezinte proprietăți superioare, suportul de imobilizare este considerat cea mai importantă componentă [3].

Tehnica entrapării este una dintre cele mai simple metode de imobilizare a enzimelor și celulelor întregi, fiind a treia metodă descoperită după imobilizarea prin legare covalentă și adsorbție. Prin entrapare se înțelege procesul prin care enzima este încorporată într-o matrice formată prin procedee fizice sau chimice, cum ar fi înrețelarea sau gelifierea. În general, rețeaua de entrapare este formată în timpul procesului de imobilizare. Moleculele de enzimă pot fi încorporate fizic sau covalent

în matricea de imobilizare, prin urmare entraparea se poate clasifica în: entrapare covalentă și entrapare chimică [132]. În timpul procesului de imobilizare, structura moleculei de enzimă este păstrată aproape nemodificată, de aceea această metodă este considerată una dintre cele mai eficiente.

1.8.1.1. Activitatea enzimelor entrapate

Retenția activității enzimelor imobilizate reprezintă de obicei raportul dintre activitatea specifică a enzimei imobilizate (U/mg proteină imobilizată) și activitatea specifică a enzimei libere (U/mg proteină). De multe ori nu se reușește precizarea comportamentului catalitic al enzimelor imobilizate în medii neconvenționale (solvenți organici), deoarece activitatea măsurată în mediu apos nu se corelează cu activitatea în solvenți organici [132]. De aceea, activitatea reținută se referă strict la activitatea măsurată în medii de reacție apoase. Activitatea enzimelor imobilizate prin entrapare este dependentă de mai mulți factori: natura matricei de sol-gel, dimensiunea particulelor, încărcarea cu enzimă, aditivi, metoda și condițiile de imobilizare.

Efectul încărcării cu enzimă asupra activității

Activitatea enzimelor imobilizate în matrici polimerice depinde de limitările de difuziune. De exemplu, influența încărcării cu enzimă asupra activității a fost observată pentru lipaza din *Candida rugosa* (CrL) entrapată în sol-gel [133]. Profilul de activitate al lipazei CrL entrapate în matrici de ENTP 4000 a fost complet diferit de cel al lipazei imobilizate prin adsorbție sau legare covalentă, deoarece activitatea enzimei este liniar dependentă cu cantitatea de enzimă adăugată la imobilizare [134]. Activitatea aceleiași enzime imobilizate în matrici de PVA [135], precum și activitatea subtilizinei Carlsberg entrapată în matrici de silice [64] au fost de asemenea puternic influențate de cantitatea de enzimă entrapată.

Influența naturii suportului de imobilizare asupra activității

Suporturile de imobilizare se clasifică în patru grupe: suporturi hidrofobe, hidrofile, încărcate electric sau neutre. Cu toate acestea, dependența activității enzimatică de hidrofilicitatea substratului diferă de la o enzimă la alta. Activitatea colesteroloxidazei imobilizate în geluri de poliacrilamidă a fost de patru ori mai mare decât în geluri de alginat. Deoarece gelul de poliacrilamidă este neutru, iar cel de alginat este încărcat negativ, s-a ajuns la concluzia că hidrofobicitatea gelului sau interacțiunile electrostatice pot fi cruciale pentru activitate [132]. β -glucozidaza imobilizată în alginat de calciu (3% alginat, 0,2 M CaCl_2) a reținut 66% din activitatea enzimei native, în timp ce activitatea în gel de poliacrilamidă (20% acrilamidă și 1,2% bis-acrilamidă) a fost de 55% [136]. Mai mult, constanta Michaelis-Menten (K_m) a β -glucozidazei imobilizate în gel de poliacrilamidă a avut aproximativ aceeași valoare cu cea a enzimei libere, sugerând că suportul de imobilizare este neutru și că limitările difuzionale sunt minime [137]. În cazuri speciale, valoarea activității reținute a enzimei imobilizate poate depăși 100% datorită efectului de activare a enzimelor (lipaze) la interfață [138].

Controlul difuziunii asupra activității

În cazul enzimelor entrapate în matrici de sol-gel apar constrângerile legate de difuziune. Activitatea regăsită după imobilizare este dependentă de dimensiunea particulelor, porozitate și dimensiunea porilor. De obicei, valoarea acestora scade

după imobilizare datorită limitărilor difuzionale. Activitatea regăsită după imobilizarea în sol-gel a lipazei din *Candida rugosa* a fost de 10-20%. Cu toate acestea, enantioselectivitatea enzimei imobilizate a fost mai mare decât în cazul enzimei native în reacția de sinteză a esterului (S)-ibuprofenului pornind de la amestecul racemic de ibuprofen și izooctan. Stabilitatea lipazei a fost de asemenea îmbunătățită după imobilizare. Printre strategiile abordate în vederea minimizării constrângerilor de difuziune se numără tehnica folosirii unor aditivi inerti la imobilizare (de exemplu, zaharuri, surfactanți sau PEG) [132].

Influența aditivilor folosiți la imobilizare asupra activității

Ca și în cazul altor tehnici de imobilizare, activitatea enzimelor entrapate este influențată de aditivii adăugați în timpul procesului de imobilizare [139, 140]. Aceștia au următoarele funcții:

- atenuarea constrângerilor de difuziune;
- creșterea porozității;
- creșterea sau diminuarea activității;
- modificarea conformației enzimei [141].

Unii aditivi ar putea îmbunătăți coeficientul de difuziune, prin obținerea unei structuri foarte poroase așa cum s-a demonstrat la imobilizarea ureazei în matrici derivate de metacrilat de 2-hidroxietyl și/sau N-vinil-2-pirolidonă [142]. Se pot folosi ca aditivi următorii compuși: eteri, polizaharide, PEG, surfactanți, săruri de metale [143].

1.8.1.2. Stabilitatea enzimelor entrapate

Majoritatea enzimelor entrapate sunt mai stabile decât cele adsorbite pe un suport solid sau legate covalent de un suport de imobilizare. De exemplu, glucozamida adsorbită pe suporturi neporoase de polietilenimină a fost mai puțin stabilă decât enzima nativă, în timp ce entrapată în matrici polimerice obținute prin fenomenul de polarizare, s-a dovedit a fi mult mai stabilă [132]. Un alt exemplu, pronaza și chimotripsina covalent atașate de filme de polidimetilsiloxan (PDMS) au fost mai puțin stabile decât enzimele entrapate [144]. Raviyan ș.a. au demonstrat că prin entraparea α -amilazei în gel de poli(acrilamidă), stabilitatea termică a crescut de 5 ori la 60°C [145]. De asemenea, timpul de înjumătățire al lipazei imobilizate în sol-gel a fost de 51 de ori mai mare decât al enzimei native [146]. Aceste exemple demonstrează că ar putea exista un mecanism comun de stabilizare al enzimei prin tehnica de entrapare în sol-gel.

Influența naturii suportului de imobilizare asupra stabilității

Stabilitatea termică și operațională a enzimelor este dependentă de proprietățile monomerilor și matricii de imobilizare [147]. Metodele folosite pentru obținerea unor preparate enzimatiche stabile se pot clasifica în următoarele grupe:

- intensificarea efectelor de limitare folosind tehnica sol-gel;
- entrapare-stabilizare;
- tehnica de imobilizare dublă;
- entrapare-înrețelere (cross-linking).

Prin entraparea biomoleculelor în sol-gel, limitarea maximă poate fi obținută datorită contracției gelului (dimensiunea porilor scade de la 20 nm la 2-5 nm) în timpul maturării acestuia. De aceea degradarea structurii terțiare poate fi mult mai redusă. Stabilizarea prin entrapare se bazează pe faptul că enzima stabilizată, de exemplu prin modificare chimică, poate fi supusă apoi imobilizării prin tehnici de entrapare corespunzătoare. S-a demonstrat că stabilitatea și proprietățile tirozinazei (din ciuperci) entrapate în geluri de alginat și poliacrilamidă sunt dependente de natura matricei de imobilizare [132].

Dependența stabilității de structura enzimei

Efectul stabilizator al metodei de imobilizare este dictat în cele din urmă de orice schimbare în structura enzimei. În cazul în care structura enzimei se modifică în timpul procesului de imobilizare, stabilitatea se poate îmbunătăți.

1.8.1.3. Selectivitatea enzimelor entrapate

Ca și în cazul celorlalte metode de imobilizare, entraparea fizică este în măsură să afecteze selectivitatea enzimelor, fără modificarea chimică a acestora. Aceasta sugerează că enantioselectivitatea nu este determinată doar de secvența aminoacizilor, ci și de mediul de imobilizare (care poate fi modificat prin adăugarea aditivilor sau suporturilor de imobilizare). Prin urmare, îmbunătățirea enantioselectivității enzimei entrapate ar putea fi atractivă datorită simplității și aplicabilității universale. În general, îmbunătățirea selectivității enzimei poate fi influențată de:

- mediu;
- limitările difuzionale;
- modificarea conformațională [132].

Influența suportului de imobilizare asupra selectivității

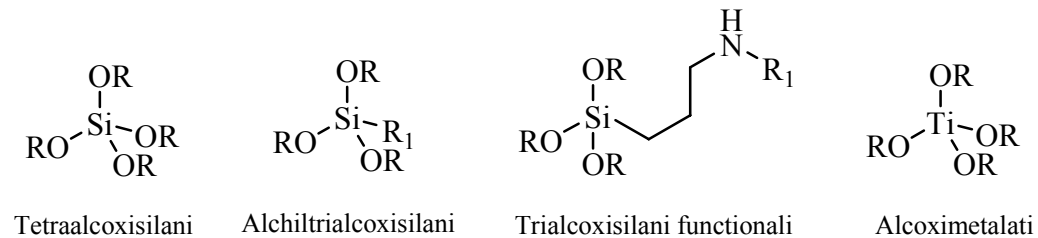
Suportul de imobilizare este strâns legat de formația enzimei. Astfel, 2-manozidaza imobilizată în gel de alginat de sodiu a avut un spectru diferit comparativ cu enzima nativă [148]. În mod asemănător, selectivitatea glucoamilazei entrapate a fost diferită față de enzima adsorbită pe un suport solid, probabil datorită limitărilor difuzionale [149]. De asemenea, enantioselectivitatea lipazei din *Rhizopus miehei* a fost îmbunătățită prin entrapare în sol-gel [150]. S-a demonstrat de asemenea, că aditivii sau eterii adăugați la imobilizare influențează enantioselectivitatea enzimelor entrapate [151].

Influența naturii suportului solid asupra selectivității

Furukawa și colaboratorii au demonstrat că lipaza imobilizată în matrice de sol-gel derivate din dimetildimetoxisilan (DMDMOS) și tetrametoxisilan (TMOS) și apoi adsorbită pe Celite 545 a fost de până la 10 ori mai eficientă decât cea doar adsorbită pe Celite. Enantioselectivitatea a fost îmbunătățită cu creșterea lanțului alchil, sugerând că natura silanului precursor poate determina modificarea conformațională a enzimei [152].

1.8.2. Tehnica de imobilizare a enzimelor în sol-gel

În ultimul deceniu, încapsularea enzimelor în interiorul rețelelor anorganice de sol-gel a devenit o metodă generică de obținere a biocatalizatorilor eficienți, ușor de reciclat, datorită simplității și stabilizării structurii terțiare a proteinelor prin formarea rețelei rigide de sol-gel [153, 154]. Astfel, sol-gelurile reprezintă o nouă clasă de materiale care s-au dovedit a fi potrivite pentru imobilizarea enzimelor și a altor biomolecule. Ele pot fi împărțite în două clase, în funcție de natura precursorilor: precursori anorganici și precursori alcoxidici. Precursorii folosiți la entraparea enzimelor în sol-gel sunt în general notați cu $(RO)_4Si$. Calea alcoxidică este importantă pentru materialele utilizate la imobilizare și implică transformarea acestor precursori într-un polimer anorganic reticulat. Precursorii alcoxidici pot fi: tetraalcoxisilani, alchiltrialcoxisilani, trialcoxisilani funcționali, alcoximetalați.



Procesul de formare a solului are loc la temperatură scăzută, implicând hidroliza și policondensarea silanilor precursori (Figura 1.24).

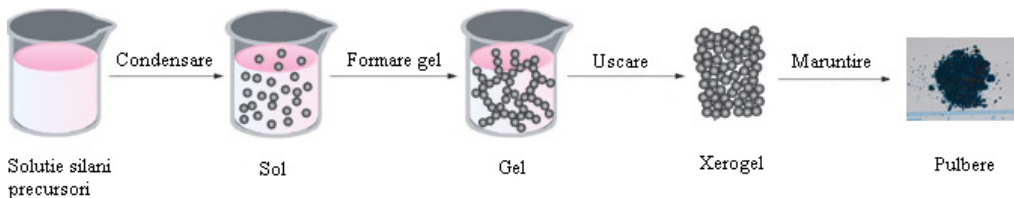


Figura 1.24. Procesul de obținere a xerogelului

Materialele ceramice obținute sunt non-toxice, compatibile din punct de vedere biologic și nu se dilată în soluție apoasă sau solvenți organici, prevenind pierderea biomoleculei entrapate [155, 156, 157]. Comparativ cu alte metode de imobilizare, tehnica de entrapare în sol-gel prezintă mai multe avantaje:

- imobilizarea unei cantități mari de enzimă;
- stabilitatea termică și chimică;
- procedeul de obținere este simplu, neimplicând modificări covalente în structura enzimei care ar putea determina inactivarea enzimei;
- flexibilitatea controlului dimensiunii și geometriei porilor.

Biomoleculele entrapate în sol-gel, prezintă de obicei stabilitate operațională ridicată și rezistență la denaturarea termică și chimică. Această tehnică a fost aplicată pentru a imobiliza biomolecule diferite (proteine, enzime, anticorpi) folosind tetraalcoxisilani (tetrametoxisilan, TMOS sau tetraetoxisilan, TEOS) ca precursori [4]. Stabilitatea preparatelor enzimatice este dependentă de concentrația de enzimă, pH, tăria ionică și de alte condiții de imobilizare [158].

Sol-gelurile de siliciu sunt materiale extrem de poroase, ușor de obținut și de modificat. Matricea de sol-gel formată este un material inert chimic din sticlă, putând fi proiectată pentru a prezenta stabilitate mecanică și termică. În prima etapă a procesului de imobilizare, are loc hidroliza parțială sau completă a precursorului corespunzător (de exemplu, metiltrimetoxisilan) într-un solvent organic, de exemplu alcoolii, pentru a forma un sol apos. Reacția de hidroliză poate avea loc în cataliză acidă, bazică sau nucleofilă. Hidroliza este apoi urmată de reacții de condensare, formându-se solul, care este un amestec de monomeri parțial hidrolizați și condensați. Precursorul hidrolizat este apoi amestecat cu soluția de enzimă, alături de catalizatori, aditivi pentru controlul uscării, agenți de modelare, necesari pentru modificarea proprietăților materialului finit. În continuare, prin condensarea monomerilor are loc formarea gelului, în care porii sunt umpluți cu apă. Acest gel umed poate fi uscat prin procesul de evaporare al apei și alcoolului rezultat în urma hidrolizei precursorilor monomeri. În aceste condiții, forțele capilare vor provoca micșorarea semnificativă a sol-gelului, pierzându-se o parte din structura sa. Gelul uscat obținut se numește xerogel (Figura 1.25). Deoarece, după maturare, dimensiunile porilor de gel sunt, de obicei, între 2-20 nm, materialele sunt clasificate ca materiale mezoporoase.

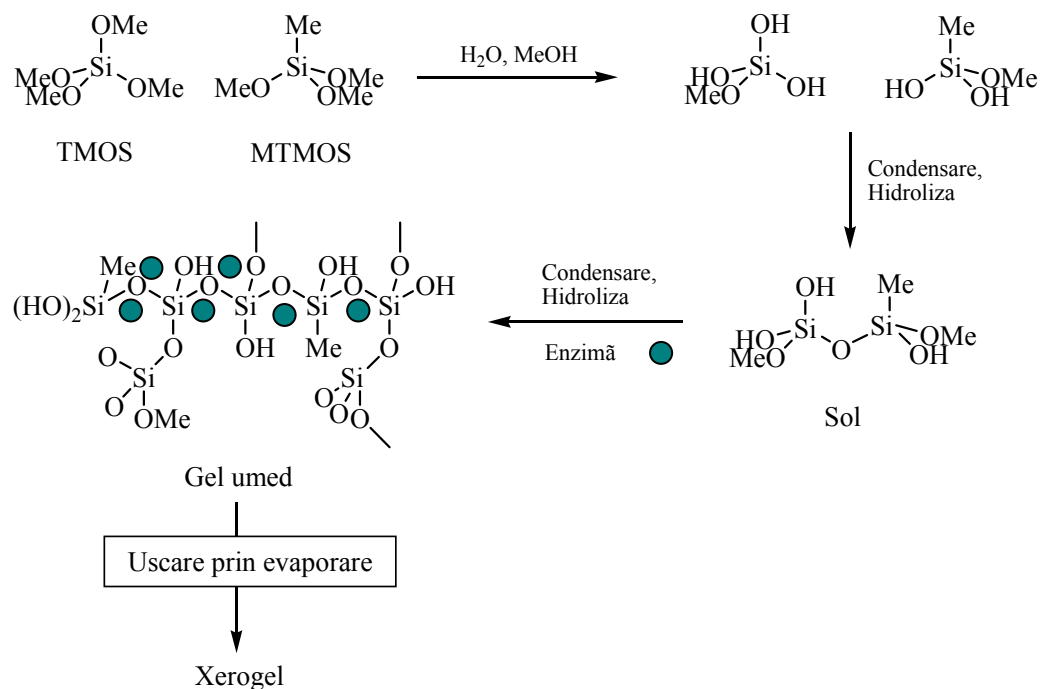


Figura 1.25. Schema de sinteză a matricei de sol-gel

În cazul în care la imobilizare se folosește un alchiltrialcoxisilan (de exemplu, metiltrimetoxisilan) gelul obținut va avea o suprafață hidrofobă. Prin modificarea suprafeței, acesta va putea fi folosit fie ca suport hidrofil formând legături de hidrogen cu enzima, fie ca suport hidrofob [159].

Pentru creșterea randamentului de regăsire al activității, este necesară folosirea aditivilor, cum ar fi PEG, zaharuri, surfactanți pentru a modula dimensiunea porilor și a crește permeabilitatea substratului prin pori și accesibilitatea enzimei [160]. Cu toate acestea, exprimarea activității enzimatică este dictată de mai mulți factori, de exemplu, natura precursorilor [151], aditivii folosiți la imobilizare, procesul de uscare [161] și proprietățile substratului [162].

Principalul dezavantaj al metodei sol-gel este că nu toate moleculele de enzimă entrapate sunt catalitic active [163]. Unele dintre acestea, aflate în interiorul matricei de sol-gel, ar putea fi inactivate în timpul procesului de entrapare sau pot fi fizic inaccesibile moleculelor de substrat, în ciuda structurilor lor native (Figura 1.26).

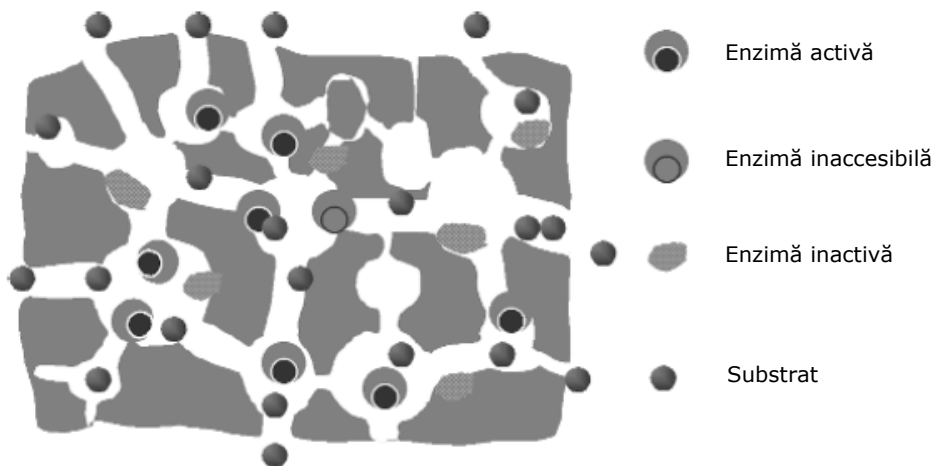


Figura 1.26. Accesibilitatea moleculară a enzimelor entrapate în matricea sol-gel [132]

Pentru a se putea realiza imobilizarea biomoleculelor prin procesul sol-gel este nevoie de îndeplinirea următoarelor cerințe generale:

- Metoda trebuie să fie aplicabilă soluțiilor apoase, deoarece acestea sunt necesare pentru menținerea funcției biologice a biomoleculelor.
- Reacția de polimerizare trebuie să fie compatibilă cu domeniile de pH și cele de tărie ionică necesare pentru funcționarea proteinei (pH 4-10, tărie ionică 0,01-1,00M).
- Procesul trebuie să aibă loc la temperatura apropiată de temperatura camerei pentru a menține conformația nativă a proteinelor.
- Materialele trebuie să aibă dimensiunea porilor suficient de mică pentru a preveni antrenarea moleculelor în soluție, dar destul de mare pentru a permite compușilor cu molecule mai mici să pătrundă în interiorul matricei cu ușurință.

- Proprietățile materialului ar trebui să permită modificarea mediului intern pentru a favoriza activitatea biomoleculelor entrapate.
- În cazul în care este folosit drept componentă a unui biosenzor, materialul final trebuie să fie transparent din punct de vedere optic sau conducător de electricitate, pentru a permite măsurători spectroscopice sau electrochimice.
- Fabricarea materialului trebuie să fie simplă, directă și reproductibilă permițând obținerea unei varietăți de forme ce includ sticlă groasă, filme subțiri, fibre, pudră, etc. [17].

Obținerea performanțelor ridicate ale enzimelor imobilizate (activitate, stabilitate și selectivitate), necesită selectarea precursorilor corespunzători și optimizarea raportului molar al acestora. Disponibilitatea precursorilor cu diferite proprietăți chimice (hidrofili sau hidrofobi, încărcăți pozitiv sau negativ, activi sau inerti) este principalul mijloc de îmbunătățire al proprietăților enzimaticice. De asemenea, cercetătorii au demonstrat că aditivii folosiți la imobilizare joacă un rol foarte important în creșterea performanțelor catalitice ale enzimelor. De exemplu, 1,3-d-glucanaza imobilizată în matrici derivate de tetrakis(2-hidroxiethyl)ortosilicat (THEOS) nu și-a pierdut activitatea, în timp ce activitatea α -D-galactozidazei a fost dependentă de natura polizaharidei folosite ca aditiv [140].

În funcție de metoda selectată, matricea de sol-gel are un efect substanțial asupra performanțelor enzimelor imobilizate, de exemplu, asupra activității, selectivității și stabilității. Astfel, este esențială selectarea metodei adecvate, în conformitate cu particularitățile și aplicațiile fiecărei enzime.

1.8.3. Aplicațiile enzimelor imobilizate în procesele continue

Enzimele imobilizate pot funcționa atât în sistem continuu, cât și discontinuu. În procesele discontinue, enzima este recuperată pentru a fi utilizată în șarjele ulterioare, până în momentul în care se inactivează și necesită înlocuirea. În consecință, productivitatea specifică (masa de produs/masa de biocatalizator · timpul de operare) crește, iar bioreactorul este proiectat pentru a satisface nevoile unui anumit proces. Funcționarea în sistem continuu a enzimelor este strict legată de imobilizarea acestora, deoarece stabilitatea trebuie să fie ridicată în acest context. Mai multe configurații de reactoare au fost propuse și folosite pentru efectuarea proceselor catalizate enzimatic (Figura 1.27)

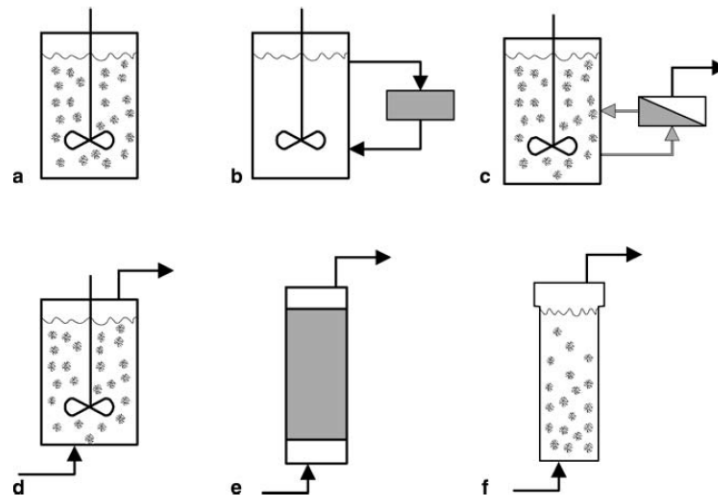


Figura 1.27. Diferite configurații ale reactoarelor cu enzime imobilizate: a: discontinuu; b: discontinuu cu recirculare; c: cu agitare și ultrafiltrare; d: continuu cu agitare; e: continuu în strat fix de biocatalizator; f: continuu în strat fluidizat [15]

Cele mai utilizate reactoare sunt cele în strat fix de biocatalizator (packed-bed reactors, PBR) în care enzima imobilizată este fixată în interiorul unui reactor, iar soluția de substrat este trecută peste acesta și reactoarele cu agitare, în care enzima este reținută în interiorul acestora sau recuperată prin filtrare sau centrifugare și reutilizată. O alternativă este reactorul în strat fluidizat, în care particulele de enzima sunt reținute prin echilibrul hidrodinamic dintre forța gravitațională și forțele produse de debitul soluției de substrat.

Funcționarea reactoarelor în strat fix este continuă, cu un debit constant de alimentare. Reactorul poate fi alimentat de jos în sus. La scară de laborator este de preferat această metodă, deoarece este mai simplu să se mențină nivelul de lichid deasupra stratului de biocatalizator, evitându-se în acest fel compactarea. La scară industrială, este frecvent utilizată alimentarea de sus în jos, deoarece se reduce necesarul de energie pentru pompare. În acest caz, compactarea stratului de enzimă poate fi controlată prin schimbarea periodică a debitului, care mai are ca scop curățarea biocatalizatorului [15].

Gea și colaboratorii au realizat hidroliza enzimatică totală în sistem continuu a cazeinei folosind endo- și exopeptidaze imobilizate pe suporturi de chitină. Dintre enzimele testate, proteaza din *Aspergillus oryzae* s-a dovedit a fi cea mai eficientă [164].

Stabilitatea operațională a subtilizinei Carlsberg imobilizată prin înrețelare (CLECs) a fost de asemenea studiată în sistem continuu și discontinuu [66].

Producția pe scară largă a monoacilglicerolilor a fost realizată în sistem continuu în strat fix folosind lipaza PS din *Pseudomonas cepacia*. Randamentul maxim a fost atins după 24 de ore de reacție [165].

Hidroliza inulinei a fost realizată cu succes în regim continuu folosind o exoinulinază covalent imobilizată pe Duolite A568. Reactorul în strat fix a funcționat continuu timp de 75 de zile, timpul de înjumătățire al acestuia fiind atins după 72 de zile la 55°C [166].

1.9. Concluzii

În ultimii ani s-a îndreptat atenția asupra dezvoltării și obținerii unor noi procese și produse ecologice cu impact redus asupra mediului înconjurător și a sănătății umane, dar viabile din punct de vedere economic. Sinteza enzimatică a peptidelor cu efect terapeutic s-a dovedit într-o serie de procese o alternativă promițătoare pentru industria farmaceutică. Astfel, biocataliza în medii neconvenționale a extins spectrul aplicațiilor proteazelor în acele reacții care nu pot avea loc în medii apoase, și anume sinteza peptidelor în schimbul hidrolizei acestora. Prin utilizarea peptidelor biologic active în industria medicamentelor se reduce astfel costul și timpul de desfășurare a studiilor de toxicitate necesare pe parcursul procesului, precum și încercările clinice. Producția la scară industrială este favorizată de folosirea enzimelor imobilizate, deoarece acestea oferă o serie de avantaje comparativ cu cele solubile: condiții blânde de reacție, reutilizarea biocatalizatorului, evitarea autolizei enzimei care ar putea determina formarea metaboliților secundari.

Cercetările efectuate în cadrul tezei de doctorat au urmărit obținerea de noi biocatalizatori pentru modificarea peptidelor la gruparea carboxil terminală. S-a pus accent pe imobilizarea alcalazei în matrici siliconice de sol-gel, optimizarea metodei de imobilizare, caracterizarea preparatelor enzimatică obținute și optimizarea condițiilor proceselor de hidroliză și amidare ale grupării carboxilice C-terminale a peptidelor, în vederea obținerii unei eficiențe catalitice maxime și a unei selectivități ridicate. S-a studiat structura morfologică, iar enzima imobilizată a fost caracterizată prin determinarea activității catalitice, stabilității termice, operaționale și de condiționare a enzimei. De asemenea, s-a studiat reproductibilitatea metodei de imobilizare, iar alcalaza imobilizată prin tehnica de sol-gel a fost standardizată pentru aplicații în sistemele continue.

În capitolele următoare, sunt prezentate rezultatele originale obținute pe parcursul derulării cercetărilor experimentale.

2. CONTRIBUȚII ORIGINALE

La ora actuală, datorită creșterii gradului de conștientizare cu privire la importanța reglementărilor și siguranței în domeniul sănătății, s-a solicitat căutarea intensivă a alternativelor de obținere a peptidelor biologic active pe cale enzimatică. Producția la scară industrială este însă favorizată de folosirea enzimelor imobilizate, deoarece acestea oferă o serie de avantaje comparativ cu cele solubile (de exemplu, condiții blânde de reacție, reutilizarea biocatalizatorului, evitarea autolizei enzimei, funcționarea în sistem continuu, proces economic).

În cazul aplicațiilor industriale ale noilor procese enzimatic bazate pe modificarea grupării C-terminale a peptidelor este obligatorie o eficiență catalitică ridicată a biocatalizatorului, care să fie stabil în condițiile de proces și să manifeste proprietăți constante indiferent de lotul din care provine. Una din problemele care au fost întâlnite a fost variația largă a eficienței catalitice a diferitelor șarje de alcalază imobilizată. Această reproductibilitate scăzută în calitatea enzimei imobilizate poate fi datorată variației compoziției și proprietăților diferitelor loturi de alcalază utilizate la imobilizare, precum și reproductibilității și controlului scăzut al imobilizării enzimelor prin înrețelare. În prezent, numărul de enzime imobilizate disponibile comercial este limitat la alcalaza-CLEA (furnizată de CLEA Technologies, Delft) și alcalaza legată covalent de o matrice polimerică (furnizată de ChiralVision, Leiden). Cea din urmă, nu a prezentat activitate ridicată în cazul transformărilor dorite. Din această cauză, este necesar studiul imobilizării alcalazei, descoperirea unui catalizator insolubil, robust și eficient în aplicațiile industriale ale sintezei peptidelor. Noul biocatalizator trebuie să prezinte următoarele proprietăți:

- eficiență catalitică în cazul funcționalizării grupării carboxilice C-terminale (de exemplu: amidare și deprotecție);
- activitate catalitică și stabilitate ridicată în medii neconvenționale, aproape anhidre, particular în solvenți organici hidrofilii și amestecuri ale acestora;
- stabilitate termică ridicată;
- proprietăți constante în ceea ce privește activitatea catalitică, stabilitatea procesului și compatibilitatea cu solvenții hidrofilii independent de lotul de proveniență al enzimei, timpul de imobilizare, etc;
- stabilitate operațională ridicată;
- stabilitate bună la depozitare;
- specificitate largă de substrat.

În plus, suportul folosit la imobilizare trebuie să fie inert chimic, stabil și să aibă bune proprietăți mecanice. Enzima imobilizată trebuie să poată fi îndepărtată ușor din amestecul de reacție la sfârșitul acesteia și reutilizată.

Acesta este motivul pentru care teza de doctorat este consacrată obținerii de noi preparate enzimatic stabile care să prezinte eficiență ridicată în deprotejarea și amidarea peptidelor C-terminale. Rezultatele sunt prezentate și discutate în cele 5 subcapitole cuprinse în partea de contribuții originale.

Caracterizarea enzimelor native folosite în acest studiu este prezentată în capitolul 2.1. Astfel, pentru determinarea purității preparatelor comerciale s-au

folosit diferite metode, respectiv electroforeza în gel de acrilamida și cromatografia de excluziune sterică. Capitolul 2.2 prezintă studiul reacțiilor de deprotecție selectivă a esterilor C-terminali ai peptidelor catalizate de alcalaza nativă, cât și imobilizată. Comportarea enzimelor în prezența solventului organic (N,N-dimetilformamidă) a fost de asemenea studiată. În capitolul 2.3, biocatalizatorii obținuți prin imobilizare în sol-gel au fost testați în reacția de amidare a dipeptidei protejate Z-Ala-Phe-OMe. Datorită stabilității ridicate, posibilitatea reutilizării enzimelor a dus la deschiderea unei noi direcții, foarte interesante, aceea de a utiliza enzimele în procesele continue (capitolul 2.4). Astfel, la nivel industrial procesele ar deveni mult mai economice. Caracterizarea morfologică și structurală a biocatalizatorilor a fost discutată în capitolul 2.5.

2.1. Caracterizarea enzimelor native studiate

Enzimele utilizate în studiile ulterioare sunt preparate comerciale produse de tulpina *Bacillus licheniformis*, principala proteină din compoziția lor fiind subtilizina. Alcalaza 2.4L FG este un produs care respectă specificațiile de puritate recomandate pentru enzimele utilizate în produsele alimentare. Activitatea acestei proteaze, obținută prin fermentația submersă a microorganismului, este de 2,4 U/g. Cea de-a doua enzimă, alcalaza 2.5L DX, obținută prin același proces de fermentație submersă prezintă o activitate de 2,5 U/g.

Pentru a determina puritatea enzimelor comerciale folosite în acest studiu am folosit diferite metode, respectiv electroforeza în gel de acrilamidă și cromatografia de excluziune sterică. Rezultatele anterioare obținute în cadrul grupului de cercetare au demonstrat o reproductibilitate scăzută în calitatea enzimei imobilizate prin legare covalentă în reacția de amidare a peptidelor. Astfel, s-a pus întrebarea dacă acest comportament poate fi rezultatul variației compoziției și proprietăților diferitelor loturi de alcalază. Pentru a răspunde la această întrebare, s-a realizat analiza calitativă a proteinelor conținute în preparatele enzimatiche comerciale prin electroforeza în gel de acrilamidă.

2.1.1. Electroforeza pe gel de poliacrilamidă

Dezvoltarea tehnicilor de separare și caracterizare a proteinelor din ultima jumătate a secolului XX-lea, a dus la posibilitatea de a investiga mai îndeaproape compoziția diferitelor fracțiuni proteice ale unui extract provenit din țesuturi animale, plante sau din culturi microbiene. Electroforeza în gel de poliacrilamidă este un procedeu care se folosește pentru a monitoriza complexitatea unui amestec de proteine, prin separarea proteinelor într-un gel de poliacrilamidă pe baza diferențelor de sarcină sub influența câmpului electric. Gelul permite o separare completă, pe baza aceluiași principiu de separare utilizat în cromatografia cu schimb de ioni. Proteinele cu greutatea moleculară cea mai mică vor fi cele care vor migra cel mai repede în gelul de poliacrilamidă, datorită mobilității mai crescute prin pori.

Utilizând geluri de poliacrilamidă pentru electroforeză în condiții denaturante de tipul NuPAGE® NOVEX® Bis-Tris Mini Gels furnizate de Invitrogen™ și protocolul de colorare cu Coomassie Brilliant Blue, s-a obținut aspectul general al fracțiilor proteice din compoziția proteazelor comerciale de tip alcalază (alcalaza 2,4L FG și alcalaza 2,5L DX) produse de tulpina *Bacillus licheniformis*. Interpretarea rezultatelor s-a realizat prin simpla analiză a gelurilor și notarea prezenței sau

absenței benzilor corespunzătoare diferitelor proteine conținute în sistemul enzimatic testat (Figura 2.1).

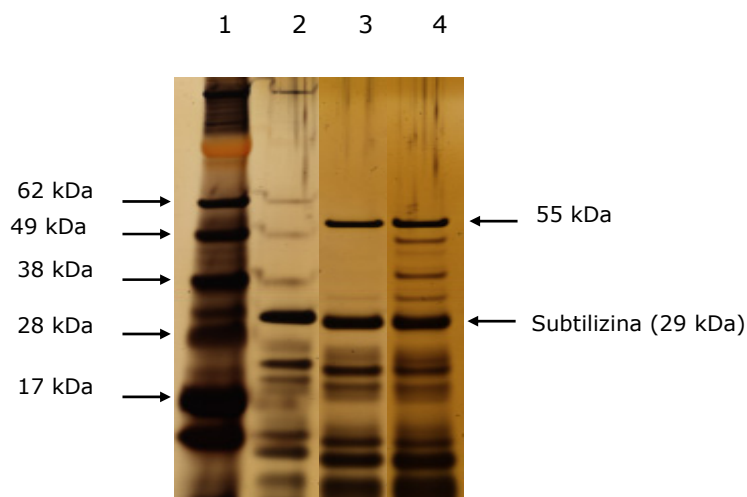


Figura 2.1. Aspectul fracțiunilor proteice separate prin SDS-PAGE din preparatele comerciale de alcalază (*Bacillus licheniformis*). Linia 1, marker conținând proteine standard; linia 2, subtilizina A pură; linia 3, alcalaza 2,5L DX; linia 4, alcalaza 2,4L FG (lot nr. PLN05354)

Sunt vizibile pe gel câteva fracțiuni mai importante cantitativ, cum ar fi fracțiunea proteică de 55 kDa prezentă în ambele preparate comerciale și fracțiunea cea mai intensă corespunzătoare subtilizinei A (29 kDa). Analiza comparativă a celor două enzime analizate evidențiază că alcalaza 2,4L FG prezintă un număr mai mare de benzi cu mase moleculare cuprinse între 29 kDa și 55 kDa, comparativ cu alcalaza 2,5L DX. Numărul mare de proteine cu mase moleculare sub 29 kDa poate fi rezultatul procesului de autoliză enzimatică [167].

Pentru a avea o analiză calitativă clară a proteinelor conținute în preparatele enzimatiche comerciale, precum și eventualele variații în compoziția acestora, s-a realizat electroforeza pe gel de poliacrilamidă (Figura 2.2).

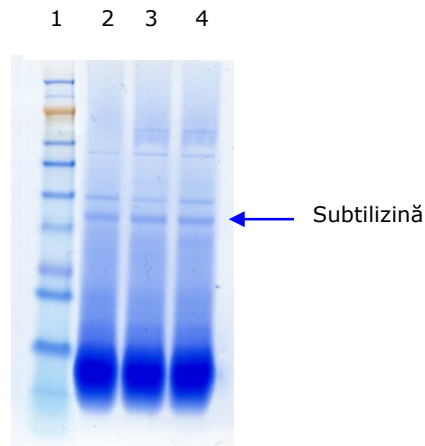


Figura 2.2. Electroforeza pe gel de poliacrilamidă a loturilor de alcalază. Linia 1, marker conținând proteinele standard; linia 2 și 3, alcalaza 2,4L FG lot nr. PLN05354 (loturi identice provenite din experimente diferite); linia 4, alcalaza 2,4L FG lot nr. PLN05361

Din Figura 2.2 se poate observa că loturile de alcalază prezintă o bandă largă la aproximativ 29 kDa care corespunde cu masa moleculară a subtilizinei. Nu se observă diferențe în compoziția acestora, ceea ce dezvăluie o bună reproductibilitate a compoziției proteice.

2.1.2. Cromatografia de excluziune sterică

Pentru o caracterizare mai detaliată a enzimelor am folosit în continuare cromatografia de excluziune sterică. Cromatografia de excluziune sterică denumită și cromatografia de permeație prin gel (GPC) se bazează pe diferențele de mărime și structură ale biomoleculelor. Moleculele mici intră în porii matricei fiind reținute în faza staționară, în timp ce moleculele mari trec prin coloană cu viteze diferite în funcție de greutatea moleculară și structura lor. Pentru a determina masa moleculară a proteinelor, se folosesc proteine marker (în general proteine globulare) cu masa moleculară cunoscută.

Cele două preparate enzimatiche comerciale, alcalaza 2,4L FG și alcalaza 2,5L DX, au fost caracterizate prin cromatografia de excluziune, iar profilul acestora a fost comparat cu cel al subtilizinei pure. Valorile maselor moleculare au fost estimate pe baza volumului de eluție și a curbei de etalonare a coloanei utilizând proteine standard cu MW în intervalul 13,7-232 kDa, conform metodei descrise în capitolul 3.2.4.

Enzima pură prezintă în compoziția sa două proteine principale, subtilizina A ($M = 29$ kDa) și o proteină cu masă mai mică ($M = 13,3$ kDa). Componenta principală a celor trei enzime studiate este subtilizina (Figura 2.3). Atât în compoziția subtilizinei, cât și în cele două preparate de alcalază, se observă prezența unor proteine cu mase moleculare mici, eliberate probabil în urma autolizei enzimei. După cum se observă, profilul enzimatic al celor două preparate comerciale alcalaza 2,4L FG și alcalaza 2,5L DX este comparabil, însă nu este identic. Datorită concentrației foarte mici în amestec, proteinele cu masă moleculară mai mare de 29

kDa (prezente în gelul de electroforeză, Figura 2.1), nu sunt vizibile în cromatogramă (Figura 2.3).

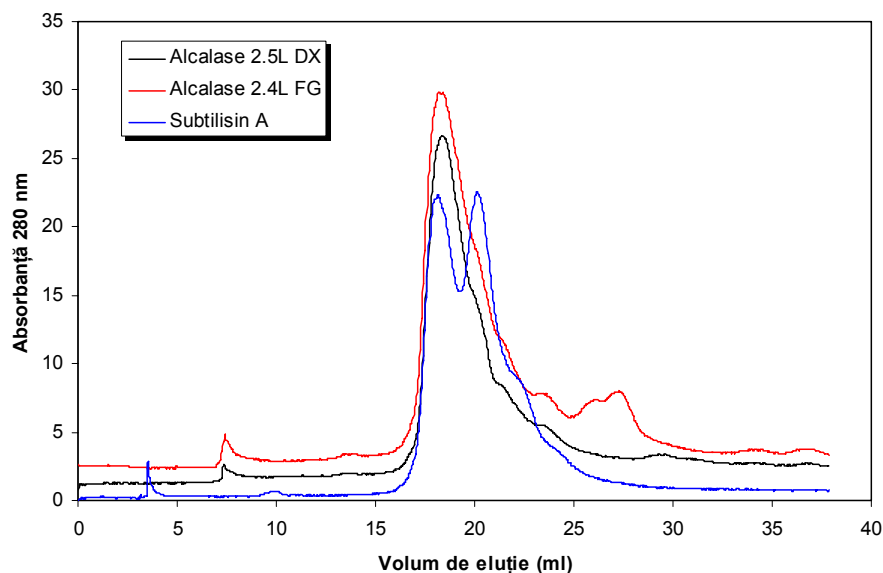


Figura 2.3. Cromatograma preparatelor enzimice studiate și a enzimei pure (subtilizina A)

Fracțiunile colectate în urma separării cromatografice au fost testate în reacția de hidroliză a succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilidei (SAAPF-pNA) determinată prin metoda spectrofotometrică. S-a urmărit astfel protocolul de la punctul 3.2.8. Masa moleculară a proteinelor componente a fost calculată pe baza dreptei de etalonare prezentată în capitolul 3.2.4. În cazul enzimei pure, fracțiunea cea mai activă a fost cea corespunzătoare subtilizinei (fracțiunea 23), aceasta fiind și cea mai bogată în proteine (Tabelul 2.1). Profilul cromatografic al enzimei rezultat la separarea prin cromatografia de excluziune, precum și activitatea fracțiunilor studiate sunt reprezentate în Figura 2.4a. Masa moleculară corespunzătoare picului cel mai activ este de 29 kDa. Cea de-a doua componentă importantă prezentă în structura subtilizinei, corespunzătoare unei mase moleculare de 13,3 kDa s-a dovedit mai puțin activă în reacția studiată. Astfel, se poate concluziona că subtilizina nu este o enzimă pură din punct de vedere cromatografic, ci este îmbogățită în componentă activă.

Tabelul 2.1. Activitatea fracțiunilor separate prin cromatografia de excluziune în cazul subtilizinei pure

Nr. fracțiune	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Activitate ($\mu\text{mol/s}\cdot\text{ml}$)	0,150	0,185	0,199	0,219	0,167	0,061	0,084	0,048	0,025	0
Conținut de proteine (mg/ml)	0,019	0,047	0,048	0,049	0,036	0,010	0,010	0,010	0,010	0,001

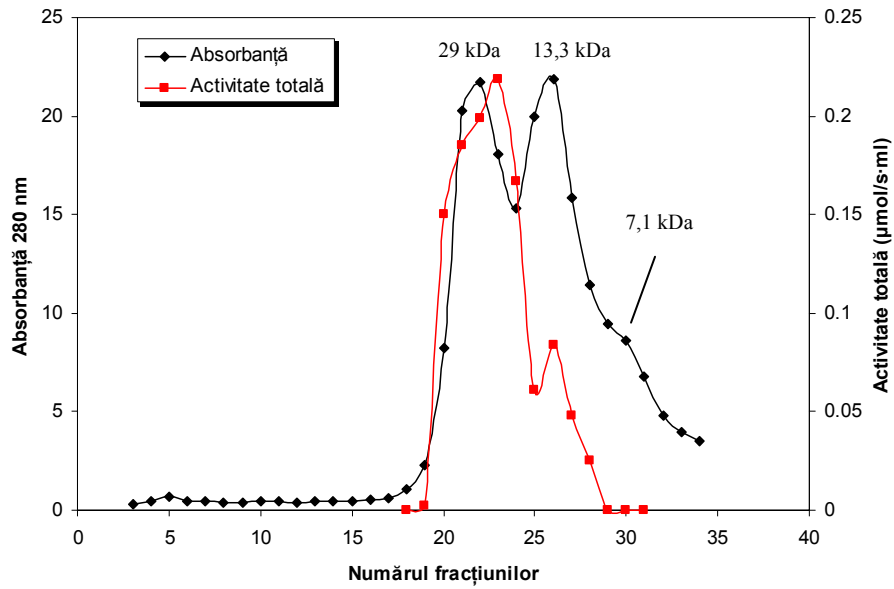
Tabelul 2.2. Activitatea fracțiunilor separate prin cromatografia de excluziune în cazul alcalazei 2,4L FG

Nr. fracțiune	23	24	25	28	29	30	31	34	35
Activitate ($\mu\text{mol/s}\cdot\text{ml}$)	0,006	0,090	0,177	0,185	0,181	0,183	0,131	0,044	0,056
Conținut de proteine (mg/ml)	0	0,016	0,043	0,055	0,033	0,025	0,015	0	0,016

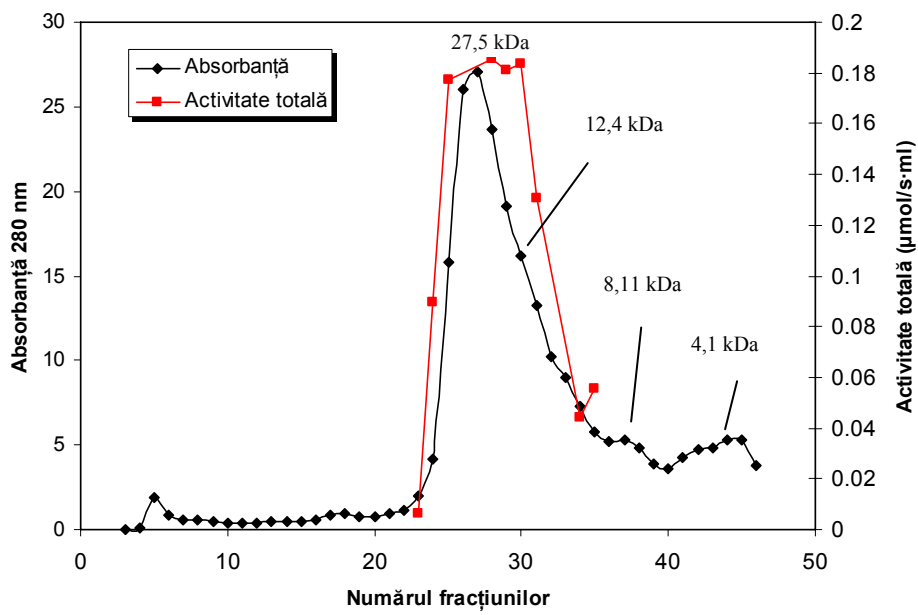
Tabelul 2.3. Activitatea fracțiunilor separate prin cromatografia de excluziune în cazul alcalazei 2,5L DX

Nr. fracțiune	23	24	25	27	28	29	30	31	35
Activitate ($\mu\text{mol/s}\cdot\text{ml}$)	0,024	0,055	0,157	0,291	0,189	0,267	0,196	0,140	0,037
Conținut de proteine (mg/ml)	0	0,016	0,023	0,061	0,054	0,043	0,039	0,025	0,034

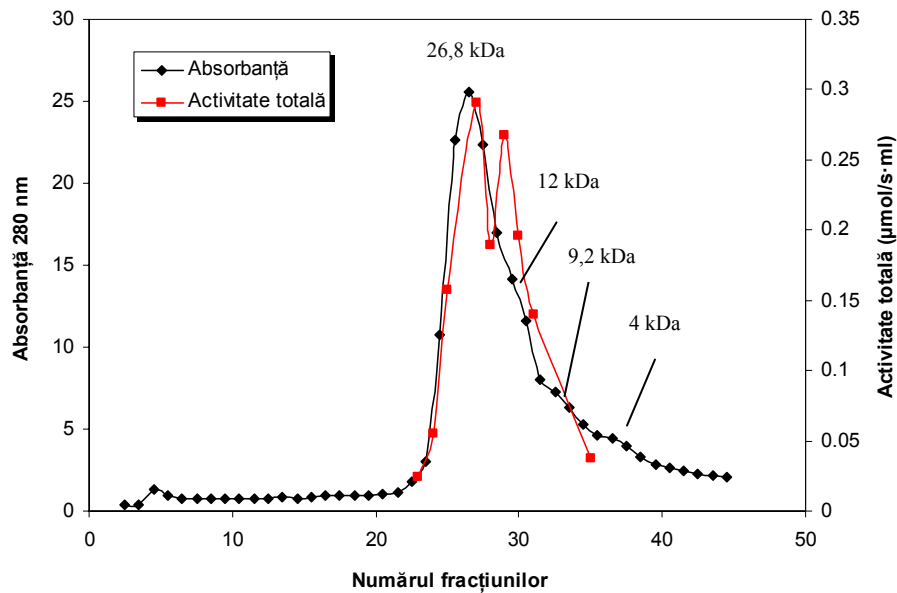
În cazul preparatelor enzimice comerciale (alcalază 2,4L FG și alcalază 2,5L DX), activitatea catalitică maximă a fost obținută pentru fracțiunea 28, respectiv 27 acestea având și cel mai ridicat conținut de proteine (Tabelul 2.2 și Tabelul 2.3). Profilul cromatografic al celor două enzime este comparabil, masa moleculară corespunzătoare picului cel mai activ fiind de 27,5 kDa, în cazul alcalazei 2,4L FG, respectiv 26,8 kDa în cazul alcalazei 2,5L DX. Proteina cu masa de aproximativ 12 kDa, prezentă în ambele preparate enzimatic s-a dovedit mai puțin activă. Celelalte proteine, cu MW mai mică de 10 kDa s-au dovedit inactive (Figura 2.3b și 2.3c).



(a)



(b)



(c)

Figura 2.4. Cromatogramele proteinelor conținute în preparatele enzimice studiate; activitatea fracțiunilor proteice separate; (a) subtilizina A; (b) alcalaza 2,4L FG; (c) alcalaza 2,5L DX

2.1.3. Concluzii parțiale

S-a analizat puritatea proteazelor comerciale studiate prin tehnica electroforezei pe gel de poliacrilamidă și a cromatografiei de excluziune sterică.

Electroforeza efectuată în condiții denaturante pe gel de poliacrilamidă relevă prezența unui număr mare de fracțiuni proteice în ambele preparate comerciale de alcalază, principala enzimă fiind subtilizina (29 kDa). Prin analiza rezultatelor obținute se pot evidenția asemănările și deosebirile dintre diferitele produse comerciale conținând alcalază.

Nu au existat variații în compoziția și proprietățile diferitelor loturi de alcalază.

Profilul enzimatic al celor trei proteaze relevă prezența mai multor fracțiuni proteice cu masă moleculară cuprinsă între 29 și 4 kDa proteina cea mai activă fiind corespunzătoare unei MW de 29 kDa în cazul subtilizinei, 27,5 kDa în cazul alcalazei 2,4L FG, respectiv 26,8 kDa în cazul alcalazei 2,5L DX. Se poate concluziona astfel, că principala enzimă activă din preparatul enzimatic proteolitic este subtilizina.

2.2. Studiul reacțiilor de hidroliză selectivă a peptidelor catalizate de alcalaza imobilizată

2.2.1. Influența mediului de reacție asupra eficienței catalitice a alcalazei imobilizate

Sinteza chimică a peptidelor se poate realiza fie prin metoda liniară, în care aminoacizii sunt asamblați unul câte unul, fie prin metoda convergentă. Cea de-a doua metodă este preferată pentru sinteza peptidelor mai lungi, deoarece randamentele sunt ridicate, iar fragmentele peptidice pot fi obținute în paralel, reducându-se astfel timpul de sinteză. În sinteza chimică, toate fragmentele peptidice, cu excepția celui C-terminal, trebuie să fie selectiv deprotejate la gruparea C-terminală. La scară industrială, este preferată sinteza peptidelor în fază solidă, deoarece combină atât avantajele sintezei în fază solidă, cât și cele ale sintezei în fază lichidă. În cazul sintezei convergente, gruparea C-terminală trebuie să fie stabilă în condițiile asamblării peptidei și în condițiile deprotecției temporare a grupării N-terminale, care se repetă la fiecare ciclu al sintezei. Mai mult, gruparea protectoare N-terminală, cât și cele corespunzătoare catenelor laterale trebuie să fie stabile în condițiile deprotecției grupării esterice la carbonul C-terminal. Datorită stabilității ridicate, ușurinței de introducere și disponibilității comerciale, esterii *tert*-butilici sunt preferați pentru protejarea carboxilului terminal. Cu toate acestea, deprotecția chimică selectivă a acestor esteri în prezența grupărilor protectoare ale catenelor laterale, nu este posibilă. De aceea, este nevoie de o metodă selectivă care să hidrolizeze esterii *tert*-butilici C-terminali ai peptidelor în condiții blânde de reacție. Utilizarea enzimelor în sinteza peptidelor s-a dovedit a fi o alternativă promițătoare datorită selectivității ridicate a acestor biocatalizatori.

În acest context, unul din obiectivele acestor cercetări experimentale a fost studiul reacției de deprotecție (hidroliză) enzimatică a grupării carboxilice terminale a dipeptidei Z-Ala-Phe-OBu^t catalizată de alcalaza-CLEA. Pentru acest studiu [168] s-a urmărit protocolul reacției de hidroliză descris în capitolul 3.4, enzima folosită fiind alcalaza-CLEA 08331 (1 mg/ml). Pe baza analizelor efectuate s-a calculat activitatea enzimatică în primele momente ale reacției. Schema reacției de hidroliză este prezentată în Figura 2.5.

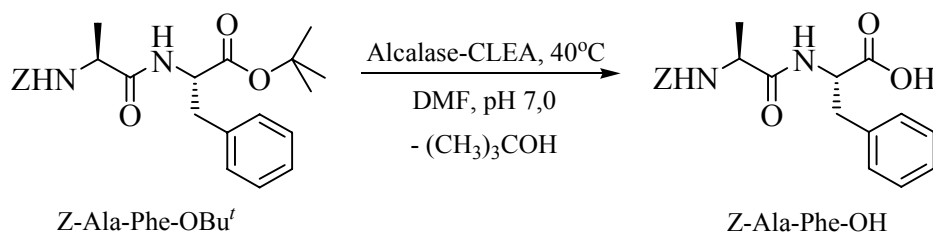


Figura 2.5. Schema reacției de hidroliză enzimatică a dipeptidei Z-Ala-Phe-OBu^t catalizată de alcalaza-CLEA

Deoarece solvenții organici, folosiți ca și cosolvenți miscibili cu apa, inactivează în general enzimele, o serie de experimente au fost realizate la diferite concentrații de DMF (0-80%, vol). Solvenții organici sunt necesari deoarece

îmbunătățesc solubilitatea peptidelor protejate, insolubile în apă. În acest context, pentru a evita fenomenul de inactivare al enzimei, s-a propus să se stabilească concentrația minimă necesară solubilizării substratului la care activitatea proteazei să fie maximă. S-a determinat astfel activitatea alcalazei-CLEA în diferite amestecuri DMF-tampon pH 7,0.

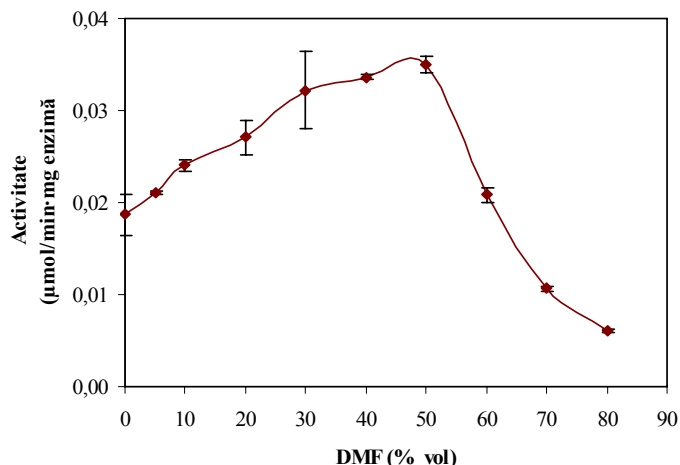


Figura 2.6. Influența concentrației de DMF asupra activității enzimice a alcalazei-CLEA în reacția de hidroliză a Z-Ala-Phe-OBu^t

În Figura 2.6 este reprezentată influența solventului organic asupra activității hidrolitice a catalizatorului studiat, calculată în primele 30 de minute ale reacției. Se observă că în absența DMF, valoarea activității a fost relativ scăzută datorită insolubilității substratului în mediul apos. Creșterea cantității de solvent organic a determinat creșterea vitezei de reacție, valoarea optimă obținându-se la 50% DMF în mediul de reacție. La această concentrație substratul a fost complet solubil. La un conținut mare de solvent organic (între 60 și 80%, vol.), viteza reacției a scăzut semnificativ datorită efectului inactivant al acestuia. Astfel, se poate concluziona că hidroliza peptidului este favorizată la concentrații mai mici de DMF.

2.2.2. Influența mediului de reacție asupra scindării regioselective a peptidelor

Obiectivul cercetărilor prezentate în acest capitol a fost studiul influenței compoziției mediului de reacție (DMF, % vol) asupra eficienței catalitice și a regioselectivității proteazei comerciale alcalaza-CLEA. Degradarea peptidelor mai lungi poate să apară datorită activității endopeptidazice a proteazelor. În acest context, compoziția mediului de reacție a fost optimizată pentru a spori activitatea esterazică față de cea endopeptidazică.

S-a studiat astfel influența mediului de reacție asupra hidrolizei selective a tetrapeptidei Boc-Ala-Asp(OBu^t)-Trp-Phe-OBu^t prin modificarea concentrației de DMF [169]. Pentru acest studiu s-a urmărit protocolul reacției de hidroliză descris la punctul 3.4, enzima folosită fiind alcalaza-CLEA 08331 (5 mg/ml). Pe baza analizelor

cromatografice s-a calculat randamentul de produs format la diferite intervale de timp, precum și randamentul produsului secundar de hidroliză. Schema de reacție este prezentată în Figura 2.7.

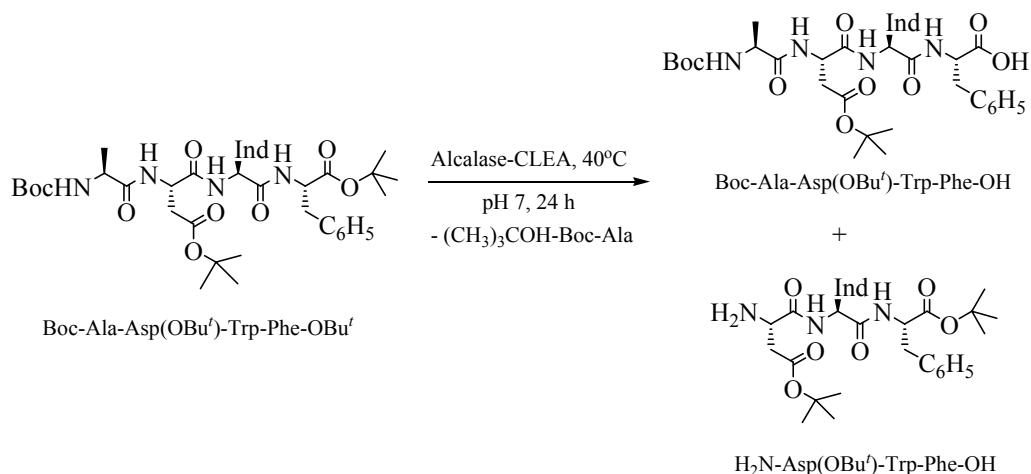


Figura 2.7. Schema reacției de deprotecție regioselectivă a tetrapeptidei Boc-Ala-Asp(OBu^t)-Trp-Phe-OBu^t

Tabelul 2.4. Hidroliza selectivă a Boc-Ala-Asp(OBu^t)-Trp-Phe-OBu^t catalizată de alcalaza-CLEA

Timp de reacție (ore)	DMF (% vol)	Impuritate endopeptidazică (% arie)	Produs de hidroliză (% arie)	Substrat nereacționat (% arie)
2	20	0,2	2,2	97,6
4		0,5	4,8	94,8
6		1,1	8,0	90,9
8		2,0	11,6	86,4
24		11,7	27,9	60,4
2	50	0,07	2,7	97,2
4		0,1	6,4	93,5
6		0,12	10,2	89,7
8		0,15	15,1	84,8
24		0,5	40,8	58,7
2	60	0,05	1,6	98,3
4		0,06	3,0	96,9
6		0,06	4,8	95,2
8		0,07	6,1	93,8
24		0,09	14,5	85,4

Tabelul 2.4 prezintă comparativ rezultatele obținute în urma reacției de hidroliză a Boc-Ala-Asp(OBu^t)-Trp-Phe-OBu^t la diferite concentrații de DMF (20, 50,

60%, vol). Conversia maximă s-a obținut la un conținut de 50% DMF în mediul de reacție, aceasta fiind de altfel și concentrația optimă la care activitatea endopeptidazică a proteazei a fost minimă. Solventul organic, în cazul nostru DMF, a fost adăugat în mediul de reacție pentru crește solubilitatea substratului și pentru a reduce hidroliza produsului format. Pe baza datelor din Tabelul 2.4 s-a realizat Figura 2.8 care prezintă randamentul în produs după 24 de ore de reacție.

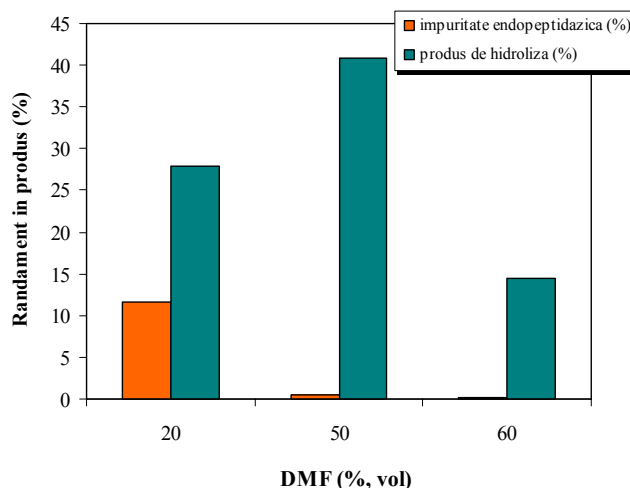


Figura 2.8. Influența concentrației de DMF asupra hidrolizei enzimatic selectivă a Boc-Ala-Asp(OtBu)-Trp-Phe-OBu^t după 24 de ore de reacție

Așa cum era de așteptat, cantitatea de produs secundar de hidroliză rezultat prin scindarea intracatenară a peptidei, a crescut o dată cu scăderea concentrației de DMF în mediul de reacție. La un conținut mai mare de 50%, activitatea enzimei a scăzut datorită inactivării acesteia de către solventul organic. Din Figura 2.8 se observă că excesul de apă nu determină creșterea activității, ci doar hidroliza produsului format deoarece acesta acționează doar ca agent nucleofil în reacție. În general, atunci când concentrația apei din mediul de reacție depășește valoarea optimă, flexibilitatea moleculelor de enzimă crește, determinând o scădere a activității catalitice datorită modificărilor conformaționale [170].

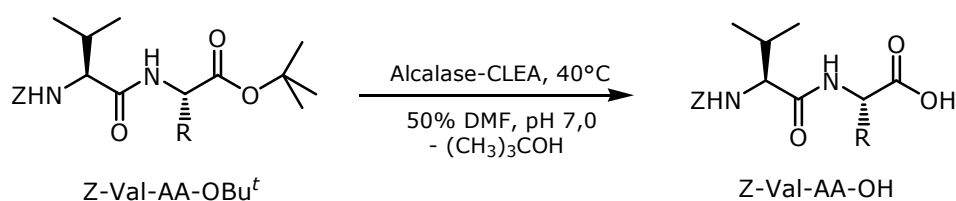
2.2.3. Studiul cinetic al hidrolizei enzimatică a esterilor *terț*-butilici ai peptidelor

Complexitatea structurii biocatalizatorilor precum și complexitatea mecanismului intim de reacție au făcut ca studiul cineticii reacțiilor enzimatic să fie mult mai dificil comparativ cu cinetica reacțiilor chimice în general. Studiul cineticii enzimatic, ca și în cinetica chimică, se bazează pe măsurarea vitezei de reacție în condiții standard (care se asigură în așa fel încât să fie cât mai apropiate posibil de condițiile existente *in vivo*) și în diferite condiții particulare create într-un anumit scop.

Deoarece natura aminoacidului rezidual, precum și lungimea catenei polipeptidice determină modificarea mecanismul de legare al substratului în centrul activ al enzimei, s-a studiat cinetica reacției de hidroliză enzimatică a diferiților

esteri *tert*-butilici ai peptidelor. Pentru acest studiu s-au folosit două loturi de enzimă: alcalaza-CLEA 05789 (31 NPA U/g) și alcalaza-CLEA 08331. Protocolul urmărit a fost cel al reacției de hidroliză descris în capitolul 3.4. Studiul cinetic a fost realizat pentru 14 substraturi diferite (di-, tri-, tetra- și hexapeptide) la 50% DMF (% vol.) [171].

Deprotecția enzimatică selectivă a dipeptidei model Z-Val-AA-OBu^t este prezentată în Figura 2.9. Parametrii cinetici ai reacției de hidroliză enzimatică au fost calculați cu ajutorul programului Sigma Plot, iar substraturile studiate au fost caracterizate prin compararea constantelor cinetice k_{cat} și K_M corespunzătoare enzimei, calculate pe baza analizei de regresie a vitezelor inițiale de reacție. Rezultatele sunt prezentate în tabelele 2.5 și 2.6.



R = catena laterală a aminoacidului rezidual
 AA = Ala, Asn, Gln, Leu, Lys(Boc), Met, Phe, Ser, Tyr

Figura 2.9. Hidroliza selectivă a dipeptidei model Z-Val-AA-OBu^t

S-a studiat influența naturii aminoacidului rezidual din componența dipeptidelor, cu structura generală Z-Val-AA-OBu^t, asupra activității enzimatice a preparatului comercial alcalază-CLEA. Interacțiunile dintre centrul activ al enzimei și aminoacidul terminal din structura substratului au determinat variații semnificative în vitezele inițiale de reacție pentru diferitele dipeptide. Se poate observa că prezența aminoacizilor hidrofobi alifatici (de exemplu, Met, Leu și Ala) a determinat creșterea eficienței catalitice a enzimei pentru substratul respectiv. Eficiența catalitică a unei reacții catalizate enzimatic este determinată de raportul k_{cat}/K_M . Acesta definește de asemenea specificitatea enzimei pentru un anumit substrat.

Tabelul 2.5. Parametrii cinetici ai proteazei alcalază-CLEA 05789 (5 mg/ml) în cazul dipeptidelor model

Substrat	K_M (mM)	k_{cat} ($\mu\text{moli}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg enzimă}^{-1}$)	k_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$)
Z-Ala-Phe-OBu ^t	7,2	0,06	$3,2\cdot 10^{-3}$
Z-Val-Met-OBu ^t	4,6	0,08	$6,3\cdot 10^{-3}$
Z-Val-Leu-OBu ^t	13,8	0,2	$4,8\cdot 10^{-3}$
Z-Val-Asn-OBu ^t	15,8	0,1	$2,3\cdot 10^{-3}$
Z-Val-Gln-OBu ^t	42,6	0,4	$3,7\cdot 10^{-3}$
Z-Val-Ala-OBu ^t	31,6	0,3	$3,1\cdot 10^{-3}$
Z-Val-Lys(Boc)-OBu ^t	11,5	0,04	$1,6\cdot 10^{-3}$
Z-Val-Ser-OBu ^t	62	0,4	$2\cdot 10^{-3}$
Z-Val-Phe-OBu ^t	12,0	0,05	$1,8\cdot 10^{-3}$
Z-Val-Tyr-OBu ^t	87,4	0,2	$1\cdot 10^{-3}$

Valoarea minimă a constantei Michaelis-Menten s-a obținut în cazul aminoacidului metionină ($K_M = 4,6$ mM), acesta fiind de altfel și substratul pentru care eficiența catalitică a enzimei a fost maximă ($k_{cat}/K_M = 6,3 \times 10^{-3} \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$). Prezența aminoacizilor cu grupări hidrofobe aromatice, cum ar fi Phe și Tyr, precum și aminoacizii voluminoși (Lys (Boc)) a determinat scăderea eficienței catalitice a proteazei (Figura 2.11). Curba de cinetică Michaelis-Menten pentru peptida Z-Val-Met-OBu^t este reprezentată în Figura 2.10. Nu se remarcă inhibiția de substrat a enzimei, chiar și la o concentrație de 100 mM a acestuia.

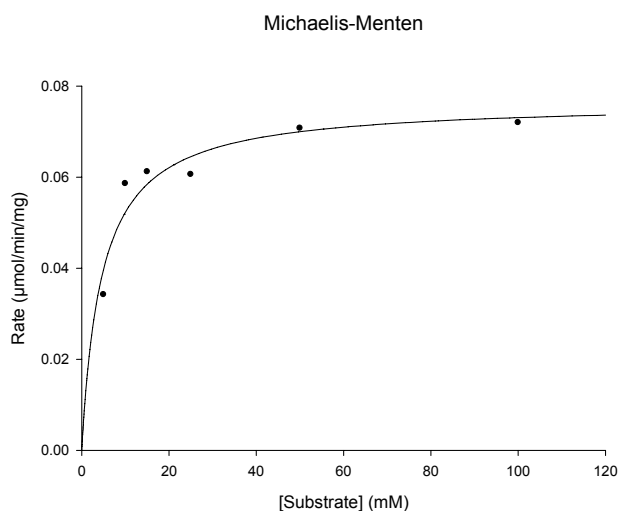


Figura 2.10. Curba de cinetică Michaelis-Menten în cazul substratului Z-Val-Met-OBu^t

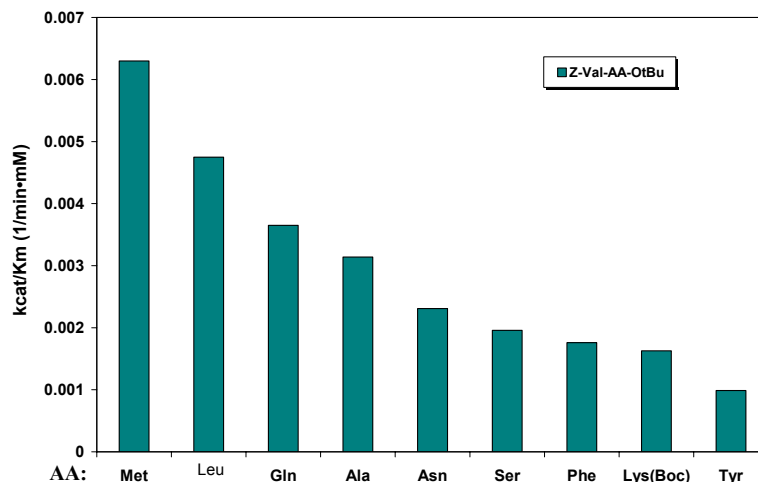


Figura 2.11. Influența aminoacidului rezidual din structura dipeptidelor asupra eficienței catalitice a proteazei alcalază-CLEA

S-a demonstrat că așa-numitul „turnover number” (k_{cat}), exprimând numărul de reacții catalizate pe unitatea de timp de către fiecare centru catalitic al enzimei, depinde de structura aminoacidului terminal din structura peptidelor, scăzând în ordinea:

Gln>Ser>Ala>Tyr>Leu>Asn>Met>Phe>Lys(Boc)

În cazul dipeptidelor mai lungi, eficiența catalitică a scăzut o dată cu creșterea lungimii catenei polipeptidice și a numărului de grupări protectoare din catenele laterale ale resturilor de aminoacizi (Tabelul 2.6).

Tabelul 2.6. Parametrii cinetici ai proteazei alcalază-CLEA 08331 în cazul unor peptide mai lungi

Substrat	Cantitatea de enzimă (mg/ml)	K _M (mM)	k _{cat} (μmoli·min·mg enzimă ⁻¹)	k _{cat} /K _M (min ⁻¹ ·mM ⁻¹)
Z-Ala-Phe-Ala-OBu ^t	5	16,1	0,08	2,3·10 ⁻³
Boc-Ala-Asp(OBu ^t)-Trp-Phe-OBu ^t	10	2,4	7·10 ⁻⁴	0,2·10 ⁻³
Boc-Gly-Phe-Phe-Leu-OBu ^t	5	5,9	0,02	2,4·10 ⁻³
Boc-Gly-Phe-Met-Pro-Phe-Trp-OBu ^t	10	12,1	0,004	0,3·10 ⁻³

2.2.4. Hidroliza enzimatică a Z-Ala-Phe-OBu^t catalizată de alcalaza imobilizată prin metoda sol-gel. Influența naturii silanilor precursori asupra eficienței biocatalizatorilor

Aplicațiile industriale ale noilor tehnologii enzimatiche de deprotejare a grupării esterice C-terminale a peptidelor necesită un catalizator eficient care să fie stabil în condițiile de proces. Majoritatea proteazelor prezintă eficiență ridicată în mediu apos, însă insolubilitatea lor în solvenții organici poate determina formarea unor agregate și astfel scăderea activității catalitice. În acest context, s-a realizat imobilizarea alcalazei prin entrapare în matrici de sol-gel (conform metodei descrise la punctul 3.1.1), biocatalizatorii obținuți fiind testați în reacția de hidroliză a Z-Ala-Phe-OBu^t. Pentru imobilizare s-au folosit următorii silani precursori: tetrametoxisilan (TMOS) și derivați trimetoxisilanici (PrTMOS, OcTMOS, PhTMOS, APTMOS, i-BuTMOS, VTMOs) sau dimetoxisilanici (DMDMOS, PMDMOS) în raport molar de 1:1. Raportul masic al conținutului de proteine folosit la imobilizare a fost de 9,7 mg proteină/mmol silani. Preparatele obținute, precum și enzima nativă au fost utilizate ca biocatalizatori în reacția de hidroliză a esterului peptidei Z-Ala-Phe-OBu^t descrisă la punctul 3.4 (Figura 2.12).

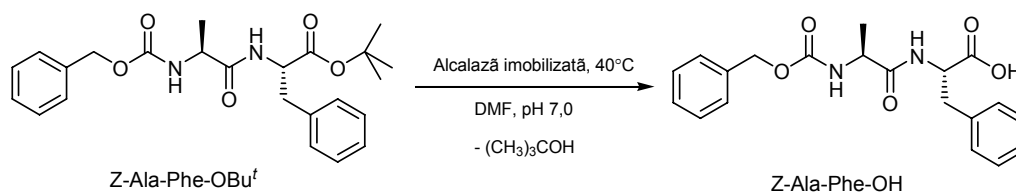


Figura 2.12. Schema de sinteză a Z-Ala-Phe-OH catalizată de alcalaza imobilizată prin tehnica de sol-gel

Reacțiile au fost realizate în 50% DMF, cantitatea de enzimă fiind 2 mg/ml. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.7 [172].

Tabelul 2.7. Hidroliza Z-Ala-Phe-OBu^t prin biocataliză cu preparate obținute prin entraparea în sol-gel a alcalazei 2,4L FG

Silani precursori (1:1, raport molar)	Timp de reacție (ore)	Randament de hidroliză (%)	Activitate specifică ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ proteină}^{-1}$)	Activitate hidrolitică ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{ gel}^{-1}$)	Activitate relativă (%)**
-	2	49,7	27,4	1096*	-
	4	58,1			
	22	73,3			
PrTMOS:TMOS	2	36,9	7,49	987	27,3
	4	43,2			
	22	55,6			
OcTMOS:TMOS	2	39,2	9,29	1133	33,9
	4	44,9			
	22	62,1			
PhTMOS:TMOS	2	38,3	9,56	1072	34,9
	4	44,7			
	22	58,3			
VTMOS:TMOS	2	38,3	9,91	1090	36,2
	4	44,2			
	22	61,7			
i-BuTMOS:TMOS	2	38,2	6,78	1098	24,7
	4	43,7			
	22	59,9			
APrTMOS:TMOS	2	9,8	3,49	287	12,7
	4	18,8			
	22	54,6			
MPDMOS:TMOS	2	39,2	8,53	1024	31,1
	4	45,1			
	22	56,9			
DMDMOS:TMOS	2	41,3	8,11	1147	29,6
	4	47,4			
	22	56,8			

*Activitatea hidrolitică a fost exprimată ca μmoli de produs format într-o oră de către 1 ml de soluție enzimatică

**Activitatea relativă a preparatului enzimatic a fost calculată ca raportul dintre activitatea specifică a enzimei imobilizate și activitatea specifică a enzimei native

Natura silanilor precursori nu a avut o influență semnificativă asupra activității enzimatică și a randamentului de hidroliză, cu excepția preparatului obținut cu silanii precursori APTMOS și TMOS, pentru care viteza inițială de reacție a fost scăzută. Prin urmare, rezultatele obținute cu APrTMOS și TMOS reflectă eficiența redusă a alcalazei imobilizată în această matrice și utilizată în reacția de hidroliză a Z-Ala-Phe-OBu^t. Dintre precursorii silanici testați, viteza maximă de reacție ($9,91 \mu\text{mol/h/mg}$ proteină) a fost înregistrată în cazul preparatului enzimatic obținut cu VTMS și TMOS, după 2 ore de incubare la 40°C . Acest preparat a reținut 36,2% din activitatea specifică enzimei native, după imobilizare. Deși activitatea alcalazei

imobilizate s-a diminuat în urma imobilizării, reutilizarea biocatalizatorului poate să compenseze această dejavantaj. Fenomenul de reducere a activității se datorează probabil formării unei rețele mico- sau nanoporoase foarte compacte care îngreunează mult accesul reactanților la centrul activ al enzimei. Valorile activității sunt aparente, determinate de o combinație de factori, cum ar fi accesibilitatea proteinei, fracțiunea proteinei active, transferul masic al substratului în matricea sol-gel, difuziunea substratului și produsului în matrice. Astfel, scăderea activității poate fi explicată prin îngreunarea vitezei de difuziune a materialelor în interiorul, cât și spre exteriorul rețelei de silice, rezultând astfel diferențe în valorile activității, care nu reflectă în mod direct comportamentul proteinei.

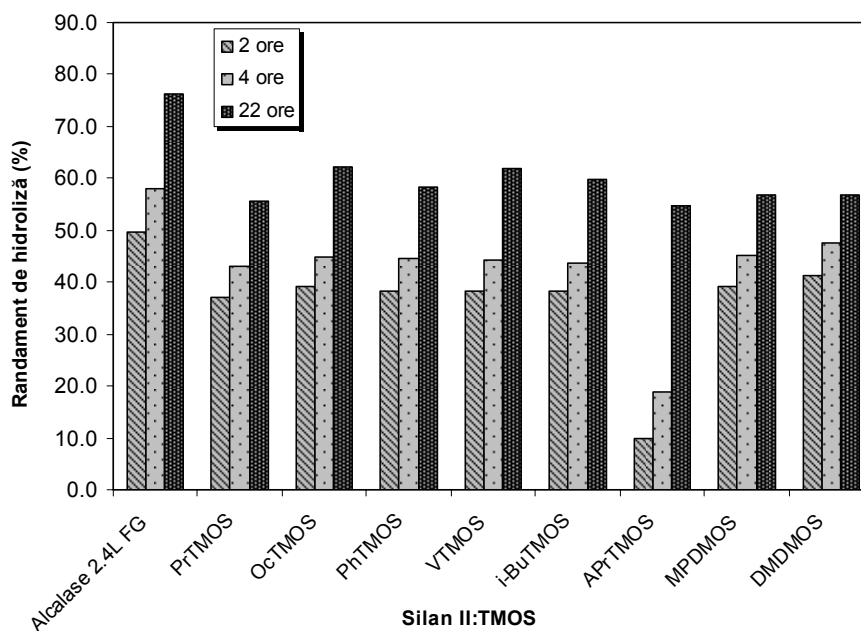


Figura 2.13. Influența naturii silanului precursor asupra eficienței catalitice în reacția de hidroliză selectivă a Z-Ala-Phe-OBu^f

Randamentul de hidroliză după 22 de ore de reacție a atins o valoare maximă (aprox. 62%) pentru preparatele obținute cu OcTMOS, respectiv VTMOs, reprezentând 85% din valoarea randamentului corespunzător enzimei native. Prin urmare, s-a presupus că o concentrație mare de produs în apropierea centrului activ al proteazei a determinat inhibiția enzimei, în cazul preparatului obținut cu DMDMOS și TMOS (raport molar, 1:1).

Deși viteza inițială de reacție a preparatului obținut cu APtMOS a fost minimă, randamentul de hidroliză după 22 de ore de incubare la 40°C a atins o valoare comparabilă cu celelalte preparate enzimatic imobilizate (aprox. 55%) (Figura 2.13). Acest lucru confirmă fenomenul de difuziune îngreunată a reactanților în matricea de sol-gel.

2.2.5. Concluzii parțiale

Hidroliza enzimatică reprezintă o metodă selectivă de deprotecție a esterilor *tert*-butilici C-terminali ai peptidelor în condiții blânde de reacție. Utilizarea preparatului comercial alcalaza-CLEA la hidroliza esterilor *tert*-butilici la carbonul C-terminal al peptidelor s-a dovedit a fi o alternativă promițătoare datorită selectivității ridicate a acestui biocatalizator.

După cum era de așteptat, creșterea concentrației de DMF (peste 50%) a avut un efect negativ asupra eficienței catalitice determinând o scădere a acesteia datorită efectului inactivant al solventului organic.

Folosirea unei concentrații de 50% DMF în mediul de reacție a fost benefică pentru deprotecția regioselectivă a peptidelor mai lungi. La această concentrație, activitatea esterazică a alcalazei-CLEA a fost maximă, iar cea endopeptidazică a fost minimă.

În cazul dipeptidelor cu formula generală Z-Val-AA-OBu^t, prezența aminoacizilor cu grupări hidrofobe la poziția C-terminală, de exemplu Phe și Tyr, a determinat scăderea activității catalitice a proteazei.

În cazul dipeptidelor mai lungi, eficiența catalitică a scăzut o dată cu creșterea lungimii catenei polipeptidice și a numărului de grupări protectoare din catenele laterale ale resturilor de aminoacizi.

Natura silanilor precursori folosiți la imobilizarea alcalazei prin metoda sol-gel nu a avut o influență semnificativă asupra randamentului și activității de hidroliză a Z-Ala-Phe-OBu^t. Fenomenul de diminuare a activității alcalazei după imobilizare se poate explica prin limitarea difuziunii materialelor în interiorul, cât și spre exteriorul rețelei de silice.

2.3. Studiul reacției de amidare a esterilor C-terminali ai peptidelor catalizată de alcalaza nativă sau imobilizată prin tehnica de sol-gel

În acest studiu s-a propus obținerea de noi biocatalizatori prin imobilizarea alcalazei în matrici de sol-gel care să prezinte aplicabilitate în tehnologia de obținere a peptidelor cu activitate biologică. Majoritatea acestor peptide, precum și peste jumătate din totalul hormonilor existenți, prezintă o grupare amidică la carbonul C-terminal. Studiile anterioare au demonstrat că alcalaza-CLEA este un catalizator excelent în reacția de amidare a peptidelor [10]. Una din problemele care au fost întâlnite a fost variația largă a eficienței catalitice a diferitelor loturi de alcalază imobilizată. În acest context, aplicațiile industriale ale noilor tehnologii enzimatică de amidare a grupării C-terminale a peptidelor necesită un catalizator eficient care să fie stabil în condițiile de proces și care să demonstreze proprietăți constante în ceea ce privește activitatea, stabilitatea de proces, precum și compatibilitatea cu solvenții hidrofilii, indiferent de lotul din care provine.

S-a realizat astfel imobilizarea alcalazei, preparat enzimatic comercial având ca protează principală subtilizina din *Bacillus licheniformis*, prin entrapare în sol-gel și entrapare combinată cu adsorbție pe un suport solid. Preparatele enzimatică au fost utilizate ca biocatalizatori în reacția de amidare a dipeptidei Z-Ala-Phe-OMe folosind carbamatul de amoniu ca agent nucleofil (Figura 2.14).

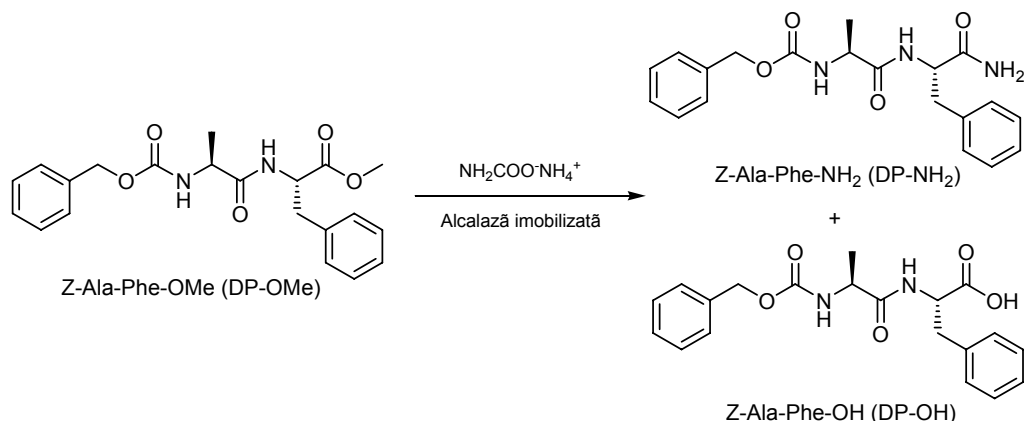


Figura 2.14. Schema de sinteză a Z-Ala-Phe-NH₂ catalizată de alcalaza imobilizată prin tehnica de entrapare în sol-gel

2.3.1. Selectarea proteazelor

Obiectivul acestui studiu a fost selectarea celui mai eficient biocatalizator pentru amidarea și/sau hidroliza grupării C-terminale a esterilor peptidelor. Au fost astfel testate două tipuri de alcalază în reacția de amidarea a Z-Ala-Phe-OMe în mediu de Bu^tOH /DMF la 30°C (capitolul 3.3 din partea experimentală). Pentru comparație, cele două enzime au fost testate și în reacția de hidroliză a Z-Ala-Phe-OBu^t și Boc-Gly-Phe-Phe-Leu-OBu^t în 50% DMF, pH 7,0 la 40°C [167]. Această reacție s-a realizat conform protocolului descris la punctul 3.5, cantitatea de enzimă utilizată fiind de 0,2 mg proteină/ml. Pe baza analizelor efectuate, s-a calculat activitatea enzimatică în primele momente ale reacției (20 de minute), rezultatele obținute fiind prezentate în Tabelul 2.8.

Tabelul 2.8. Activitatea specifică a celor două tipuri de alcalază în reacția de hidroliză și amidare a esterilor peptidelor

Substrat	Reacție	Enzimă	Activitate specifică (μmoli/min·mg proteină)
Z-AlaPhe-OBu ^t	hidroliză	alcalaza 2,4L FG	5,1
		alcalaza 2,5L DX	5,0
Boc-GlyPhePheLeu-OBu ^t	hidroliză	alcalaza 2,4L FG	1,2
		alcalaza 2,5L DX	1,2
Z-Ala-Phe-OMe	amidare	alcalaza 2,4L FG	13,0
		alcalaza 2,5L DX	11,1

Alcalaza 2,4L FG s-a dovedit a fi cea mai eficientă în reacția de amidare a substratului Z-Ala-Phe-OMe (activitatea specifică: $13 \mu\text{moli min}^{-1} \text{mg proteină}^{-1}$).

Specificitatea de substrat a enzimelor a fost studiată în reacția de hidroliză a două substraturi de lungimi diferite (Z-Ala-Phe-OBu^t și Boc-Gly-Phe-Phe-Leu-OBu^t). În Figura 2.15 se observă că activitatea enzimatică a celor două proteaze a fost mai mică decât în cazul amidării.

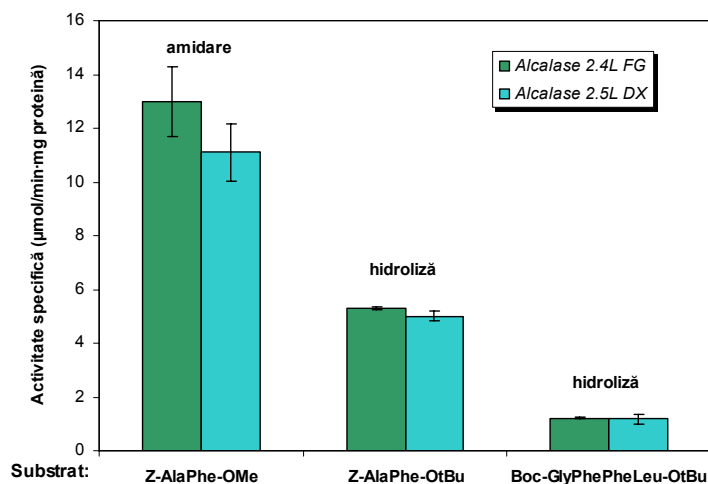


Figura 2.15. Dependența activității specifice de natura catalizatorului și de substratul utilizat în reacțiile de hidroliză și amidare studiate

Deoarece alcalaza 2,4L FG s-a dovedit a fi mai eficientă în cazul amidării peptidelor, comparativ cu alcalaza 2.5L DX, s-a optat pentru utilizarea acestei proteaze în studiile ulterioare.

2.3.2. Reproducibilitatea diferitelor loturi de alcalază

Deoarece calitatea enzimelor provenite din loturi diferite poate să varieze, fiecare lot nou trebuie să fie supus analizei înainte de utilizarea obișnuită. În acest subcapitol s-a studiat variația în compoziție și proprietăți a două loturi de alcalază 2,4L FG, precum și reproducibilitatea metodei de imobilizare în sol-gel a acestora.

Reproducibilitatea proprietăților catalitice a proteazelor a fost studiată în reacția de amidare a substratului model, Z-Ala-Phe-OMe [167]. Conținutul total de proteine din compoziția enzimelor a fost determinat prin metoda Bradford descrisă în partea experimentală a lucrării. Se observă o ușoară variație în compoziția proteinelor având o deviație standard de 6,93% (Tabelul 2.9). Activitatea biocatalitică, calculată în primele minute ale reacției, a prezentat o deviație standard de 2,65%.

Tabelul 2.9. Reproducibilitatea diferitelor loturi de alcalază

Lot alcalază	Concentrație de proteine (mg/ml) ± SD%	Activitate specifică (μmol/min·mg proteină) ± SD%
^a PLN05354	50 ± 6,93	14,8 ± 2,65
^b PLN05354		
PLN05361		

^{a, b} Loturi identice provenite din experimente diferite
SD – deviația standard

Loturile de alcalază au fost imobilizate în duplicat și apoi testate în reacția de amidare în vederea determinării reproductibilității după imobilizare. S-a realizat astfel entraparea enzimelor în rețele polimerice de sol-gel, folosind ca precursori silanici dimetildimetoxisilan (DMDMOS) și tetrametoxisilan (TMOS) în raport molar de 1:1, conform metodei 3.1.1 Pentru imobilizare s-au folosit 45 mg proteină (780 μl soluție alcalază). Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.10.

Tabelul 2.10. Reproducibilitatea diferitelor loturi de alcalază imobilizată în matrici de sol-gel

Lot alcalază	Randament de imobilizare ± SD %	Conversie după 24 de ore			Activitatea totală (μmol/h·mg gel)
		DP-NH ₂ ± SD%	DP-OH ± SD%	DP-OMe ± SD%	
^a PLN05354	71,7 ± 1,53	95,4 ± 0,11	4,6 ± 0,11	0,0 ± 0,0	3,81 ± 0,15
^b PLN05354					
PLN05361					

^{a, b} Aceleași loturi provenite din experimente diferite
SD – deviația standard

Preparatele enzimatiche prezintă reproductibilitate excelentă după imobilizare în ceea ce privește activitatea inițială, cât și randamentul în produs după 24 de ore de incubare la 30°C (Tabelul 2.10). Valorile randamentului de imobilizare au fost cuprinse între 70 și 73% cu o deviație standard de 1,53%. Folosind acești catalizatori în reacția de amidare, s-a obținut conversia totală a substratului după 24 de ore, amestecul de reacție conținând 95% produs de amidare. Reproducibilitatea, în ceea ce privește randamentul în produs final, cât și activitatea calculată în primele momente ale reacției, a fost excelentă prezentând o deviație standard de 0,11%, respectiv 0,15%.

2.3.3. Imobilizarea alcalazei în matrici de sol-gel derivate de TMOS sau TEOS

În acest studiu s-a urmărit influența grupării metoxi- sau etoxi- din structura silanului precursor (tetraalcoxisilan) asupra eficienței catalitice a alcalazei imobilizate prin tehnica sol-gel. S-a realizat astfel imobilizarea alcalazei prin

entrapare folosind TMOS sau TEOS conform metodei descrise la punctul 3.1.1. Preparatele enzimatiche au fost testate în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe folosind carbamatul de amoniu ca agent nucleofil. Rezultatele studiului sunt prezentate în tabelele 2.11 și 2.12.

Tabelul 2.11. Influența silanului precursor asupra randamentului de imobilizare

Silan precursor	Randament de imobilizare (%)	Capacitate de entrapare (%)	Cantitate preparat (mg)
TMOS	95	6,6	630
TEOS	66	9,0	321

Tabel 2.12. Reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe catalizată de alcalaza imobilizată prin entrapare în matrici derivate de TMOS și TEOS

Silan precursor	Timp de reacție (ore)	DP-NH ₂ (% arie)	DP-OH (% arie)	DP-OMe (% arie)	Activitate ($\mu\text{moli}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg gel}^{-1}$)
TMOS	0,5	9,2	1,84	89,0	0,72
	2	8,3	0,75	91,0	
	24	36,8	7,69	55,6	
TEOS	0,5	3,7	0,62	95,7	0,33
	2	5,1	0,73	94,2	
	24	32,8	12,31	54,9	

Dificultatea formării gelului în cazul precursorului tetraetoxisilanic a determinat obținerea unui randament de imobilizare de 66%. Viteza de reacție a fost de 2,2 ori mai mare în cazul precursorului TMOS comparativ cu TEOS. Conversia substratului după 24 de ore de incubare a fost de aproximativ 55% în cazul ambelor preparate enzimatiche, cu deosebirea că, în cazul TEOS cantitatea de produs secundar de hidroliză a fost mult mai mare (Figura 2.17).

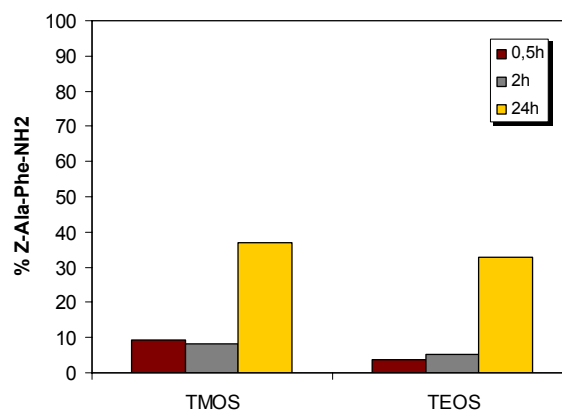


Figura 2.17. Influența naturii tetraalcoxisilanului asupra eficienței catalitice a alcalazei imobilizate prin entrapare în sol-gel

2.3.4. Influența naturii silanilor precursori asupra eficienței biocatalizatorilor în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe

Natura grupării nehidrolizabile a silanului precursor a avut o influență considerabilă asupra eficienței biocatalizatorilor obținuți cu diferiți monomeri silanici (metoxisilani) în raport molar de 1:1. Pentru acest studiu s-au folosit opt preparate enzimatiche obținute prin imobilizarea alcalazei 2,4L FG prin entrapare în sol-gel conform metodei descrise la punctul 3.1.1, utilizând ca precursori metoxisilani: tetrametoxisilan (TMOS) și derivați trimetoxisilani (PrTMOS, OctTMOS, PhTMOS, APTMOS, i-BuTMOS, VTMOs) sau dimetoxisilani (DMDMOS, PMDMOS) în raport molar de 1:1. Raportul masic al conținutului de proteine folosit la imobilizare a fost de 9,7 mg proteină/mmoli silani (1000 μ l soluție alcalază). Preparatele obținute, precum și enzima nativă au fost utilizate ca biocatalizatori în reacția de amidare a esterului dipeptidic model Z-Ala-Phe-OMe [172]. Rezultatele sunt prezentate în tabelele 2.13 și 2.14.

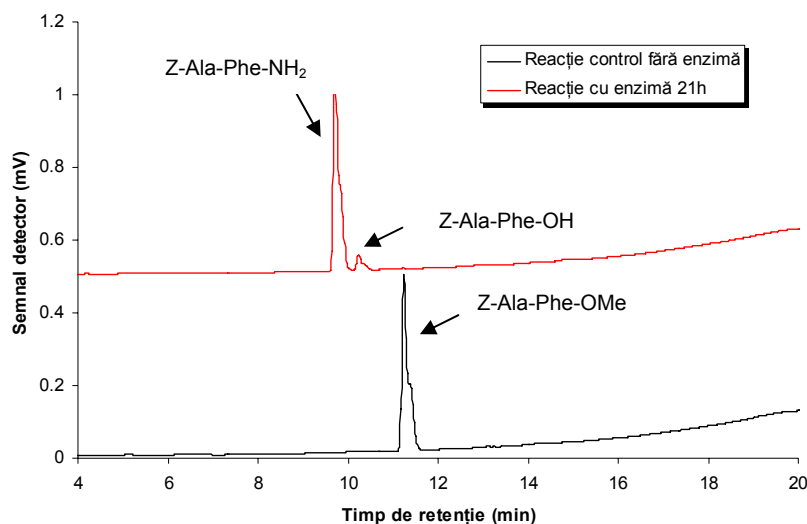


Figura 2.18. Cromatogramele obținute în urma analizei pe coloana Atlantis T3 a amestecului de reacție rezultat la amidarea Z-Ala-Phe-OMe prin biocataliză cu alcalază imobilizată (DMDMOS:TMOS, raport molar 1:1) după 21 de ore reacție (roșu); controlul reacției fără enzimă (negru)

Tabelul 2.13. Reacția de amidare a esterului metilic Z-Ala-Phe-OMe prin biocataliză cu preparate obținute prin entraparea în sol-gel a proteazei alcalază 2,4L FG

Silan I:TMOS (raport molar, 1:1)	Timp de reacție (ore)	Z-Ala-Phe-NH ₂ (% arie)	Z-Ala-Phe-OH (% arie)	Z-Ala-Phe-OMe (% arie)
Alcalaza nativă	2	80,1	10,34	9,5
	4	88,5	10,26	1,3
	21	89,6	10,4	0,0
MeTMOS	2	3,5	0,00	96,5
	4	10,2	0,92	88,9
	21	31,2	3,6	65,2
PrTMOS	2	17,3	0,00	82,7
	4	35,7	2,42	61,9
	21	85,1	9,6	5,3
OcTMOS	2	5,6	0,00	94,4
	4	15,2	1,15	83,7
	21	58,1	7,5	34,4
PhTMOS	2	12,9	1,04	86,0
	4	26,7	1,91	71,4
	21	75,4	9,4	15,2
VTMOS	2	24,9	2,65	72,4
	4	40,6	2,92	56,5
	21	81,2	9,3	9,5
i-BuTMOS	2	27,0	2,52	70,5
	4	45,4	3,05	51,5
	21	83,2	9,0	7,8
APTMS	2	0,0	0,73	99,3
	4	0,0	0,00	100,0
	21	3,3	0,0	96,7
MPDMOS	2	40,2	2,96	56,8
	4	57,3	4,34	38,4
	21	88,4	8,2	3,4
DMDMOS	2	45,5	2,96	51,6
	4	68,1	4,7	27,2
	21	93,1	6,9	0,0

Tabelul 2.14. Influența naturii silanului precursor asupra randamentului de imobilizare și activității catalitice a alcalazei entrapate în sol-gel

Silan I:TMOS (raport molar, 1:1)	Activitate totală ($\mu\text{moli/h}\cdot\text{mg gel}$)	Randament de imobilizare (%)	Încărcare cu proteină (%)
MeTMOS	0,2	81	13
PrTMOS	0,59	83	13
i-BuTMOS	0,95	82	16
OcTMOS	0,23	68	12
PhTMOS	0,45	80	11
VTMOS	0,99	91	10
APrTMOS	0	98	8,3
MPDMOS	1,57	71	13
DMDMOS	1,76	77	14

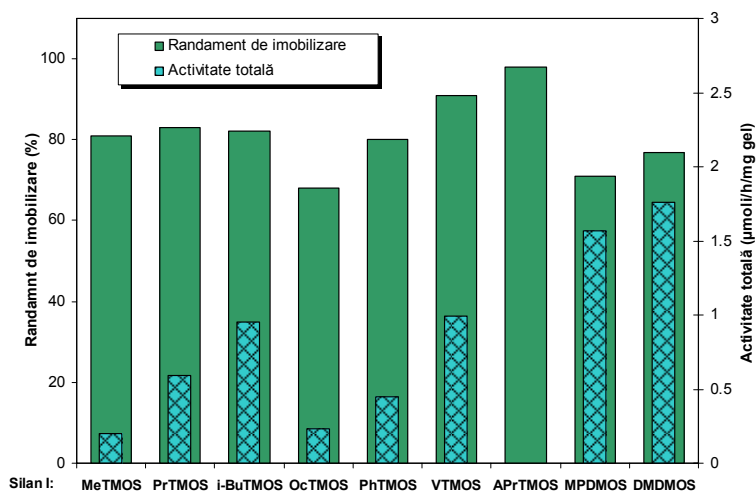


Figura 2.19. Efectul grupării nehidrolizabile din structura silanului precursor asupra activității catalitice a alcalazei entrapate în sol-gel la raport molar SilanI:TMOS de 1:1

În general, în timpul procesului de imobilizare are loc o inactivare parțială a enzimei. În cazul imobilizării prin entrapare în sol-gel, metanolul rezultat în urma procesului de policondensare, poate avea efect inhibitor.

În Figura 2.19 este prezentată o comparație a activităților inițiale de amidare ale alcalazei imobilizate în diferite matrici de precursori silanici la raport molar SilanI:TMOS de 1:1. Randamentul maxim de imobilizare s-a obținut în cazul utilizării APrTMOS ca silan precursor, însă acest preparat enzimatic nu a prezentat activitate în reacția studiată. Aceasta se poate explica printr-o structură compactă, strânsă a matricei de silice, care nu a permis accesul substratului la centrul activ al enzimei. Creșterea lungimii lanțului alchil din molecula silanului (metil<propil<i-butil<octil) a determinat o creștere a activității, valoarea maximă obținându-se în cazul utilizării i-BuTMOS. S-a demonstrat că grupările alchilice, propil sau butil, realizează cele mai

favorabile interacțiuni cu centrul catalitic al lipazelor și proteazelor în solvenți organici [173]. Folosirea precursorilor cu lanțuri alchil mai lungi (OctMOS) poate fi în detrimentul procesului de imobilizare, deoarece enzima poate fi eliberată ușor din matricea de sol-gel, rezultând scăderea randamentelor de imobilizare. Creșterea numărului de grupări metil în structura silanului a avut un efect favorabil asupra activității, așa cum se poate observa în cazul preparatului cu dimetildimetoxisilan (DMDMOS), pentru care activitatea a fost maximă (1,76 $\mu\text{moli/h/mg}$ gel). S-a presupus că interacțiunea dintre rețeaua hidrofobă de sol-gel și resturile hidrofobe ale aminoacizilor din vecinătatea centrului activ poate determina o perturbație a acestuia și în consecință, are loc activarea enzimei. După 21 de ore de reacție, conversia substratului a fost maximă, amestecul de reacție conținând 93,1% produs de amidare și doar 6,9% produs secundar de hidroliză.

Așa cum se observă din Tabelul 2.15, activitatea specifică a celui mai performant biocatalizator (DMDMOS:TMOS) a fost de 10,2 $\mu\text{moli/h/mg}$ proteină, reprezentând 30,2% din activitatea enzimei native. Această scădere a activității poate fi determinată de limitarea transferului de masă a substratului și/sau produsului în matricea de sol-gel.

Tabelul 2.15. Activitatea specifică a alcalazei native și imobilizate (DMDMOS:TMOS, raport molar 1:1) după 2 ore de incubare la 30°C

Enzima	Activitate specifică ($\mu\text{moli/h}\cdot\text{mg}$ proteină)	Z-Ala-Phe-NH ₂ (%)	Randamentul de regăsire a activității (%)
Alcalaza nativă	33,8	80,9	-
Alcalaza imobilizată	10,2	19,8	30,2

Controlul apei în mediul de reacție s-a realizat prin titrare Karl-Fischer. Concentrația de apă determinată în substratul Z-Ala-Phe-OMe, a fost de aproximativ 2%, în timp ce în carbamatul de amoniu a fost de 14% (Tabelul 2.16). Conținutul ridicat, în cazul carbamatului de amoniu, s-a dovedit benefic pentru activitatea preparatelor obținute prin imobilizare în sol-gel. Conținutul de apă prezent în preparatele enzimatică a avut o valoare cuprinsă între 2 și 6,9%.

Tabelul 2.16. Conținutul de apă determinat prin titrare Karl-Fischer al solvenților și reactanților folosiți în reacția de amidare

Probă	Conținut de apă (%)
NH ₂ COONH ₄	14,24
Z-Ala-Phe-Ome	2,1
DMF (uscat pe site moleculare)	0,19
t-BuOH/DMF 6.6/1 (uscat pe site moleculare)	0,11

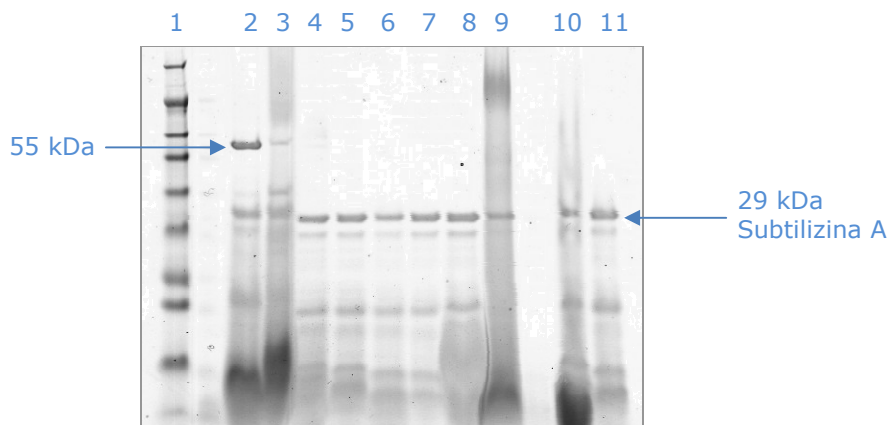


Figura 2.20. Analiza pe gel de electroforeză a apelor de spălare rezultate la imobilizarea alcalazei în matrici de sol-gel. Linia 1, martor conținând proteinele standard; linia 2, alcalaza 2,5L DX; linia 3, alcalaza 2,4L FG (lot nr. PLN05354); linia 4, PrTMOS:TMOS; linia 5, OcTMOS:TMOS; linia 6, PhTMOS:TMOS; linia 7, VTMOs:TMOS; linia 8, i-BuTMOS:TMOS; linia 9, APrTMOS:TMOS; linia 10, MPDMOS:TMOS; linia 11, DMDMOS:TMOS

Determinarea calitativă a proteinelor entrapate în matricea de sol-gel s-a realizat prin electroforeza pe gel de poliacrilamidă a apelor de spălare rezultate după imobilizare. În Figura 2.20 se observă că subtilizina, componenta principală a preparatului enzimatic alcalază, precum și proteinele mici, nu au fost imobilizate în totalitate, fiind preferate cele cu masă moleculară mai mare de 29 kDa. Acesta explică de altfel și scăderea activității după imobilizare. Fenomenul poate fi consecința cantității ridicate de proteină supusă imobilizării sau diametrului porilor care poate duce la pierderea proteinelor mai mici din matricea de sol-gel. În continuare, se va avea în vedere optimizarea metodei de imobilizare pentru îmbunătățirea randamentului de imobilizare al proteinei active (subtilizina).

2.3.5. Studiul reproductibilității metodei de imobilizare în sol-gel

În studiul anterior s-a demonstrat că DMDMOS, PMDMOS, VTMOs și PrTMOS au eficiență catalitică, precum și randamente de imobilizare superioare celorlalți silani în reacția de amidare a substratului model Z-Ala-Phe-OMe. În consecință, aceștia au fost selectați în studiile de reproductibilitate ulterioare. Experimentele de imobilizare au fost repetate de 5 ori în aceleași condiții și testate în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe. Rezultatele acestui studiu sunt prezentate în tabelul 2.17 [172].

Experimentele realizate au demonstrat o reproductibilitate ridicată a metodei de imobilizare prin metoda sol-gel. Conținutul de proteină din preparatul comercial (alcalază 2,4L FG), precum și din apele de spălare rezultate după imobilizare a fost determinat prin metoda Bradford, folosind albumină serică bovină (BSA) ca standard. Cantitatea de proteină imobilizată a fost calculată indirect prin diferența dintre cantitatea de proteină inițială supusă imobilizării și cea regăsită în soluția rezultată după spălarea preparatelor.

Tabelul 2.17. Influența naturii silanului precursor asupra reproductibilității eficienței catalitice în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe

SilanI/ TMOS	Randament de imobilizare \pm SD (%)	Activitatea specifică \pm SD ($\mu\text{mol/h/mg}$ proteină) ^a	Compoziție amestec de reacție ^b		
			DP-NH ₂ \pm SD (%)	DP-OH \pm SD (%)	DP-OMe \pm SD (%)
VTMOS	84 \pm 1,9	2,5 \pm 1,2	21,4 \pm 12,4	6,7 \pm 1,12	71,9 \pm 13,4
MPDMOS	75 \pm 3,9	13,7 \pm 8,9	88,5 \pm 3,2	8,6 \pm 0,98	2,9 \pm 2,7
DMDMOS	80 \pm 2,7	10,5 \pm 1,7	91,5 \pm 0,38	8,5 \pm 0,38	0,0 \pm 0,0
PrTMOS	74 \pm 2,0	4,8 \pm 1,3	90,6 \pm 0,75	9,0 \pm 0,75	0,36 \pm 0,45

^a Activitatea specifică a fost calculată după 30 de minute de reacție

^b Compoziția amestecului de reacție a fost determinată după 21 de ore de reacție
SD - deviația standard a valorilor

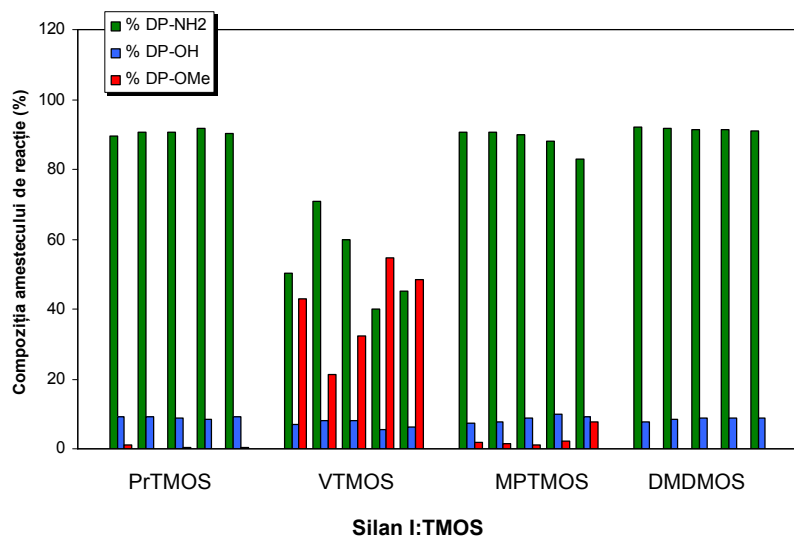


Figura 2.21. Influența silanului precursor asupra reproductibilității metodei de imobilizare prin determinarea compoziției amestecului de reacție după 21 de ore de incubare

Eficiența catalitică a fost maximă în cazul preparatelor obținute prin entraparea alcalazei în matrici derivate din DMDMOS și TMOS (raport molar de 1:1). Folosind aceste preparate enzimatice, s-a obținut o conversie totală a substratului după 21 de ore de reacție, amestecul de reacție fiind format din 91,5% produs principal de reacție (Z-Ala-Phe-OMe) și doar 8,5% produs secundar (Z-Ala-Phe-OH) rezultat în urma hidrolizei substratului. În ceea ce privește randamentul în produs format (amidă), precum și activitatea specifică calculată în primele momente ale

reacției, preparatele enzimatiche au demonstrat o excelentă reproductibilitate, deviația standard calculată pentru cele cinci valori fiind 0,38%, respectiv 1,7%. Randamentul de imobilizare a fost de 84% în cazul preparatului derivat din VTMOȘ și TMOȘ, însă acest biocatalizator nu a fost reproductibil în reacția studiată. O posibilă explicație ar fi legăturile covalente suplimentare formate între enzimă și matricea de sol-gel.

Pe baza datelor din Tabelul 2.17 s-a realizat Figura 2.21 care prezintă randamentele în produs ale celor 20 de preparate enzimatiche după 21 de ore de reacție.

2.3.6. Influența concentrației de enzimă asupra eficienței catalitice a alcalazei imobilizate prin metoda sol-gel

În cazul preparatelor enzimatiche obținute prin imobilizarea alcalazei prin entrapare în sol-gel folosind ca silani precursori DMDMOȘ și TMOȘ în raport molar de 1:1, s-au obținut valorile cele mai ridicate ale activității de amidare și randamentului în produs. Aceste valori au fost corelate cu un randament de imobilizare de 80%. Deoarece în timpul procesului de imobilizare, o parte din proteina activă (subtilizina) nu a fost entrapată în totalitate, s-a studiat efectul cantității inițiale de proteină folosită la imobilizare asupra eficienței catalitice a biocatalizatorului. S-a studiat astfel eficiența de imobilizare pentru un domeniu de patru concentrații de proteină. Experimentele au fost realizate pentru a stabili concentrația optimă de enzimă folosită pentru imobilizare, astfel încât performanțele biocatalizatorilor să fie îmbunătățite. S-a folosit un raport de mase cuprins între 2,8 și 9,7 mg proteină/mmoli silani. Aceste valori au fost corelate cu diferite cantități de proteină (17, 29, 45 și 58 mg proteină, respectiv 300, 500, 780 și 1000 μ l soluție enzimatică). S-a urmărit astfel protocolul reacției de amidare descris la punctul 3.3, însă cu modificarea cantității de biocatalizator.

În acest studiu s-au folosit patru preparate enzimatiche obținute prin imobilizarea alcalazei în sol-gel, cantitatea de enzimă utilizată în reacție fiind de 3 mg/ml. Prin determinarea cantității de proteină conținute în apele de spălare rezultate după imobilizare, s-a calculat randamentul de imobilizare (cuprins între 82% și 92%) [172].

În Tabelul 2.18 se poate observa că randamentul de entrapare este practic independent de concentrația de enzimă folosită la imobilizare.

Tabelul 2.18. Imobilizarea alcalazei în matrici siliconice de sol-gel (DMDMOȘ:TOMȘ, raport molar 1:1) folosind diferite cantități de enzimă

Proteină supusă imobilizării (mg)	Raport masic (mg proteină/mmoli silani)	Randament de imobilizare (%)	Capacitate de entrapare (%)	Activitate specifică (μ moli/h/mg proteină)
58	9,7	84,1	16,5	4,29
45	7,5	82,2	11,5	10,34
29	4,8	91,8	8,5	5,21
17	2,8	91,2	5,7	1,94

Capacitatea de imobilizare în matricea de sol-gel a fost calculată pe baza cantității totale de proteină entrapată și cantitatea de preparat uscat obținută.

Pe baza datelor din Tabelul 2.18 s-a realizat Figura 2.22 care reprezintă efectul capacității de entrapare asupra activității catalitice a biocatalizatorilor în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe.

Tabelul 2.19. Influența capacității de entrapare asupra eficienței catalitice a preparatelor enzimatiche în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe

Capacitate de entrapare (%)	Timp de reacție (ore)	Z-Ala-Phe-NH ₂ (% arie)	Z-Ala-Phe-OH (% arie)	Z-Ala-Phe-OMe (% arie)
16,5	0,5	9,7	0,0	90,3
	2	32,6	0,7	66,7
	4	51,1	1,1	47,9
	21	90,9	3,1	6,0
11,5	0,5	20,7	0,6	78,8
	2	47,8	1,1	51,1
	4	65,4	1,9	32,8
	21	94,0	3,1	3,0
8,5	0,5	8,5	0,4	91,1
	2	23,8	0,7	75,5
	4	35,8	1,2	63,0
	21	73,1	3,5	23,4
5,7	0,5	2,1	0,1	97,8
	2	7,4	0,4	92,1
	4	12,2	0,6	87,2
	21	38,7	2,9	58,4

Se observă că 11,5% a fost valoarea optimă a capacității matricei de imobilizare pentru care activitatea biocatalizatorului a fost maximă. Conversia substratului a fost de 97% după 24 de ore de incubare la 30°C, amestecul de reacție fiind format din 94% produs de amidare și doar 3% peptidă liberă rezultată în urma hidrolizei esterului metilic (Tabelul 2.19). Supraîncărcarea cu proteină a matricei de sol-gel a determinat scăderea activității catalitice. În studiile ulterioare s-a folosit această valoare optimă a capacității de imobilizare.

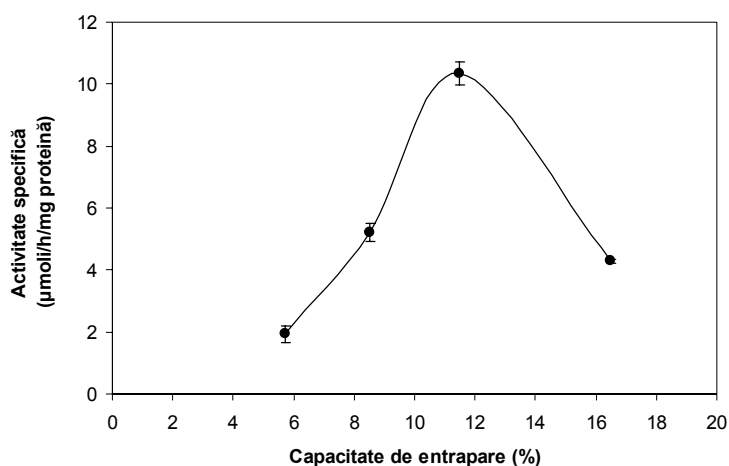


Figura 2.22. Efectul capacității de imobilizare a matricei de sol-gel asupra activității specifice în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe

2.3.7. Studiul influenței raportului molar al silanilor precursori asupra eficienței biocatalizatorilor

Pentru a obține biocatalizatori cu performanțe ridicate, a fost important să se determine raportul molar optim al silanilor precursori. Pentru acest studiu s-au folosit cinci preparate enzimatice obținute prin imobilizarea proteazei alcalază 2,4L FG prin entrapare în sol-gel conform metodei de la punctul 3.1.1, utilizând ca precursori dimetildimetoxisilan (DMDMOS) și tetrametoxisilan (TMOS) în diferite rapoarte molare. Raportul molar relativ al precursorului silanic DMDMOS a fost variat între 0,5 și 8 (Tabelul 2.20). Biocatalizatorii obținuți au fost testați în reacția de amidare a esterului Z-Ala-Phe-OMe conform protocolului descris la punctul 3.3, rezultatele obținute fiind prezentate în Tabelul 2.21 [172].

Tabelul 2.20. Imobilizarea alcalazei în matrici siliconice de sol-gel la diferite rapoarte molare ale silanilor precursori

DMDMOS:TMOS (raport molar)	Timp de gelifiere (min)	Randament de entrapare (%)	Cantitate de preparat (mg)	Capacitate de entrapare (%)
0,5:1	1	94	424	10
1:1	2	84	329	12
2:1	2	79	197	18
4:1	3	79	101	35
8:1	7	46	40	51

Creșterea concentrației grupărilor dimetil în amestecul de silani precursori a fost benefică până la un raport molar DMDMOS:TMOS de 1:1. Depășirea acestei valori a dus la dificultăți în formarea gelului și activități mai mici ale preparatelor enzimatice

obținute. De asemenea, creșterea raportului de DDMOS a determinat scăderea randamentului de imobilizare, precum și a cantității de preparat imobilizat. Această tendință se poate explica prin dificultatea reacției de hidroliză și condensare a silanilor precursori la un conținut ridicat de grupări hidrofobe. Textura gelului de silice este influențată de viteza relativă a reacțiilor de hidroliză și condensare [153]. Valoarea activității specifice a fost maximă (11,5 $\mu\text{moli/h/mg}$ proteină) în cazul preparatului obținut la un raport molar de al silanilor precursori de 1:1, această valoare fiind folosită pentru studiile ulterioare. În Figura 2.23 este reprezentată influența raportului molar al silanilor precursori asupra activității enzimatică și a capacității de entrapare.

Tabelul 2.21. Reacția de amidare a esterului metilic Z-Ala-Phe-OMe prin biocataliză cu preparate obținute prin imobilizarea în sol-gel a alcalazei 2,4L FG la diferite rapoarte molare ale silanilor precursori

DMDMOS: TMOS (raport molar)	Timp de reacție (ore)	Z-Ala- Phe-NH₂ (% arie)	Z-Ala- Phe-OH (% arie)	Z-Ala- Phe-OMe (% arie)	Activitate specifică ($\mu\text{moli/h/mg}$ proteină)
0,5:1	0,5	3,7	1,1	95,2	2,58
	2	14,3	0,9	84,8	
	4	26,1	1,19	72,7	
	21	71,7	4,58	23,7	
1:1	0,5	15,6	0,9	83,5	11,5
	2	39,0	1,2	59,8	
	4	57,7	1,55	40,8	
	21	92,7	3,66	3,6	
2:1	0,5	10,5	0,98	88,5	5,07
	2	16,2	0,9	82,9	
	4	29,9	1,24	68,9	
	21	72,7	3,99	23,3	
4:1	0,5	6,3	0,95	92,8	1,64
	2	15,1	0,9	84,0	
	4	25,3	1,22	73,5	
	21	65,4	4,08	30,5	
8:1	0,5	5,2	0,93	93,8	0,94
	2	19,0	0,9	80,1	
	4	33,5	1,28	65,3	
	21	77,5	4,83	17,7	

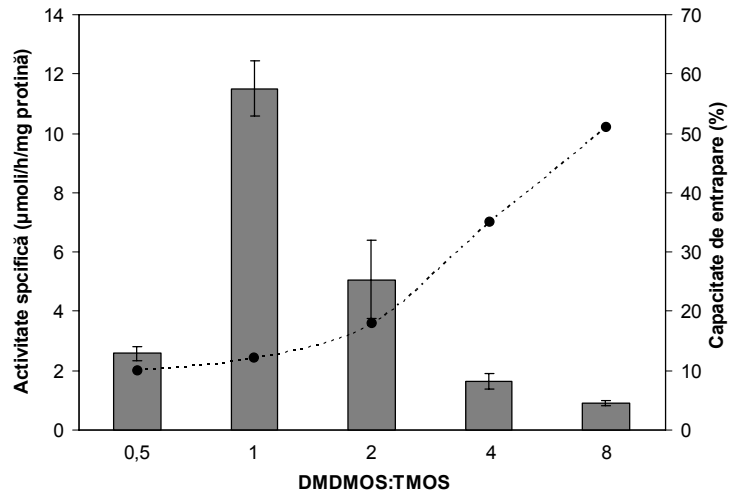


Figura 2.23. Influența raportului molar al silanilor precursori asupra activității enzimatice și capacității de entrapare

2.3.8. Cinetica reacției de amidare a Z-Ala-Phe-OMe catalizată de alcalaza nativă și imobilizată

Pentru acest studiu s-a folosit preparatul enzimatic obținut prin optimizarea metodei de imobilizare utilizând un raport masic de 7,5 mg proteină/mmoli silani și DMDMOS:TMOS la un raport molar de 1:1. Pentru compararea corectă a eficienței biocatalizatorilor, în reacția de amidare s-au folosit aceleași unități de activitate pentru cele două enzime (2,6 U/mg proteină în cazul enzimei libere și 2,6 U/mg preparat în cazul enzimei imobilizate).

Rezultatele obținute prin urmărirea reacției în timp sunt prezentate în Tabelul 2.22 și Figura 2.24. Viteza inițială de reacție a fost puțin mai mică în cazul preparatului imobilizat comparativ cu enzima nativă, însă la un timp mai îndelungat de incubare s-a observat o creștere a eficienței catalitice a preparatului imobilizat față de enzima nativă. Aceasta se poate explica prin îmbunătățirea stabilității operaționale a enzimei în urma imobilizării. Valoarea scăzută a vitezei inițiale după imobilizare se poate explica prin apariția problemelor de difuziune ale substratului sau produsului de reacție în matricea de sol-gel.

Tabelul 2.22. Reacția de amidare a substratului model catalizată de alcalaza nativă și imobilizată

Enzimă	Timp de reacție (min)	Z-Ala-Phe-NH ₂ (% arie)	Z-Ala-Phe-OH (% arie)	Z-Ala-Phe-OMe (% arie)
Alcalază nativă	10	4,6	1,01	94,3
	30	6,6	1,11	92,3
	120	16,6	2,22	81,1
	240	21,8	2,70	75,5
	1260	44,2	12,71	43,1
Alcalază imobilizată	10	3,6	0,53	95,8
	30	10,3	0,62	89,1
	120	34,6	1,08	64,3
	240	51,6	1,95	46,5
	1260	86,5	8,62	4,9

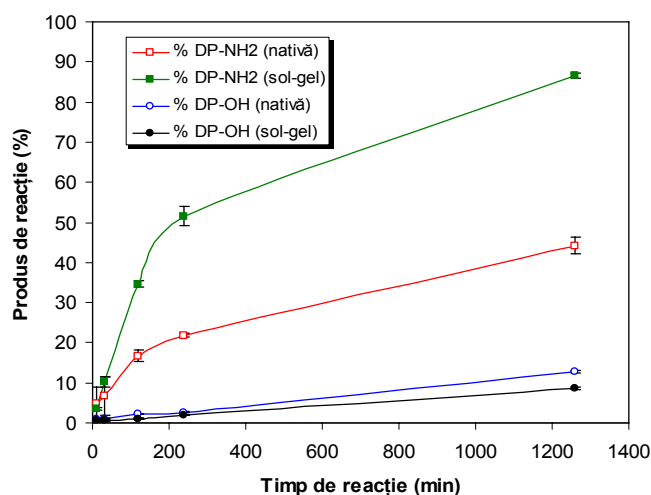


Figura 2.24. Evoluția în timp a reacției de amidare a Z-Ala-Phe-OMe utilizând aceleași unități de activitate pentru enzima nativă și imobilizată

Parametrii cinetici ai enzimei native și imobilizate în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe au fost determinați pentru concentrațiile de substrat aflate în domeniul 5 și 350 mM [172]. Entraparea proteazei în matrici de silice a determinat o creștere a constantei Michaelis-Menten (K_M) de la 55 la 117 mM (Tabelul 2.23), această tendință fiind corelată cu o afinitate mai scăzută a enzimei pentru substratul respectiv. Aceasta se poate explica prin îngreunarea transferului de masă a substratului în rețeaua de silice. În același timp, viteza maximă (V_M) a crescut de 4,4 ori după imobilizare. Eficiența catalitică totală a reacției catalizată enzimatic, exprimată prin raportul k_{cat}/K_M , a fost de două ori mai mare în cazul alcalazei imobilizate, indicând astfel eficacitatea procesului de imobilizare. Cele două curbe cinetice, realizate cu ajutorul programului Sigma Plot 7.0 sunt prezentate în figurile 2.25 și 2.26.

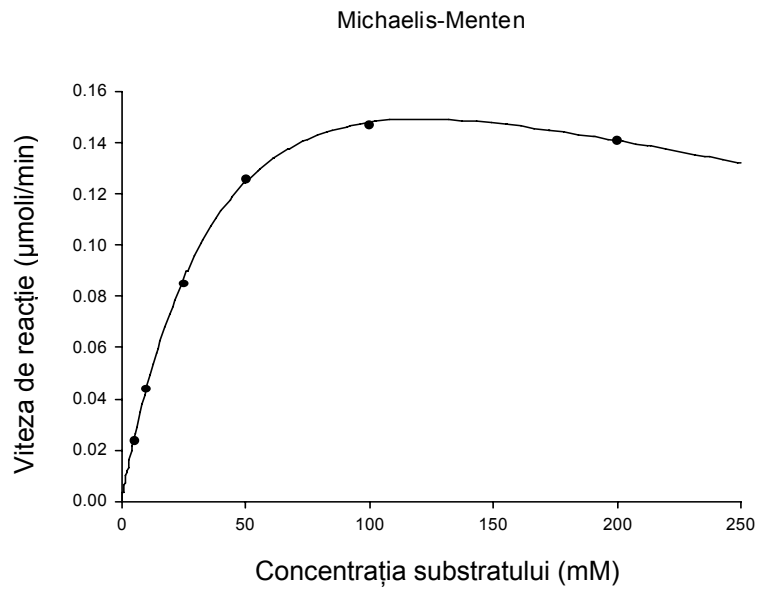


Figura 2.25. Curba Michaelis-Menten în cazul alcalazei native

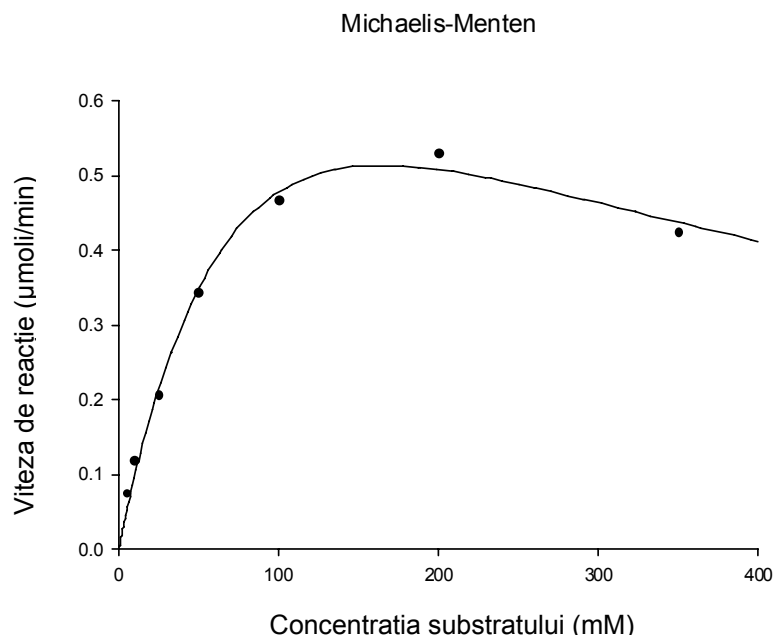


Figura 2.26. Curba Michaelis-Menten în cazul alcalazei imobilizate

Tabelul 2.23. Cinetica reacției de amidare catalizată de alcalaza nativă și imobilizată

Enzima	Parametri cinetici		
	K_M^a (mM)	V_{max}^b ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	k_{cat}/K_M^c (mM/min)
Alcalaza nativă	55	0,28	$2,0 \times 10^{-3}$
Alcalaza imobilizată	117	1,24	$4,1 \times 10^{-3}$

^a K_M : constanta Michaelis-Menten

^b V_{max} : viteza maximă a reacției enzimaticice

^c k_{cat}/K_M : eficiența catalitică a biocatalizatorului

2.3.9. Influența raportului molar al silanilor precursori asupra eficienței catalitice a alcalazei imobilizate în sisteme terțiare de MeTMOS, DMDMOS și TMOS

Proprietățile enzimelor imobilizate prin tehnica de sol-gel pot fi influențate semnificativ de natura substituentului R în sistemele binare de trialcoksi- și tetraalcoxilani (R-Si(OR)_3 și Si(OR)_4).

Deoarece sistemele binare de DMDMOS și TMOS s-au dovedit a fi cele mai eficiente pentru imobilizarea alcalazei, în acest capitol s-au urmărit proprietățile alcalazei imobilizate în sisteme ternare de silani precursori. În studiile anterioare, s-a demonstrat că preparatele obținute cu MeTMOS manifestă o activitate scăzută, datorită structurii compacte a rețelei de silice. De aceea, pentru a îmbunătăți randamentul de imobilizare al enzimei active (subtilizina) din compoziția preparatului comercial alcalază, acest silan a fost folosit în combinație cu DMDMOS și TMOS. Astfel, raportul molar al MeTMOS:DMDMOS a fost variat între 0 și 1, iar cel al (MeTMOS:DMDMOS):TMOS a fost menținut constant la 1:1. Proprietățile preparatelor enzimaticice ternare rezultate au fost caracterizate prin testarea eficienței catalitice în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe folosind carbamatul de amoniu ca agent nucleofil. Rezultatele acestui studiu sunt prezentate în tabelele 2.24 și 2.25.

Tabelul 2.24. Influența raportului molar al silanilor precursori asupra randamentului de imobilizare al alcalazei

MeTMOS:DMDMOS:TMOS (raport molar)	Randament de imobilizare (%)	Capacitate de entrapare (%)	Cantitate de preparat (mg)
0:1:1	73	7,0	461
0,1:0,9:1	72	6,9	461
0,3:0,7:1	78	6,4	536
0,5:0,5:1	82	5,9	616
0,7:0,3:1	75	5,5	604
0,9:0,1:1	77	5,4	622
1:0:1	81	14,1	333

Din Tabelul 2.24 se observă că randamentul de entrapare nu a fost influențat de raportul molar al silanilor folosiți la imobilizare. Valoarea maximă a capacității de imobilizare s-a obținut în cazul rețelelor de MeTMOS:TMOS la raport molar de 1:1. Creșterea concentrației de MeTMOS a determinat obținerea unor preparate enzimatiche cu structuri mai dense. Activitatea catalitică calculată după 30 de minute de incubare, precum și compoziția amestecului de reacție la diferite momente ale acesteia sunt prezentate în Tabelul 2.25 și Figura 2.27. S-a demonstrat că sistemele ternare în care compoziția de MeTMOS a fost de 0,3, 0,9 și 1,5 mmoli, au fost superioare din punct de vedere al activității enzimatiche comparativ cu sistemul binar format din DMDMOS:TMOS (raport molar, 1:1). Viteza optimă a fost atinsă de preparatul enzimatic obținut prin imobilizarea alcalazei folosind precursorii silanici MeTMOS:DMDMOS:TMOS în raport molar de 0,3:0,7:1. Randamentul în produs a fost de asemenea influențat de compoziția sistemelor ternare. Conversia totală a substratului după 24 de ore, randamentul maxim de produs de amidare (93,5%), precum și randamentul minim în produs secundar de hidroliză (6,5%) au fost obținute folosind preparatele enzimatiche în care conținutul de MeTMOS a fost minim (0, respectiv 0,3 mmoli MeTMOS). Creșterea concentrației de MeTMOS din rețeaua de sol-gel a determinat scăderea vitezei inițiale de reacție, precum și a productivității. Acest fenomen se poate explica prin îngreunarea transferului de masă al substratului și/sau produsului în matricea de sol-gel.

Tabelul 2.25. Reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe catalizată de alcalaza imobilizată în sisteme binare și ternare de silani precursori la diferite rapoarte molare

MeTMOS (mmoli)	Timp de reacție (ore)	DP-NH ₂ (% arie)	DP-OH (% arie)	DP-OMe (% arie)	Activitate (μmoli DP-NH ₂ ·h ⁻¹ ·mg gel ⁻¹)
0	0,5	51,9	5,2	43,0	3,68
	2	85,2	5,2	9,6	
	24	93,5	6,5	0,0	
0,3	0,5	78,4	9,0	12,7	5,73
	2	91,9	6,8	1,4	
	24	93,5	6,5	0,0	
0,9	0,5	79,9	12,8	7,4	6,05
	2	87,8	8,6	3,6	
	24	91,5	7,9	0,6	
1,5	0,5	62,9	9,9	27,2	5,60
	2	86,9	8,3	4,8	
	24	91,1	7,9	1,0	
2	0,5	27,7	3,1	69,2	2,45
	2	72,7	9,8	17,5	
	24	90,3	9,2	0,5	
2,1	0,5	18,6	2,1	79,3	1,45
	2	40,8	2,8	56,3	
	24	91,1	8,9	0,0	
2,7	0,5	3,6	0,7	95,7	0,28
	2	11,9	1,4	86,7	
	24	60,8	11,8	27,5	
3	0,5	1,7	0,5	97,8	0,15
	2	5,1	0,6	94,3	
	24	31,1	7,2	61,7	

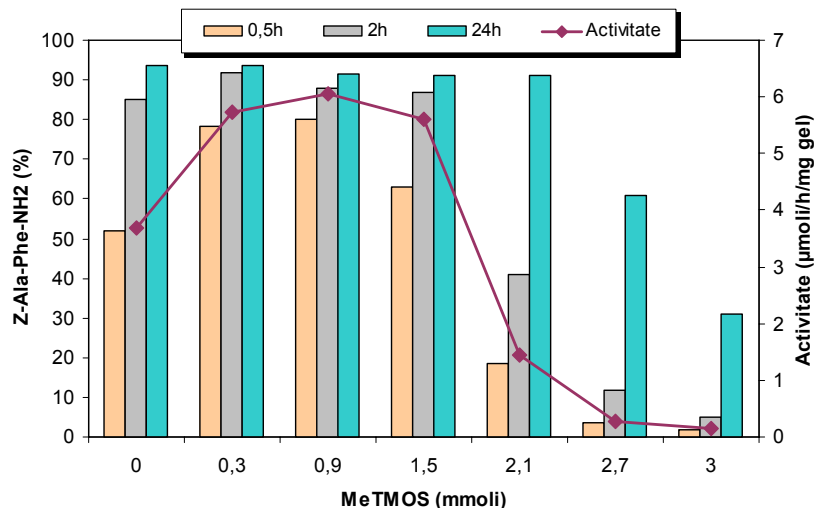


Figura 2.27. Influența concentrației de MeTMOS asupra eficienței catalitice a alcalazei imobilizate

2.3.10. Influența naturii suportului solid asupra eficienței catalitice a alcalazei imobilizate prin entrapare combinată cu adsorbție

Metoda de imobilizare combinată implică adsorbția enzimei entrapate în sol-gel pe suprafața unui suport solid inert, care ar putea determina creșterea activității catalitice, evitarea aglomerării enzimei în timpul procesului de imobilizare, precum și îmbunătățirea difuziunii substratului sau produșilor spre și dinspre enzimă determinând astfel creșterea vitezei de reacție [174, 175].

În acest subcapitol s-a realizat imobilizarea alcalazei prin entrapare combinată cu adsorbție pe suport solid (Celite) conform metodei descrise în capitolul 3.1.2. Silanii precursori folosiți au fost DMDMOS:TMOS în raport molar de 1:1. Proprietățile preparatelor enzimice rezultate au fost caracterizate prin testarea eficienței catalitice în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe folosind carbamatul de amoniu ca agent nucleofil la 30°C. Rezultatele acestui studiu sunt prezentate în tabelele 2.26 și 2.27.

Tabelul 2.26 Influența suportului solid folosit la dubla imobilizare a alcalazei asupra randamentului de imobilizare

Suport solid	Randament de imobilizare (%)	Capacitate de entrapare (%)	Cantitate de preparat (mg)
Celite C22	74	3,2	1005
Celite 521	78	3,2	1062
Celite 545	76	3,3	1028

Se observă că randamentul, precum și capacitatea de entrapare nu au fost influențate de natura suportului de imobilizare. Viteza maximă de reacție (3,49 μmoli/h/mg gel) a fost obținută în cazul folosirii preparatului enzimatic adsorbit pe

Celite 521. Conversia totală a substratului a fost atinsă după 2 ore de incubare în cazul folosirii Celite 521 și Celite 545 ca suporturi de imobilizare (Tabelul 2.27 și Figura 2.28). Compoziția amestecului de reacție după 24 de ore a fost de 94,7% produs de amidare și doar 5,3% produs secundar de hidroliză în cazul reacției catalizate de alcalaza imobilizată folosind ca suport inert Celite 545.

Tabelul 2.27. Reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe catalizată de alcalaza imobilizată prin entrapare și adsorbție

Suport solid	Timp de reacție (ore)	DP-NH ₂ (% arie)	DP-OH (% arie)	DP-OMe (% arie)	Activitate (μmoli/h/mg gel)
Celite C22	0,5	51,8	6,6	41,6	2,23
	2	77,9	4,4	17,6	
	24	93,5	5,8	0,6	
Celite 521	0,5	82,9	10,0	7,1	3,49
	2	93,9	6,1	0,0	
	24	93,8	6,2	0,0	
Celite 545	0,5	75,9	7,6	16,6	3,21
	2	94,1	5,9	0,0	
	24	94,7	5,3	0,0	

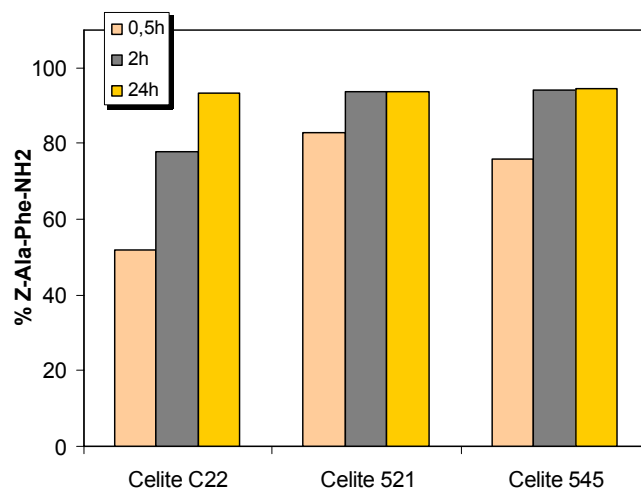


Figura 2.28. Influența naturii suportului solid asupra eficienței catalitice a alcalazei imobilizate prin metoda combinată

2.3.11. Concluzii parțiale

A fost realizată imobilizarea proteazei alcalază prin entrapare și entrapare în combinată cu adsorbție pe Celite.

Dintre proteazele studiate, alcalaza 2,4L FG s-a dovedit a fi cea mai eficientă în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe, proprietățile biocatalizatorului fiind constante indiferent de lotul din care a provenit.

Natura grupării nehidrolizabile a avut o influență considerabilă asupra eficienței biocatalizatorilor obținuți prin entrapare în sol-gel cu diferiți silani precursori (metoxisilani) la un raport molar de 1:1, în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe. Creșterea numărului de grupări metil în structura silanului a avut un efect favorabil asupra activității, așa cum se poate observa în cazul preparatului obținut cu DDMOS:TMOS la raport molar de 1:1.

Valoarea optimă a capacității de entrapare, pentru care activitatea specifică a preparatului enzimatic a fost maximă, a fost de 11,5% (corespunzând unui raport masic de 7,5 mg proteină/mmoli silani), iar raportul molar al silanilor precursori a fost de 1:1.

Eficiența catalitică totală a reacției de amidare catalizată enzimatic, exprimată prin raportul k_{cat}/K_M , a fost de două ori mai mare în cazul alcalazei imobilizate, indicând astfel eficacitatea procesului de imobilizare.

Sistemele ternare în care compoziția de MeTMOS a fost de 0,3, 0,9 și 1,5 mmoli, au fost superioare din punct de vedere al activității inițiale comparativ cu sistemul binar format din DDMOS:TMOS (raport molar, 1:1). Creșterea în continuare a densității grupărilor metil (MeTMOS) în rețeaua de sol-gel a avut efect nefavorabil asupra vitezei inițiale de reacție, precum și a productivității.

Metoda combinată de entrapare și adsorbție este indicată deoarece imobilizarea prin efect dublu, de închidere a enzimei în rețea și depunere pe suport, reduce pierderile fizice de biocatalizator concomitent cu menținerea unei activități ridicate. Dintre suporturile de adsorbție, cele mai eficiente s-au dovedit a fi cele de tip Celite 545.

2.4. Stabilitatea alcalazei native și imobilizate în reacția de amidare

Stabilitatea reprezintă unul dintre cei mai importanți parametri din punct de vedere al aplicațiilor biocatalizatorilor în industrie. Pentru acest studiu s-a folosit preparatul enzimatic obținut prin optimizarea metodei de imobilizare utilizând un raport masic de 7,5 mg proteină/mmoli silani și DDMOS:TMOS la un raport molar de 1:1 [172].

2.4.1. Studiul stabilității în timp a preparatelor enzimatice

Stabilitatea enzimelor imobilizate la temperatura camerei este un parametru foarte important din punct de vedere al domeniului larg al aplicațiilor acestora. De aceea s-a studiat stabilitatea enzimei imobilizate precum și celei native prin menținerea acestora la temperatura ambiantă timp de 50 de zile. La diferite intervale de timp, respectiv 0, 10, 28, 50 de zile de păstrare, biocatalizatorii au fost testați în reacția de amidare a substratului model, determinându-se activitatea în primele momente ale reacției. Pentru această reacție s-au folosit aceleași unități de activitate ca și în studiul anterior (2,6 U/mg proteină în cazul enzimei libere, respectiv 2,6 U/mg preparat în cazul celei imobilizate). Rezultatele sunt prezentate în tabelele 2.28 și 2.29.

Tabelul 2.28. Stabilitatea în timp a alcalazei native la temperatura ambiantă

Timp de condiționare (zile)	DP-NH ₂ ± SD (%)	DP-OH ± SD (%)	DP-OMe ± SD (%)	Activitate specifică (μmoli substrat·h ⁻¹ ·mg proteină ⁻¹)	Activitate relativă (%)
0	13,8 ± 0,72	1,86 ± 0,69	84,2 ± 0,03	663,4 ± 33,9	100
10	10,8 ± 1,28	0,98 ± 0,30	88,2 ± 1,58	517,1 ± 68,4	78
28	5,8 ± 0,03	1,84 ± 0,08	92,4 ± 0,11	291,1 ± 9,97	44
50	4,85 ± 0,62	1,31 ± 0,22	93,8 ± 0,84	225,2 ± 30,55	35

Tabelul 2.29. Stabilitatea în timp a alcalazei imobilizate la temperatura ambiantă

Timp de condiționare (zile)	DP-NH ₂ ± SD (%)	DP-OH ± SD (%)	DP-OMe ± SD (%)	Activitate (μmoli substrat·h ⁻¹ ·mg gel ⁻¹)	Activitate relativă (%)
0	12,5 ± 0,12	0,74 ± 0,01	86,8 ± 0,13	1,5 ± 0,01	100
10	11,9 ± 0,19	1,33 ± 0,67	88,4 ± 0,85	1,37 ± 0,03	92
28	9,8 ± 0,01	2,06 ± 0,09	89,1 ± 1,10	1,09 ± 0,13	73
50	8,4 ± 0,006	1,02 ± 0,01	90,6 ± 0,02	1,06 ± 0,001	71

În Figura 2.29 se observă că imobilizarea alcalazei în matrici de sol-gel a determinat o îmbunătățire a stabilității în timp a preparatului enzimatic. După o perioadă de 50 de zile de păstrare la temperatura ambiantă, alcalaza imobilizată a reținut 71% din activitatea inițială. În aceleași condiții, enzima nativă a reținut doar 35% din activitatea inițială.

Aceste rezultate demonstrează că imobilizarea în matrici de sol-gel a proteazelor asigură un mediu stabil și previne pierderea rapidă a activității care apare în timpul păstrării enzimei la temperatura ambiantă.

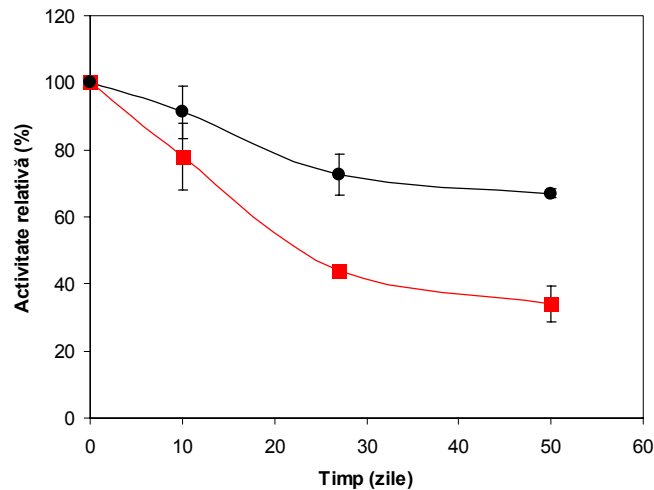


Figura 2.29. Stabilitatea la păstrare la temperatura camerei a enzimei libere (roșu) și immobilizate în sol-gel (negru)

2.4.2. Studiul stabilității termice a preparatelor enzimatic

Enzimele își pierd activitatea la temperaturi ridicate datorită modificărilor conformaționale ireversibile care apar la nivelul structurii terțiare. Inactivarea termică este deci unul dintre motivele care împiedică utilizarea biocatalizatorilor în industrie. De aceea, imobilizarea s-a dovedit, în multe cazuri, a fi o alternativă promițătoare în rezolvarea acestei probleme.

În acest studiu s-a urmărit influența temperaturii de incubare asupra eficienței catalitice a alcalazei imobilizate în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe. Pentru acest studiu s-au folosit aceleași unități de activitate ca și în studiul anterior (2,6 U/mg proteină în cazul enzimei libere, respectiv 2,6 U/mg preparat în cazul celei imobilizate). S-a studiat, dacă și în ce măsură matricea de sol-gel poate să protejeze enzima împotriva denaturării termice.

Stabilitatea termică a enzimelor a fost studiată prin determinarea activității reziduale după incubarea acestora timp de 10 minute la 30, 40, 50, 60, respectiv 70°C. Rezultatele acestui studiu sunt prezentate în tabelele 2.30 și 2.31.

Activitatea proteazei libere a scăzut progresiv o dată cu creșterea temperaturii de incubare, cu o viteză mult mai mare decât cea a preparatului enzimatic rezultat prin imobilizare. În cazul enzimei native, activitatea regăsită după incubare (10 minute la 70°C) a fost de 35% din activitatea inițială, indicând astfel o sensibilitate profundă la încălzire. În condiții similare, alcalaza imobilizată a reținut 78% din activitatea inițială (Figura 2.30).

Tabelul 2.30. Stabilitatea termică a alcalazei native în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe

Temperatură de incubare (°C)	DP-NH ₂ ± SD (%)	DP-OH ± SD (%)	DP-OMe ± SD (%)	Activitate specifică (μmoli/h/mg proteină)	Activitate relativă (%)
30	13,9 ± 0,72	1,86 ± 0,69	84,2 ± 0,03	663,6 ± 33,9	100
40	13,2 ± 0,61	2,17 ± 0,56	84,6 ± 1,17	624,6 ± 22,2	94
50	11,8 ± 0,25	4,25 ± 0,82	89,9 ± 9,05	553,7 ± 51,1	83
60	9,50 ± 0,25	2,47 ± 0,24	88,0 ± 0,01	498,5 ± 13,1	75
70	4,85 ± 0,79	1,43 ± 0,31	93,8 ± 0,47	237,2 ± 45,6	35

Tabelul 2.31. Stabilitatea termică a alcalazei imobilizate prin metoda sol-gel în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe

Temperatură de incubare (°C)	DP-NH ₂ ± SD (%)	DP-OH ± SD (%)	DP-OMe ± SD (%)	Activitate (μmoli/h/mg gel)	Activitate relativă (%)
30	12,5 ± 0,12	0,73 ± 0,01	86,8 ± 0,13	1,50 ± 0,08	100
40	12,9 ± 0,71	0,99 ± 0,37	86,1 ± 0,34	1,46 ± 0,04	97
50	12,5 ± 1,75	0,90 ± 0,26	86,6 ± 2,01	1,49 ± 0,20	99
60	10,6 ± 0,31	0,54 ± 0,05	89,0 ± 0,36	1,25 ± 0,02	83
70	9,70 ± 1,57	0,82 ± 0,44	89,5 ± 2,02	1,17 ± 0,13	78

Îmbunătățirea stabilității termice prin imobilizare se poate explica prin legăturile formate între moleculele de enzimă și suportul de imobilizare care previn modificările conformaționale ce pot apărea în urma încălzirii. Abilitatea de a reține activitatea enzimatică la temperaturi ridicate determină lărgirea domeniului de utilizare a enzimelor, precum și numeroase avantaje ca: reducerea riscului de contaminare microbiană, scăderea vâscozității, creșterea ratei de transfer și a solubilității substratului [176]. În opinia altor autori, creșterea stabilității a proteazelor imobilizate comparativ cu omologii lor solubili se poate datora prevenirii fenomenului de autoliză și denaturării termice [177]. Rezultatele obținute demonstrează că stabilitatea termică a proteazelor poate fi îmbunătățită prin imobilizarea în sol-gel, devenind astfel biocatalizatori atractivi pentru aplicațiile industriale.

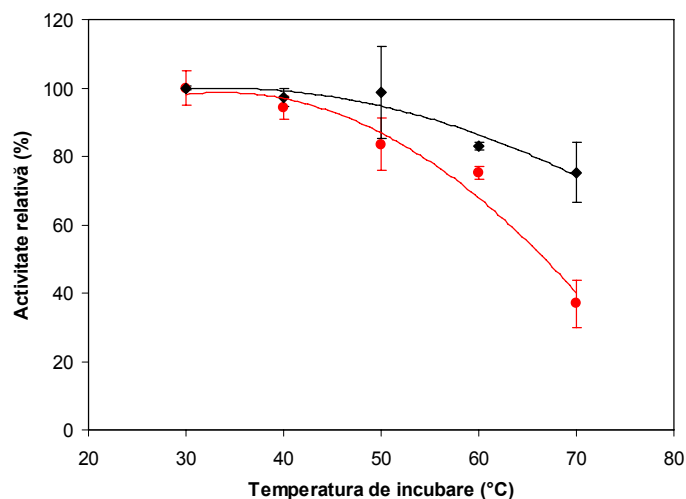


Figura 2.30. Stabilitatea termică a protezei imobilizate (negru) comparativ cu cea nativă (roșu) la diferite temperaturi de incubare

2.4.3. Studiul reutilizării preparatelor enzimice în mediu de solvent organic în sistem discontinuu

Posibilitatea reutilizării este o caracteristică esențială a aplicațiilor practice ale biocatalizatorilor. Inactivarea și pierderea enzimei din matricea de sol-gel reprezintă dezavantajele cele mai proeminente din punct de vedere al utilizării pe scară largă a enzimelor imobilizate. Reutilizarea alcalazei imobilizate este esențială pentru reducerea costului biocatalizatorului în procesele cu funcționare continuă sau discontinuă.

În acest studiu s-a urmărit influența numărului de reutilizări asupra performanțelor alcalazei imobilizate în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe. Reacția a fost catalizată de preparatul enzimatic obținut prin entraparea protezei în matrice de sol-gel folosind silanii precursori DDMOS și TMOS în raport molar de 1:1 [172]. În acest caz s-a folosit o cantitate dublă de enzimă (4 mg/ml sau 5,2 U/mg preparat) pentru a evita pierderile apărute în timpul procesului de separare a enzimei de mediul de reacție. După fiecare reutilizare, preparatul enzimatic a fost recuperat prin centrifugare și separare, urmată de spălare cu 2 ml *t*-BuOH/DMF (82,5/17,5, % vol.) între cicluri. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 2.32.

Tabelul 2.32. Reutilizarea alcalazei imobilizate în reacția de amidare a dipeptidului Z-Ala-Phe-OMe (22 de ore de incubare la 30°C)

Nr. cicluri	DP-NH ₂ (%)	Eficiența catalitică (% DP-NH ₂ ·h ⁻¹ ·mg gel ⁻¹)	Eficiența relativă (%)
1	82,4	0,223	100,0
2	82,0	0,222	99,3
3	78,5	0,215	95,3
4	76,3	0,206	92,3
5	84,6	0,216	96,6
6	76,1	0,205	91,8
7	81,8	0,221	99,1
8	82,1	0,223	99,8
9	82,2	0,220	98,6
10	89,9	0,223	100,1
11	85,5	0,225	100,8
12	87,7	0,231	103,5
13	88,5	0,231	103,5
14	84,6	0,232	104,1

Se poate observa că preparatul imobilizat și-a păstrat în totalitate eficiența catalitică chiar și după 14 reutilizări la 30°C (Figura 2.31). Nu au existat pierderi de activitate pe parcursul reutilizării biocatalizatorului. La finalul experimentului, enzima a fost separată din mediul de reacție, iar supernatantul a fost testat într-o nouă reacție de amidare pentru a determina existența eventualelor pierderi de proteină din matricea de sol-gel apărute în timpul păstrării îndelungate a acesteia în solvent organic.

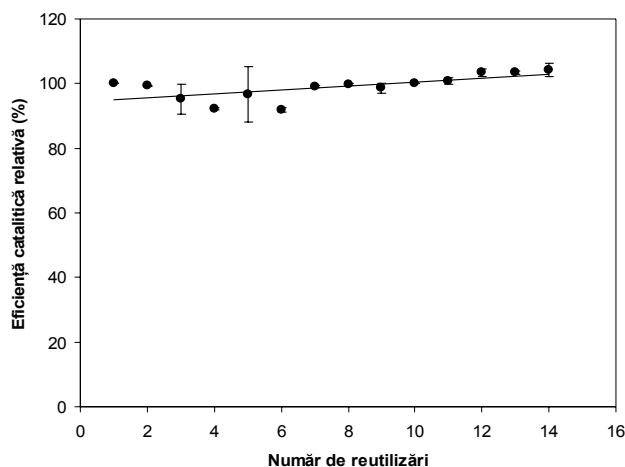


Figura 2.31. Influența numărului de reutilizări asupra eficienței catalitice relative a alcalazei imobilizate

Rezultatele au demonstrat că alcalaza imobilizată în matrice siliconice prezintă stabilitate operațională și mecanică ridicată în timpul menținerii prelungite în solvent

organic. Acest fenomen se poate explica prin faptul că imobilizarea prin entrapare reduce pierderile fizice de enzimă, acesta fiind un avantaj important în utilizarea biocatalizatorilor la scară industrială. Posibilitatea de reutilizare a enzimei imobilizate este esențială mai ales în procesele în care costul enzimelor este ridicat.

2.4.4. Studiul stabilității operaționale a alcalazei imobilizate în sistem continuu

Posibilitatea de reutilizare este o caracteristică esențială în aplicațiile practice ale biocatalizatorilor. Deoarece reactoarele în strat fix de catalizator continuă să domine aplicațiile la scară largă industrială a enzimelor imobilizate, s-a studiat un astfel de sistem pentru reacția de amidare a peptidei model Z-Ala-Phe-OMe. Astfel, s-a realizat sinteza în regim continuu a Z-Ala-Phe-NH₂ folosind alcalaza din *Bacillus licheniformis* imobilizată în matrici de sol-gel derivate din DMDMOS și TMOS în raport molar de 1:1 [167]. Reactorul, conținând catalizatorul și agentul nucleofil (carbamatul de amoniu) sub formă de straturi suprapuse, precum și schema instalației sunt prezentate în figurile 2.32 și 2.33.

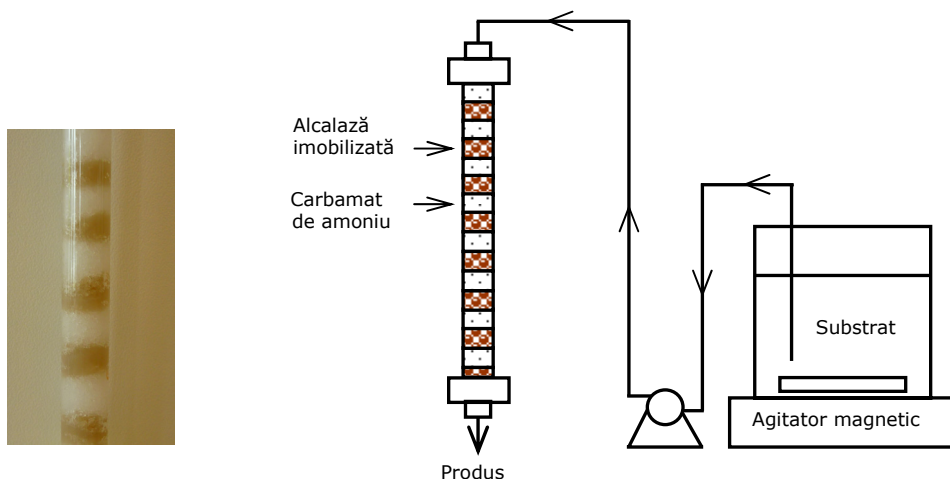


Figura 2.32. Reactorul în strat fix conținând alcalaza imobilizată și agentul nucleofil sub formă de straturi suprapuse

Figura 2.33. Schema instalației de obținere enzimatică a Z-Ala-Phe-NH₂ în regim continuu

Stabilitatea operațională a proteazei entrapate în sol-gel a fost studiată prin reutilizarea coloanei în strat fix de catalizator la temperatură ambiantă. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.33. La prima trecere a soluției de substrat prin coloană cu un debit de 0,15 ml/min, s-a atins un randament de produs de amidare de aproximativ 60%.

Așa cum reiese din Figura 2.34, alcalaza imobilizată a dovedit a avea o stabilitate operațională remarcabilă. Eficiența catalitică relativă (calculată ca randamentul de produs de amidare după prima trecere a soluției de substrat prin coloană) a fost de 0,98 chiar și după 10 cicluri de utilizare repetată.

Tabelul 2.33. Reutilizarea reactorului în strat fix de catalizator în sinteza Z-Ala-Phe-NH₂ (debit: 0,15 ml/min)

Nr. cicluri	DP-NH ₂ (%)	Eficiența relativă
1	53,0	1,00
2	52,8	0,99
3	57,5	1,08
4	49,6	0,94
5	50,8	0,96
6	54,3	1,03
7	56,6	1,07
8	54,7	1,03
9	53,5	1,01
10	51,9	0,98

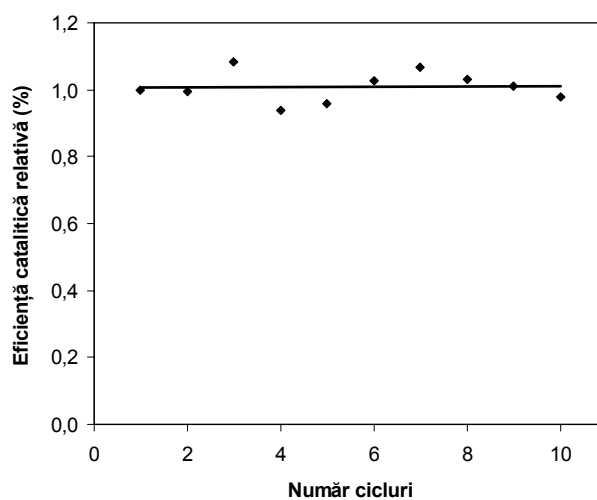


Figura 2.34. Influența numărului de reutilizări asupra eficienței catalitice relative a reactorului în strat fix de catalizator

Conversia totală a substratului a fost atinsă după 5 ore de recirculare a soluției de substrat prin coloana de catalizator, la un debit de 0,75 ml/min (Tabelul 2.34 și Figura 2.35). Randamentul în produs obținut a fost de 90% produs de amidare și 10% produs secundar rezultat în urma hidrolizei substratului.

Tabelul 2.34. Sinteza Z-Ala-Phe-NH₂ în sistem continuu prin recircularea soluției de substrat

Timp de reacție (ore)	DP-NH ₂ (%)	DP-OH (%)	DP-OMe (%)
0,0	0,0	0,0	100,0
1,0	64,0	4,0	32,0
2,0	82,0	7,0	11,0
3,0	86,6	7,3	6,1
4,0	90,0	8,4	1,6
5,0	90,0	10,0	0,0

Acest prim set de experimente preliminare demonstrează clar eficiența și stabilitatea alcalazei immobilizate prin tehnica de sol-gel pentru sinteza amidelor dipeptidelor în sistem continuu.

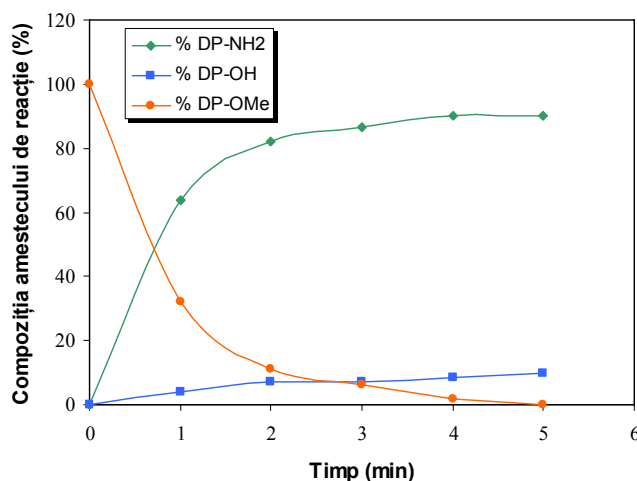


Figura 2.35. Evoluția reacției de amidare a Z-Ala-Phe-OMe în regim continuu

2.4.5. Concluzii parțiale

Preparatele immobilizate au prezentat stabilitate termică și de condiționare ridicată pe intervalul studiat în comparație cu enzima nativă. După o perioadă de 50 de zile de păstrare la temperatura ambiantă, alcalaza immobilizată a reținut 71% din activitatea inițială. În aceleași condiții, enzima nativă a reținut doar 35% din activitatea inițială.

Activitatea proteazei native a scăzut progresiv o dată cu creșterea temperaturii de incubare. Astfel, după incubarea la o temperatură de 70°C, enzima nativă a pierdut 65% din activitatea inițială, în timp pierderea de activitate a alcalazei entrapate a fost doar de 22%.

Imobilizarea prin entrapare s-a dovedit a fi o metodă eficientă care permite utilizarea repetată a enzimei, cu menținerea proprietăților biocatalitice. Imobilizarea alcalazei în matrici de sol-gel (DMDMOS:TMOS, raport molar 1:1) a determinat o

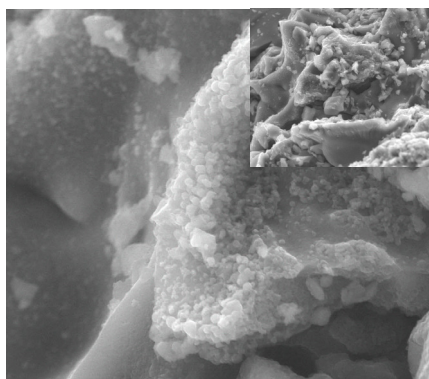
creștere însemnată a stabilității enzimei, activitatea reziduală după 14 reutilizări în mediu organic fiind de 100%.

Alcalaza imobilizată a fost de asemenea testată pentru producerea continuă a Z-Ala-Phe-NH₂. Nu s-au remarcat pierderi în activitatea alcalazei imobilizate în cazul reutilizării coloanei de biocatalizator, acesta fiind principalul avantaj al imobilizării prin entrapare.

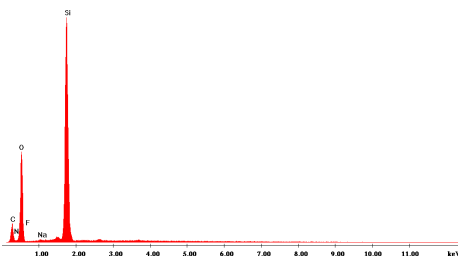
2.5. Caracterizarea morfologică a biocatalizatorilor obținuți prin metoda sol-gel

2.5.1. Microscopia electronică de scanare (SEM)

Microscopia electronică de baleiaj (SEM) a fost efectuată pentru a determina efectul silanilor precursori folosiți la imobilizare asupra structurii morfologice a preparatelor sol-gel. În același timp, analiza spectrofotometrică a semnalului de fluorescență emis prin acțiunea razelor X a permis identificarea calitativă a elementelor prezente în probă, acest semnal fiind dependent de numărul atomic al elementului respectiv. Imaginile SEM au oferit informații despre microstructura, porozitatea și textura materialelor. În continuare se va discuta influența naturii, precum și raportului molar al silanilor precursori asupra structurii morfologice a preparatelor studiate. Această structură va fi corelată cu activitatea biocatalizatorului în reacția de amidare a dipeptidei model.



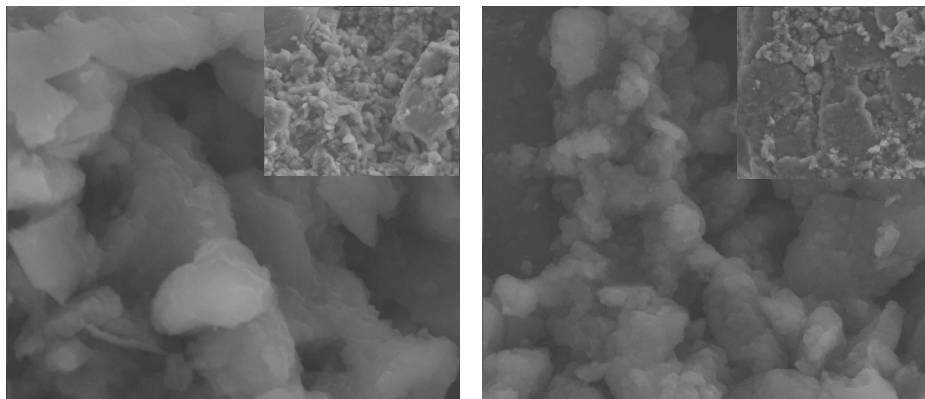
(a)



(b)

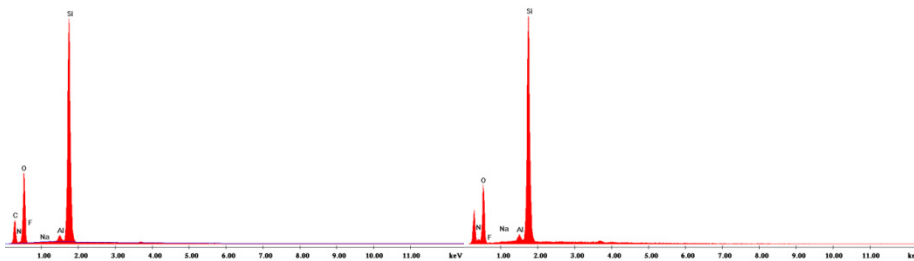
Figura 2.36. Imaginea SEM (a) și spectrul EDX (b) al alcalazei imobilizate prin entrapare în sol-gel obținut din precursorul TMOS

Imaginea SEM a alcalazei entrapate în matrici de sol-gel formate din TMOS prezintă existența unor nanoparticule în blocuri compacte neregulate, ceea ce a determinat blocarea accesului substratului la centrul catalitic al enzimei și astfel scăderea activității (Figura 2.36 a). Principalele elemente care apar în spectrul EDX (Figura 2.36 b) sunt siliciul, oxigenul, carbonul, azotul provenit probabil din enzimă, precum și sodiu și fluor din catalizatorul care a fost utilizat la imobilizare.



(a) DMDMOS:TMOS, raport molar 1:1

(b) APrTMOS:TMOS, raport molar 1:1



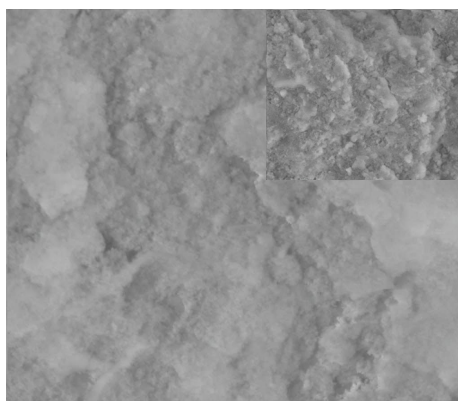
(c) DMDMOS:TMOS, raport molar 1:1

(d) APrTMOS:TMOS, raport molar 1:1

Figura 2.37. Imaginile SEM (a, b) și spectrele EDX (c, d) ale preparatelor cu alcalază imobilizată prin entrapare în sol-gel, pe bază de TMOS și DMDMOS, respectiv APrTMOS.

O posibilă explicație a scăderii activității preparatului enzimatic obținut cu APrTMOS:TMOS poate fi structura compactă a acestuia care determină blocarea enzimei în interiorul unor pori mai mici. Imaginea SEM (Figura 2.37 b) prezintă existența unor blocuri compacte neregulate comparativ cu preparatul obținut cu DMDMOS:TMOS (Figura 2.37 a) care prezintă o structură mai poroasă, ceea ce explică performanțele catalitice ridicate ale acestui biocatalizator. Principalele elemente care apar în spectrele EDX (Figura 2.37 c și 2.37 d) sunt siliciul, oxigenul, carbonul, azotul din structura enzimei, fluorul și sodiul provenite din catalizatorul utilizat (NaF). Se observă o creștere a conținutului de azot în cazul preparatului în

care s-a folosit APrTMOS, ceea ce arată prezența suplimentară a acestui element în structura silanului precursor.



(a)

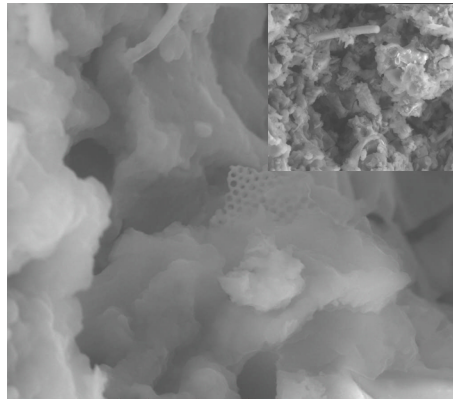


(b)

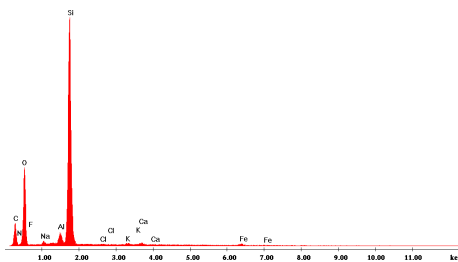
Figura 2.38. Imaginea SEM (a) și spectrul EDX (b) al alcalazei immobilizate în sol-gel obținut din precursorii VTMOȘ și TMOS în raport molar de 1:1

Figura 2.38 a) prezintă imaginea SEM a alcalazei entrapate în geluri derivate de VTMOȘ și TMOS în raport molar de 1:1. Suprafața este mult diferită față de preparatele prezentate anterior, având o structură amorfă cu pori foarte mici. Deși oferă o serie de informații utile, analiza structurală nu este suficientă pentru a se putea trage concluzii asupra activității și reproductibilității metodei de immobilizare, nepermițând localizarea enzimei în matricea de sol-gel. Din spectrul EDX (Figura 2.38 b) se observă prezența principalelor elemente: siliciu, oxigen, carbon și azot provenit din enzimă, precum și sodiu și fluor provenite din catalizatorul folosit la immobilizare.

Utilizarea metodei combinate de entrapare și adsorbție pe Celite 545 a dus la obținerea unei structuri diferite a preparatului, așa cum era de așteptat. Din imaginea SEM prezentată în Figura 2.39 a) se poate observa că zonele poroase alternează cu structuri sub formă de fagure, provenite din compoziția suportului de Celite. Structura este mai puțin aglomerată decât în cazul preparatului obținut prin entrapare simplă. Pe lângă componentele de bază ale matricii de sol-gel, acest preparat conține și aluminiu, constituent al suportului de Celite (Figura 2.39 b).



(a)



(b)

Figura 2.39. Imaginea SEM (a) și spectrul EDX (b) al alcalazei immobilizate prin metoda combinată de entrapare (DMDMOS și TMOS, raport molar 1:1) și adsorbție pe Celite 545

Scăderea activității preparatelor enzimatiche o dată cu creșterea concentrației de MeTMOS în rețeaua de sol-gel se poate datora structurii compacte, rezultând astfel blocarea enzimei în interiorul unor pori mai mici. Imaginea SEM a preparatului obținut prin immobilizarea alcalazei în matrice derivate de MeTMOS:DMDMOS:TMOS în raport molar de 0,9:0,1:1 este prezentată în Figura 2.40 b. Se observă o structură formată din blocuri compacte neregulate, care se diferențiază mult de cea formată cu aceiași silani la un raport molar de 0,3:0,7:1, aceasta având o structură mult mai poroasă (Figura 2.40 a).

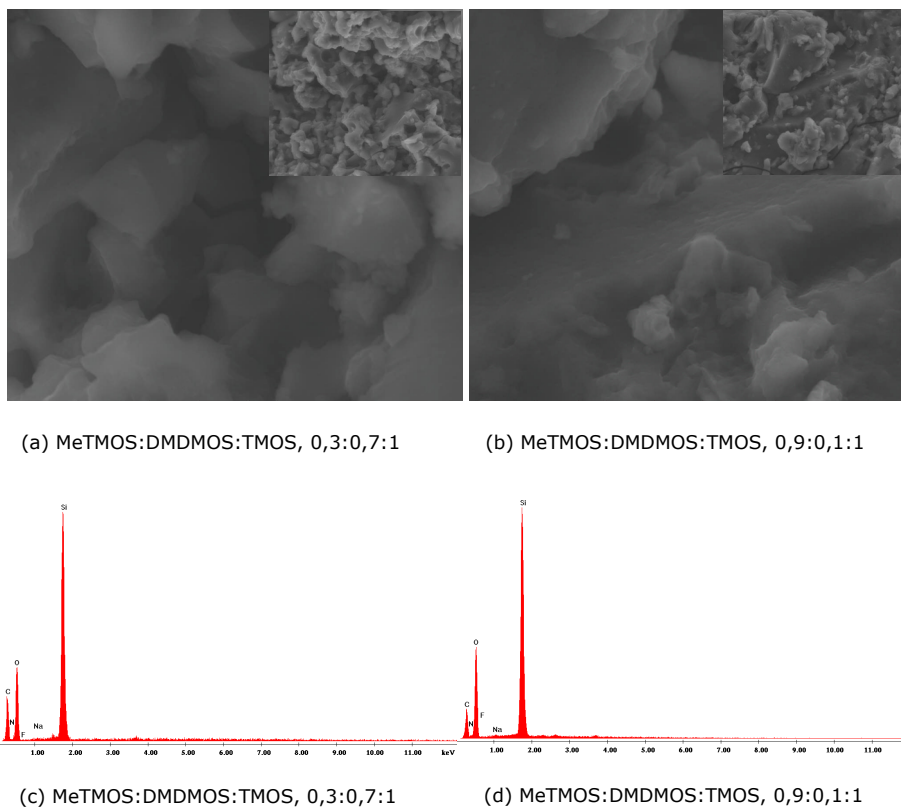


Figura 2.40. Imaginile SEM (a, b) și spectrele EDX (c, d) ale preparatelor cu alcalază imobilizată prin entrapare în sol-gel, pe bază de MeTMOS:DMDMOS:TMOS la diferite rapoarte molare

În Tabelul 2.35 sunt prezentate rezultatele analizei calitative ale principalelor elemente identificate în preparatele enzimatiche supuse acestei investigații structurale. Ele confirmă prezența componentelor utilizate în cursul procesului de imobilizare, ceea ce arată faptul că rămân parțial înglobate în xerogelul obținut. Astfel, toate preparatele conțin carbon, oxigen și siliciu, componente de bază ale matricii de sol-gel. Prezența aluminiului este observată și în preparatele obținute prin entrapare simplă, nu doar în cel obținut prin metoda combinată. Catalizatorul adăugat pentru polimerizare (NaF) nu a fost în totalitate eliminat în procesul de spălare (o parte rămânând probabil în pori), fapt confirmat de prezența elementelor în xerogel. Prezența enzimei în preparat poate fi demonstrată de prezența elementului azot în elementele identificate.

Tabelul 2.35. Analiza SEM-EDX a unor preparate de alcalază imobilizată prin metoda sol-gel și metoda combinată

Silani precursori (raport molar)	Suport solid	Compoziția elementară (%)						
		C	N	O	F	Na	Si	Al
TMOS	-	29,2	3,2	43,8	0,21	0,18	23,3	-
DMDMOS:TMOS (1:1)	-	35,9	3,0	37,4	0,22	0,04	22,6	0,81
APrTMOS:TMOS (1:1)	-	38,2	9,4	44,5	0,36	0,12	43,7	1,57
VTMOS:TMOS (1:1)	-	35,1	2,6 7	36,0	0,25	0,08	25,9	-
MeTMOS:DMDMOS :TMOS (0,3:0,7:1)	-	44,6	2,8 4	34,0	0,26	0,2	18,1	-
MeTMOS:DMDMOS :TMOS (0,9:0,1:1)	-	35,6	3,5 7	40,6	0,1	0,3	19,9	-
DMDMOS:TMOS, 1:1	Celite 545	33,6	2,9 7	37,9	0,28	0,56	22,4	1,31

Intensitatea picurilor din spectrul EDX permite și o evaluare semicantitativă a elementelor prezente în preparatele enzimactice. Valorile obținute pentru preparatele analizate sunt prezentate în Tabelul 2.35. În cazul preparatelor obținute prin metoda combinată, ar trebui să avem un conținut de carbon considerabil mai mic decât în cazul celor imobilizate prin entrapare, datorită prezenței suportului de Celite. De aici rezultă că sol-gelul este adsorbit pe suprafața suportului de Celite și nu în interiorul porilor, îmbunătățind astfel accesul reactanților la enzimă. Datele obținute prin această metodă sunt doar estimative deoarece distribuția elementelor în preparat este neuniformă, depinzând de zona care a fost analizată.

2.5.2. Spectroscopia FTIR

Spectroscopia IR este una dintre cele mai cunoscute și mai folosite metode de analiză a structurii secundare a polipeptidelor și proteinelor.

Deoarece alcalaza nativă este soluție apoasă, spectrul IR a fost realizat prin tehnica ATR. Aceasta prezintă un spectru caracteristic proteinelor (Figura 2.41), benzile cele mai importante fiind atribuite grupării amidice (CONH). În domeniul $3400-3200\text{ cm}^{-1}$ apare banda corespunzătoare vibrațiilor de valență N-H. În cazul nostru această bandă apare la 3257 cm^{-1} . Între $1690-1600\text{ cm}^{-1}$ apare banda corespunzătoare vibrațiilor de valență C=O. În cazul alcalazei, această bandă apare la 1645 cm^{-1} . Între $1575-1480\text{ cm}^{-1}$ apare banda corespunzătoare vibrațiile de valență C-N amidice și vibrațiilor de deformare în plan ale grupării N-H [178]. Datorită vibrațiilor catenelor laterale și a legăturilor de hidrogen din proteină, apare un grup complex benzi între $1450-1200\text{ cm}^{-1}$. Dintre benzile care apar datorită prezenței grupărilor din catenele laterale ale aminoacizilor se pot menționa: banda de la 2940 cm^{-1} datorată vibrației de valență a grupării CH_3 și cele de la 1037 cm^{-1} și 1107 cm^{-1} .

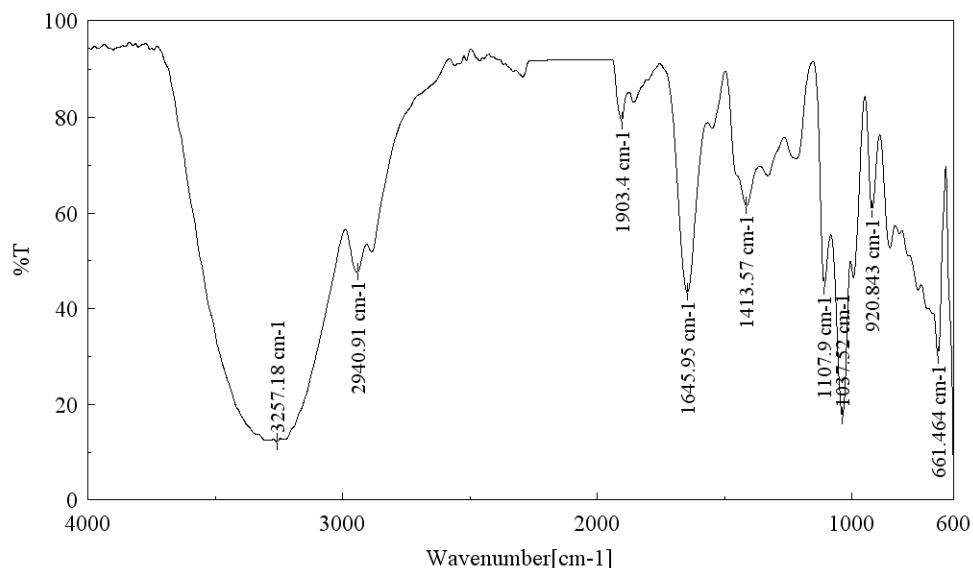


Figura 2.41. Spectrul IR al alcalazei native

Preparatele enzimice imobilizate de alcalază au fost caracterizate prin spectroscopie de IR, pentru comparație fiind realizat spectrul gelului martor fără enzimă. Aceste spectre au fost realizate prin tehnica de transmisie, în pastilă de KBr. Benzile caracteristice compușilor cu siliciu sunt următoarele: $3700\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ (Si-OH, de valență), $1275\text{--}1260\text{ cm}^{-1}$ (Si-CH₃, deformare în plan simetrică), $1110\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ (Si-O-CH₃, valență asimetrică), $850\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ (Si-O-CH₃, valență simetrică), 765 cm^{-1} (Si-CH₃, valență) [179].

Se poate observa că spectrul corespunzător preparatului enzimatic obținut cu silanii precursori DMDMOS și TMOS în raport molar de 1:1 prezintă aceste benzi la $3700\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ (bandă largă), 1264 cm^{-1} , 1084 cm^{-1} , 806 și 849 cm^{-1} (Figura 2.42). Nu se observă diferențe semnificative între benzile din spectrul sol-gelului martor și cel al preparatului enzimatic, cu excepția benzii de la 1654 cm^{-1} atribuită vibrației de valență a grupării C=O amidice. Intensitatea acesteia este însă scăzută datorită concentrației scăzute a enzimei din matricea de sol-gel. De asemenea, mai apar două benzi slabe ca intensitate la 1541 cm^{-1} și 1406 cm^{-1} care au fost atribuite vibrațiilor de deformare în plan ale grupării N-H, respectiv vibrațiilor catenelor laterale din structura proteinei.

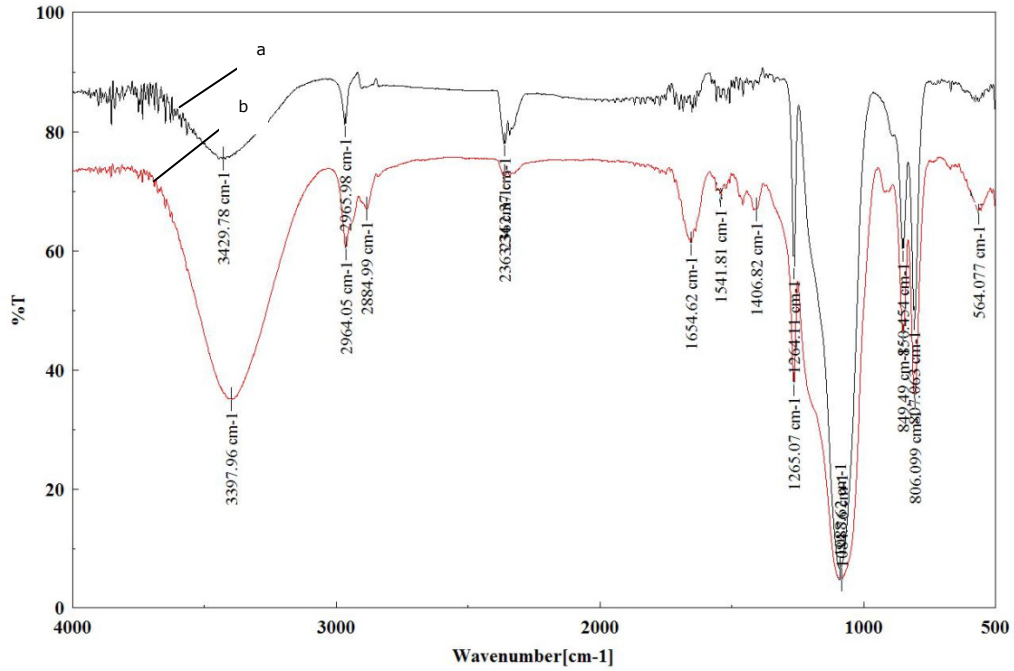


Figura 2.42. Spectrele IR pentru: **a.** matricea sol-gel martor formată din DDMOS:TMOS, 1:1; **b.** preparatul enzimatic obținut prin entraparea alcalazei în sol-gel cu DDMOS:TMOS, 1:1

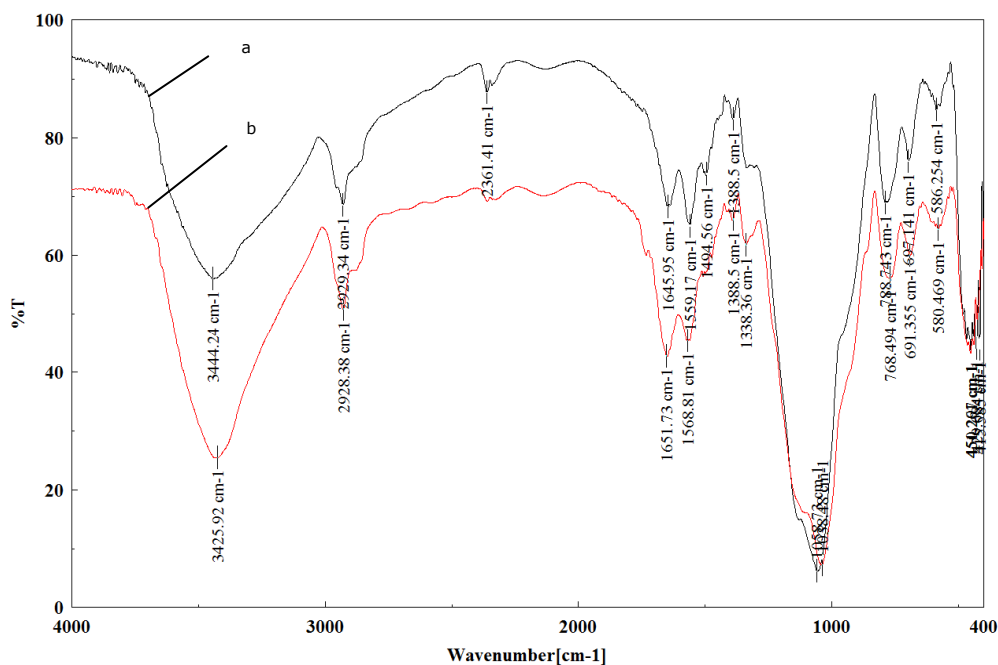


Figura 2.43. Spectrele IR pentru: **a.** matricea sol-gel martor formată din AP_rTMOS:TMOS, 1:1; **b.** preparatul enzimatic obținut prin entraparea alcalazei în sol-gel cu AP_rTMOS:TMOS, 1:1

S-a studiat de asemenea spectrul IR al preparatului enzimatic care a prezentat activitate minimă în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe, obținut cu silanii precursori AP_rTMOS și TMOS în raport molar de 1:1. Se poate observa că în spectrul sol-gelului martor apar două benzi la 1651 cm⁻¹ și 1568 cm⁻¹ care nu pot fi atribuite grupării amidice a enzimei (Figura 2.43). Acestea sunt benzile corespunzătoare vibrației de deformare a legăturii N-H corespunzătoare aminelor primare care apar în domeniul 1640-1560 cm⁻¹. În cazul preparatului enzimatic, banda de la 1651 cm⁻¹ se intensifică datorită probabil suprapunerii cu cea corespunzătoare grupării C=O amidice din enzimă.

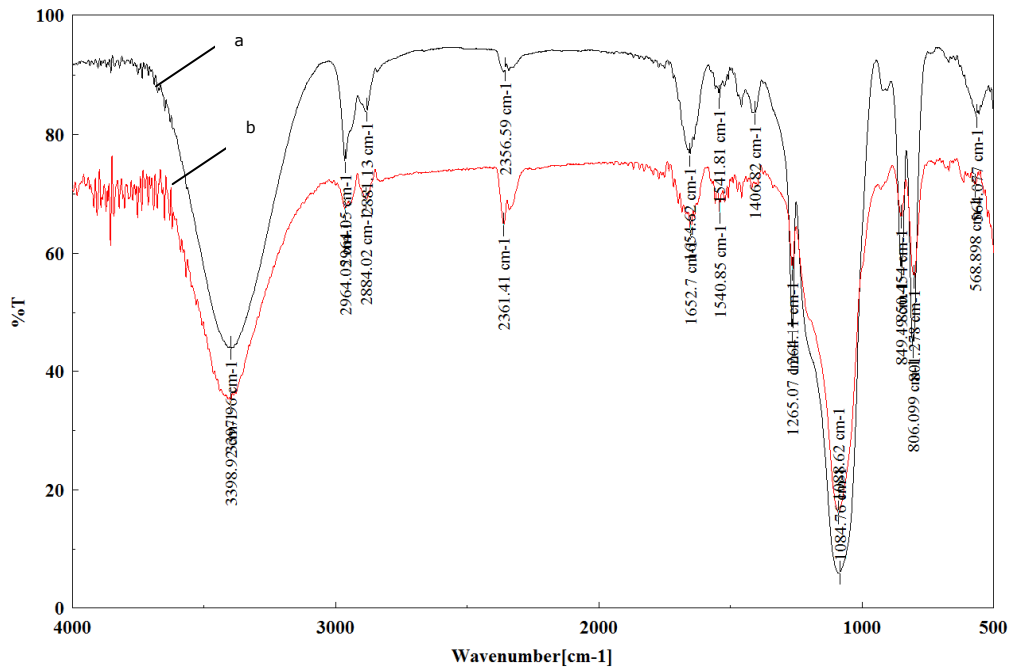


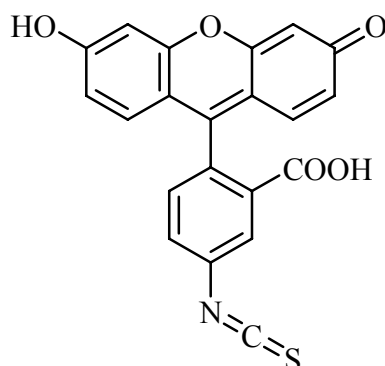
Figura 2.44. Spectrele IR pentru preparatele obținute prin: **a.** entrapare în sol-gel cu DMDMOS:TMOS, 1:1; **b.** entrapare în sol-gel cu DMDMOS:TMOS, 1:1 urmată de depunere pe Celite 545

În cazul în care pentru imobilizare s-a utilizat metoda de entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (Figura 2.44), spectrul IR nu prezintă nici o diferență față de cel al preparatului obținut doar prin entrapare simplă cu aceiași silani precursori (DMDMOS și TMOS). Acest lucru demonstrează faptul că sol-gelul s-a format într-adevăr și s-a depus pe suportul de Celite.

2.5.3. Microscopia cu fluorescență

Microscopia cu fluorescență a fost folosită pentru a studia distribuția enzimei în interiorul matricei de sol-gel. În acest studiu, alcalaza a fost marcată cu un fluorocrom (isotiocianat de fluoresceină) înainte de imobilizare.

Isotiocianatul de fluoresceină (FITC) este un compus format dintr-o moleculă de fluoresceină funcționalizată cu o grupare isotiocianat reactivă ($-N=C=S$) la unul dintre atomii de hidrogen ai inelului din partea de jos a structurii.



isotiocianat de fluoresceină (FITC)

Acest derivat este folosit foarte des pentru marcarea proteinelor. Gruparea isotiocianat reacționează cu grupările amino primare, sulfhidril, imidazoil, tirozil sau carbonil din structura proteinelor, peptidelor și a altor biomolecule. Cu toate acestea, doar derivații formați cu amine primare (de exemplu: lizina) sunt stabili.



Figura 2.45. Reprezentarea schematică a complexului enzimă-FITC

Pentru comparație, s-au realizat trei experimente control în care complexul alcalază-FITC a fost înlocuit cu: alcalază liberă, apă distilată sau fracțiunea FITC eluată la același volum de retenție cu alcalaza.

În continuare se va discuta influența naturii, precum și raportului molar al silanilor precursori asupra distribuției enzimei în preparatele enzimatice studiate. Acest parametru va fi corelat cu activitatea biocatalizatorului în reacția de amidare a dipeptidei model.

Imaginea fluorescentă a complexului alcalază-FITC imobilizat în matrici de DMDMOS și TMOS (raport molar de 1:1) este reprezentată în Figura 2.46 a). Distribuția uniformă a agentului de marcarea (FITC) indică o distribuție uniformă a enzimei în matricea de sol-gel. Preparatele control, obținute cu aceeași silani precursori, sunt reprezentate în Figura 2.46 b), c) și d). Doar complexul alcalaza-FITC prezintă fluorescență, lucru confirmat de absența acesteia în preparatele realizate pentru control.

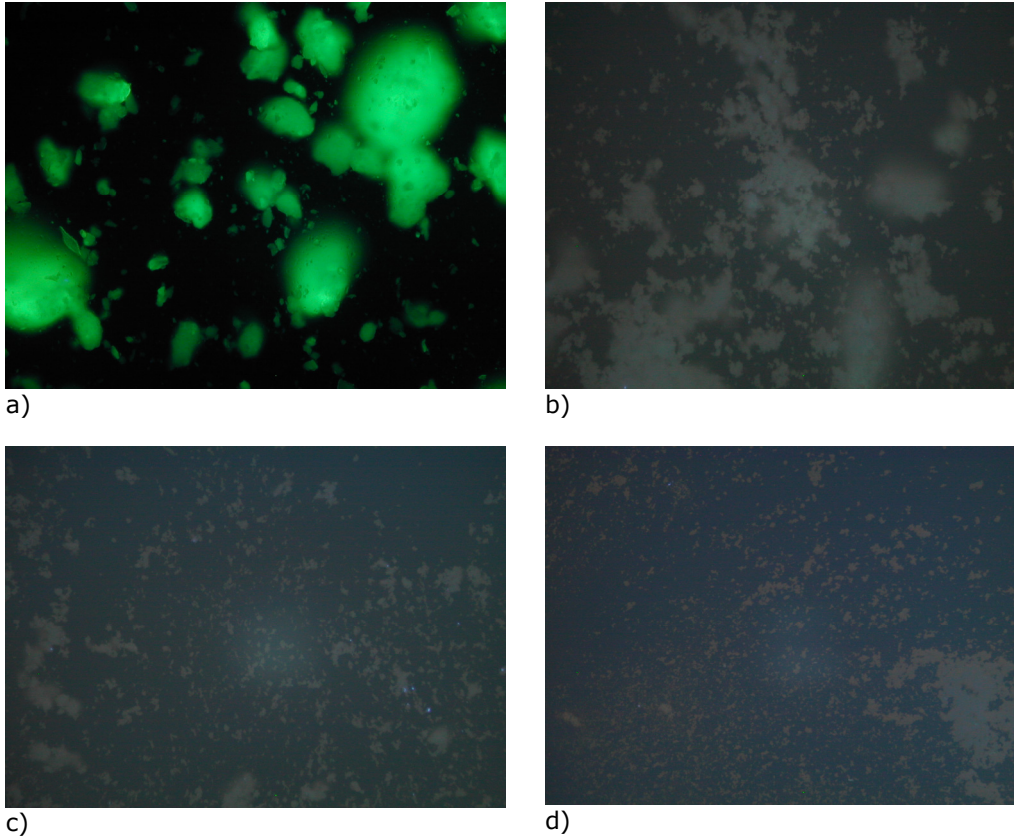


Figura 2.46. Imaginile fluorescente ale preparatelor enzimatiche obținute cu DMDMOS:TMOS (raport molar, 1:1): a) alcalază-FITC; b) alcalază; c) FITC (fracțiunea eluată la același volum de retenție cu alcalaza; d) gel martor (fără enzimă)

Imaginea fluorescentă a complexului alcalază-FITC imobilizat în matrici de APrTMOS și TMOS (raport molar de 1:1) este reprezentată în Figura 2.47 a). Nu există diferențe semnificative în ceea ce privește fluorescența celor două preparate enzimatiche obținute cu DMDMOS:TMOS, respectiv APrTMOS:TMOS (raport molar, 1:1). Particulele celui din urmă sunt formate din blocuri mai compacte. În concluzie, diferența de activitate dintre cele două preparate enzimatiche (discutată în capitolul 2.3.4) nu este dată de distribuția enzimei în interiorul matricii de sol-gel, ci probabil de morfologia acestora.

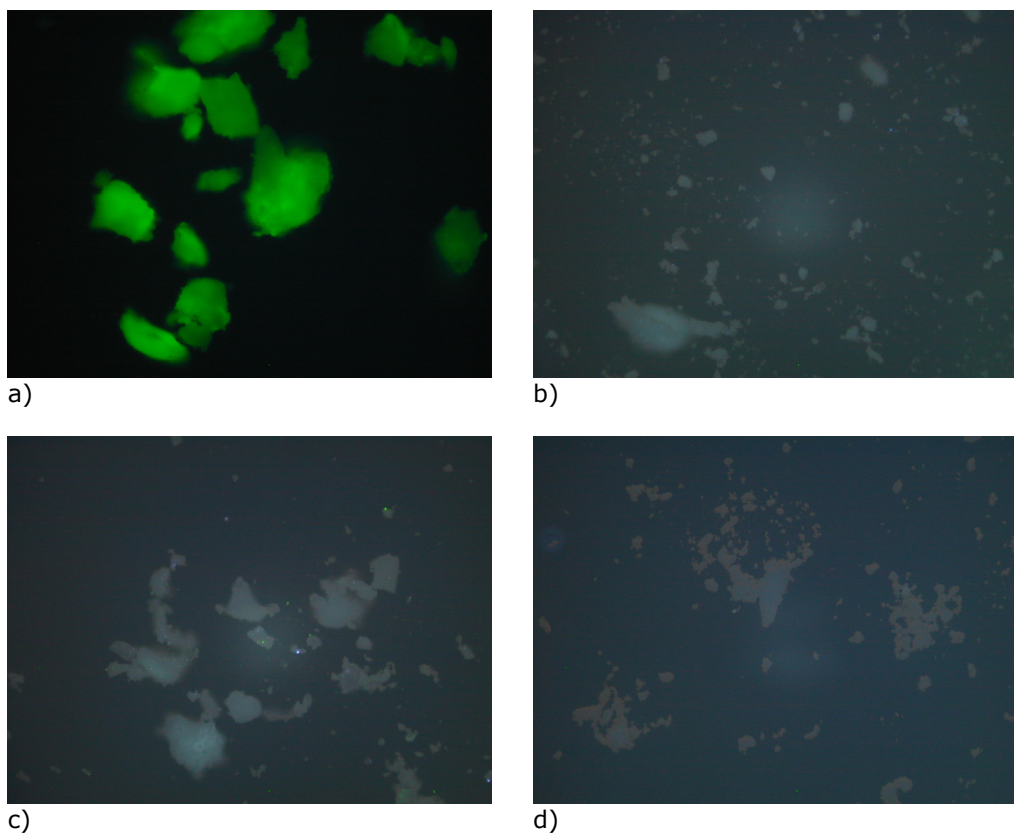


Figura 2.47. Imaginile fluorescente ale preparatelor enzimatiche obținute cu AP_rTMOS:TMOS (raport molar, 1:1): a) alcalază-FITC; b) alcalază; c) FITC (fracțiunea eluată la același volum de retenție cu alcalaza; d) gel martor (fără enzimă)

Influența raportului molar al silanilor precursori asupra distribuției alcalazei în interiorul matricei de sol-gel a fost realizată pentru preparatele obținute cu MeTMOS:DMDMOS:TMOS, în raport molar de 0,3:0,7:1 (Figura 2.48), respectiv 0,9:0,1:1 (Figura 2.49). Și în acest caz fluorescența a fost totală pentru cele două preparate, confirmând astfel distribuția uniformă a enzimei în suportul de imobilizare. Creșterea concentrației de MeTMOS a determinat obținerea unor particule compacte de dimensiuni mai mari.

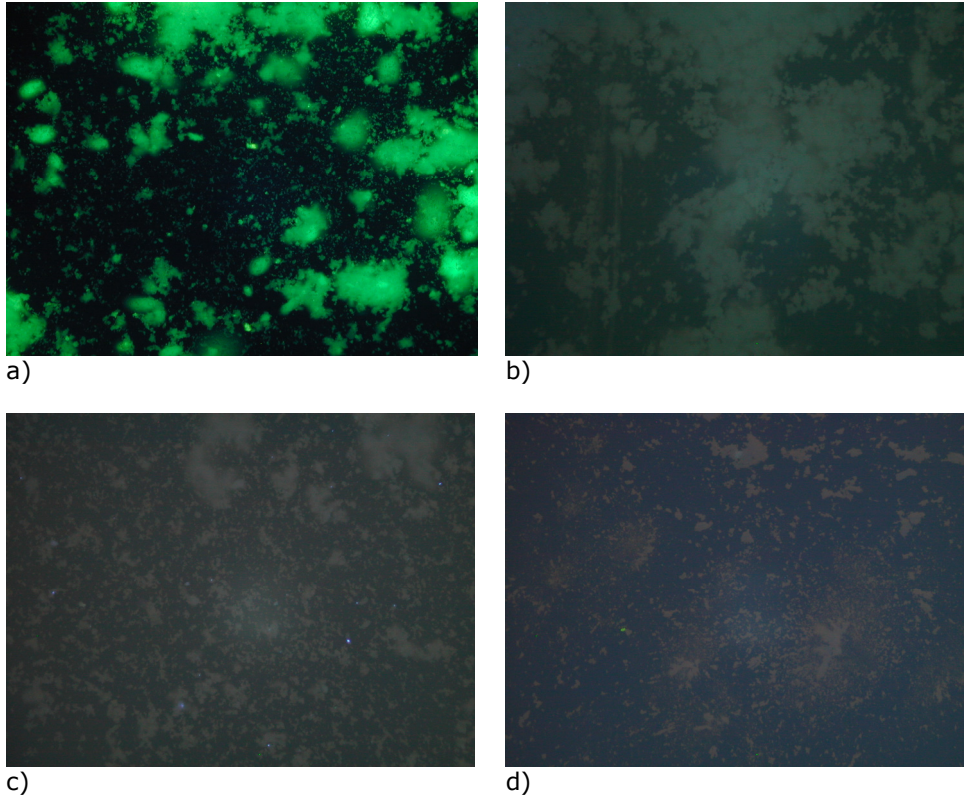
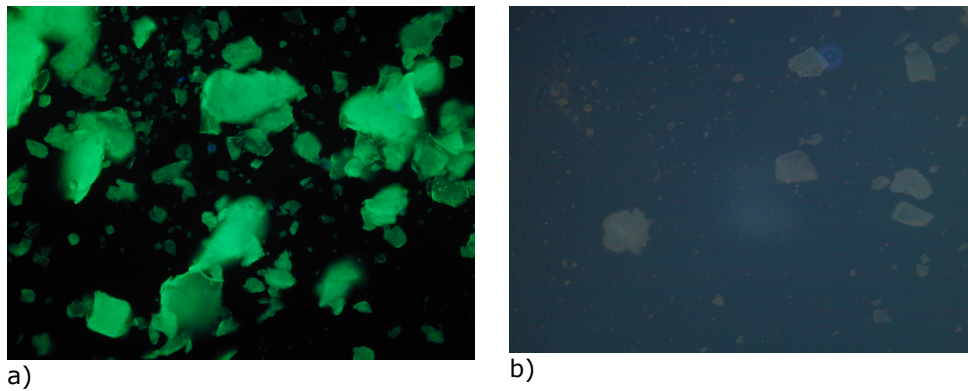


Figura 2.48. Imaginile fluorescente ale preparatelor enzimatiche obținute cu MeTMOS: DMDMOS:TMOS (raport molar, 0,3:0,7:1): a) alcalază-FITC; b) alcalază; c) FITC (fracțiunea eluată la același volum de retenție cu alcalaza; d) gel martor (fără enzimă)



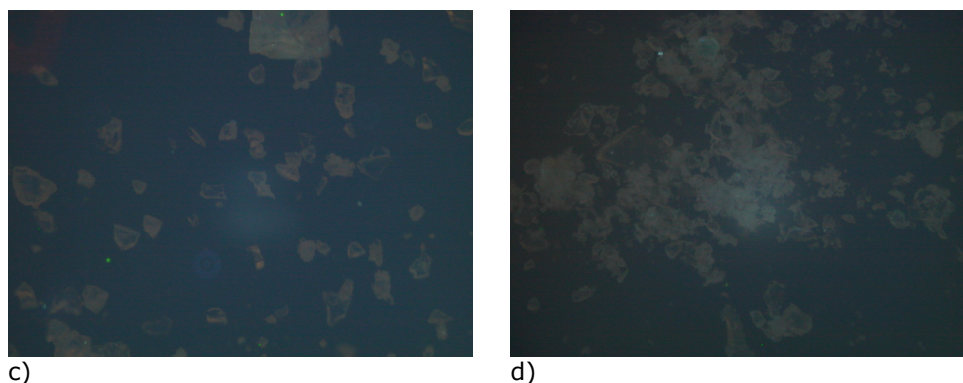


Figura 2.49. Imaginile fluorescente ale preparatelor enzimatiche obținute cu MeTMOS: DMDMOS:TMOS (raport molar, 0,9:0,1:1): a) alcalază-FITC; b) alcalază; c) FITC (fracțiunea eluată la același volum de retenție cu alcalaza; d) gel martor (fără enzimă)

2.5.4. Concluzii parțiale

Imaginile SEM oferă informații utile despre microstructura, porozitatea și textura preparatelor enzimatiche analizate. Creșterea densității grupărilor metil a dus la obținerea unor structuri formate din blocuri compacte neregulate, mai puțin poroase. Utilizarea metodei combinate de entrapare și adsorbție pe Celite 545 a dus la o structură total diferită a preparatului enzimatic, imaginea SEM prezintă zone poroase ce alternează cu structuri sub formă de fagure.

Rezultatele analizei cantitative confirmă prezența componentelor utilizate în cursul procesului de imobilizare și în preparatul rezultat după spălare și uscare, ceea ce dovedește faptul că ele rămân parțial înglobate fizic sau chimic în xerogelul obținut.

Spectroscopia FTIR este o metodă utilă pentru confirmarea structurii preparatelor obținute prin metoda sol-gel și prin metoda combinată, prezența enzimei fiind demonstrată de banda caracteristică grupării amidice. În cazul metodei combinate, gelul format se depune pe suprafața suportului solid, fapt demonstrat de identitatea spectrelor celor două preparate enzimatiche.

Vizualizarea enzimei în interiorul matricei de sol-gel s-a realizat prin legarea enzimei de un fluorocrom (izotiocianatul de fluoresceină), entraparea complexului enzimă-FITC și folosirea microscopiei de fluorescență pentru a localiza enzima în interiorul matricei de sol-gel. Imaginile de fluorescență au demonstrat o distribuție uniformă a enzimei în interiorul matricei de sol-gel, indiferent de natura silanilor precursori utilizați la imobilizare.

3. PARTEA EXPERIMENTALĂ

3.1. Metode de imobilizare a enzimelor

Materiale

În studiile de imobilizare s-au utilizat: tetrametoxisilan TMOS 98%, propiltrimetoxisilan PrTMOS 98%, viniltrimetoxisilan VTMOs 98%, octiltrimetoxisilan OctTMOS 97% 3-aminopropiltrimetoxisilan APTMOS 97%, feniltrimetoxisilan PhTMOS 97%, (Alfa Aesar Brunswig Chemie, Olanda), tetraetoxisilan TEOS 98% (Fluka), dimetildimetoxisilan DMDMOS 96% (Fluka), metilfenildimetoxisilan MPDMOS 95% (Aldrich), *iso*-butiltrimetoxisilan *i*-BuTMOS, 97% (Brunswig), polietilenglicol PEG 20000 4% (Sigma Aldrich), fluorură de sodiu (Sigma Aldrich), alcool izopropilic (Sigma Aldrich), Celite 545 (Merck), Celite 521 (Aldrich), Celite C22 (Loba Chemie), *n*-hexan 98% (Merck).

Enzimele folosite au fost: subtilizina A din *Bacillus licheniformis* (Sigma Aldrich), alcalaza-CLEA (CLEA-Technologies, Delft, The Netherlands), alcalaza 2,4L FG și alcalaza 2,5L DX (Novozymes).

3.1.1. Imobilizarea enzimelor prin entrapare în sol-gel

Metoda generală

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus diferite cantități de protează (300, 500, 780, 1000 μ l soluție), 200 μ l PEG 20000 4%, 100 μ l NaF 1M și 200 μ l alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menținut 5 minute pe agitatorul magnetic pentru omogenizare, după care s-au introdus precursorii silanici (6 mmoli) la diferite rapoarte molare, menținându-se agitatea până în faza inițială a formării gelului. Gelul obținut a fost păstrat în frigider timp de 24 de ore pentru o polimerizare completă, apoi a fost spălat cu 10 ml apă deionizată, 5 ml alcool izopropilic și 5 ml hexan. Preparatul obținut s-a uscat la temperatura camerei timp de 48 de ore [180, 181]. Conținutul de proteine din apele de spălare a fost determinat utilizând metoda Bradford.

3.1.2. Imobilizarea enzimelor prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție

Metoda generală

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 780 μ l soluție protează, 200 μ l PEG 20000 4%, 100 μ l NaF 1M și 200 μ l alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menținut 5 minute pe agitatorul magnetic pentru omogenizare, după care s-au introdus precursorii silanici (DMDMOS:TMOS, 6 mmoli) în raport molar de 1:1, menținându-se agitatea până în faza inițială a formării gelului, moment în care s-a introdus 0,5 g suport solid. Gelul obținut a fost păstrat în frigider timp de 24 de ore pentru o polimerizare completă, apoi a fost spălat cu 10 ml apă deionizată, 5 ml alcool izopropilic și 5 ml hexan. Preparatul obținut s-a uscat la temperatura camerei timp de 48 de ore.

Conținutul de proteine din apele de spălare a fost determinat utilizând metoda Bradford.

3.2. Metode de analiză

3.2.1. Metoda Bradford de determinare a proteinelor

Dozarea proteinelor în soluție (domeniul 0,1-1,4 mg/ml, folosind BSA ca standard) se bazează pe formarea unui complex în urma reacției proteinei din soluție cu reactivul de culoare Brilliant Blue G. Maximul de absorbție al complexului proteină-Brilliant Blue G este în domeniul 465-595 nm. Reactivul Bradford nu necesită diluție, folosindu-se microplăcuțe speciale pentru determinarea proteinelor.

Etalonarea soluției de BSA prin metoda Bradford

Materiale

Pentru acest studiu s-au folosit următoarele: albumină serică bovină 2 mg/ml și reactiv Bradford (Sigma Aldrich).

Mod de lucru

S-au realizat soluții de albumină serică bovină (BSA) de diferite concentrații în apă deionizată (0,15-1,2 mg/ml). S-au luat câte 5 μl din aceste soluții și s-au introdus în microplăcuțele corespunzătoare, adăugându-se apoi 250 μl reactiv Bradford. Probele obținute au fost menținute la temperatura camerei timp de 10 minute, apoi s-a citit extincția la 595 nm față de un martor obținut în aceleași condiții, dar cu înlocuirea soluției de BSA cu apă deionizată. Pentru siguranța determinării probele au fost realizate în duplicat. Determinările s-au efectuat cu ajutorul unui spectrofotometru Safire (Tecan Benelux BVBA, Giessen, the Netherlands). S-a reprezentat grafic extincția în funcție de cantitatea de proteină. Această reprezentare este de forma unei drepte cu ecuația:

$$E = b \cdot C_p$$

unde:

E – extincția

b – panta dreptei

C_p – cantitatea de proteină (mg/ml)

Determinarea conținutului de proteine

Mod de lucru

Pentru aceste determinări s-au folosit microplăcuțe cu 96 de poziții în care s-au introdus 5 μl soluție de probă necunoscută și 250 μl reactiv Bradford. Proba a fost menținută la temperatura camerei timp de 10 minute, apoi s-a citit extincția la 595 nm față de un martor obținut în aceleași condiții, dar cu înlocuirea probei cu apă deionizată. Pentru siguranța determinării probele au fost realizate în duplicat. Concentrația de proteină din probă s-a determinat cu formula:

$$C = \frac{1}{b} \cdot E \cdot d \quad (\text{mg/ml})$$

unde:

d – diluția probei

Cantitatea de proteină imobilizată s-a calculat prin diferența dintre cantitatea de proteină supusă imobilizării și cea regăsită în apele de spălare. Randamentul de imobilizare s-a calculat prin raportarea cantității de proteină imobilizată la cea inițială.

$$\eta_{\text{imobilizare}} = (\text{cantitate proteine imobilizate} / \text{cantitate totală proteine}) \times 100 (\%)$$

3.2.2. Analiza cromatografică de lichide de înaltă performanță (HPLC)

Determinările cromatografice au fost efectuate pe un HPLC (Waters) cu fază inversă (RP), echipat cu un detector UV cu șir de diode, autosampler și coloană Atlantis T3 3 μm, 2,1 mm x 100 mm (Waters). Analizele au fost efectuate la 220, 256 sau 280 nm. Compușii au fost eluați cu acetonitril conținând 0,1% acid trifluoracetic (TFA) cu un gradient de la 2% la 98%. Debitul folosit a fost de 0,5 ml/minut.

Pentru etalonarea compușilor analizați s-au realizat soluții standard de diferite concentrații, reprezentându-se grafic aria picului respectiv în funcție de concentrație. Această dependență este liniară de forma $y = bx$. În Tabelul 3.1 se pot observa parametrii dreptelor de etalonare pentru compușii studiați.

Tabelul 3.1. Parametrii dreptelor de etalonare

Nr. crt.	Compus	b	λ (nm)
1	Z-Ala-Phe-OtBu	681054	220
2	Z-Val-Leu-OtBu	340360	220
3	Z-Val-Met-OtBu	468411	220
4	Z-Val-Gln-OtBu	351211	220
5	Z-Val-Asn-OtBu	321764	220
6	Z-Val-Tyr-OtBu	4000000	220
7	Z-Val-Ser-OtBu	283622	220
8	Z-Val-Ala-OtBu	299159	220
9	Z-Val-Phe-OtBu	824970	220
10	Z-Val-Lys(Boc)-OtBu	335690	220
11	Z-Ala-Phe-Ala-OtBu	1000000	220
12	Boc-Ala-Asp(OtBu)-Trp-Phe-OtBu	2000000	280
13	Boc-Gly-Phe-Phe-Leu-OtBu	2000000	220
14	Boc-Gly-Phe-Met-Pro-Phe-Trp-OtBu	2000000	280
15	Z-Ala-Phe-OMe	711352	220
16	Z-Ala-Phe-NH ₂	785326	220
17	Z-Ala-Phe-OH	782891	220

Cu ajutorul acestor parametri se poate calcula concentrația de substrat consumat, precum și cea de produs format în reacție:

$$C = \frac{1}{b} \cdot A \cdot d \text{ (mM)}$$

unde:

A - aria picului cromatografic

d - diluția probei

3.2.3. Electroforeza proteinelor pe gel de poliacrilamidă

Electroforeza se folosește pentru a estima gradul de dizolvare a unei proteine în gradient, pe o coloană cu schimb de ioni, pentru a stabili numărul proteinelor prezente într-un amestec sau pentru a le separa pe baza mărimii și greutatei moleculare, folosind geluri SDS (dodecilsulfat de sodiu). SDS îmbracă proteina în așa fel încât atunci când aceasta este încălzită și denaturată, polipeptida va fi complet îmbrăcată de SDS și nu mai are sarcină electrică naturală. Toate proteinele migrează cu aceeași rată cu excepția situației în care gelul are pori de dimensiune mică, care restricționează migrarea acestor molecule, în așa fel încât ele se vor separa pe baza mărimii lor și nu a sarcinii electrice. Electroforeza în gel de poliacrilamidă, în condiții denaturante (în prezența dodecilsulfatului de sodiu, SDS, 0,1%) este o tehnică de separare a proteinelor pe baza masei lor moleculare. Astfel, moleculele de mărimi diferite se vor separa formând benzi distincte în interiorul gelului.

Mod de lucru

Electroforeza pe gel de poliacrilamidă (PAGE) a fost realizată în sistem continuu cu SDS, în plan vertical. Pentru electroforeză s-au utilizat geluri prefabricate de poliacrilamidă de tipul NuPAGE® NOVEX® Bis-Tris Mini Gels (10%) furnizate de Invitrogen™. Tamponul folosit pentru migrarea moleculelor a fost preparat prin adăugarea a 40 ml tampon NuPAGE MES (acid 2-(N-morfolino)-etansulfonic) și 760 ml apă deionizată. Prepararea probelor a fost realizată în tuburi eppendorf de 1,5 ml în care s-au adăugat 6,5 μl probă, 2,5 μl tampon NuPAGE LDS (dodecilsulfat de litiu) și 1 μl NuPAGE agent reducător (2-mercaptoetanol). Probele au fost centrifugate câteva secunde pentru omogenizare și incubate timp de 10 minute la 95°C. În camera interioară a sistemului de electroforeză s-au adăugat 200 ml tampon NuPAGE SDS, iar în cea exterioară 600 ml din același tampon. Condițiile de migrare au constat în aplicarea unui voltaj de 200 V timp de 35 de minute. Sistemul de electroforeză utilizat în ambele cazuri a constat dintr-un aparat de electroforeză vertical. Evidențierea proteinelor în geluri s-a realizat prin colorare cu Coomassie Brilliant Blue R-250, protocolul folosit fiind o adaptare a celui utilizat de Novex sau prin colorare argentică („silver staining”) [182].

3.2.4. Analiza cromatografică de excluziune (SEC)

Cromatografia de excluziune este denumită și cromatografie pe gel (SEC), în care fenomenul principal este difuzia, iar separarea se face în funcție de mărimea efectivă a moleculelor componentelor. Cromatografia de excluziune (SEC) este folosită pentru separarea moleculelor în soluție pe baza maselor moleculare ale acestora. Această metodă este aplicată în general moleculelor mari, cum ar fi

proteine și polimeri industriali. Atunci când faza mobilă este o soluție apoasă, această tehnică este numită cromatografie de filtrare pe gel.

Mod de lucru

Purificarea enzimelor studiate a fost efectuată pe un cromatograf AKTA Purifier echipat cu detector UV și coloană Superdex 200 PG (Amersham). Detecția componentelor s-a realizat la 280 nm. Pentru calibrare s-au folosit soluții standard de proteine cu diferite mase moleculare: catalază (M = 232 kDa), aldolază (M = 158 kDa), BSA (M = 67 kDa), ovalbumină (M = 43 kDa) și ribonuclează (M = 13,7 kDa). Blue dextranul (2000 kDa) a fost folosit pentru determinarea volumului mort ($V_0 = 8,14$ ml) al coloanei. Eluția componentelor s-a realizat cu tampon fosfat de pH 6,0, 0,15 M NaCl, debitul fiind de 0,5 ml/min (Figura 3.1 și Figura 3.2).

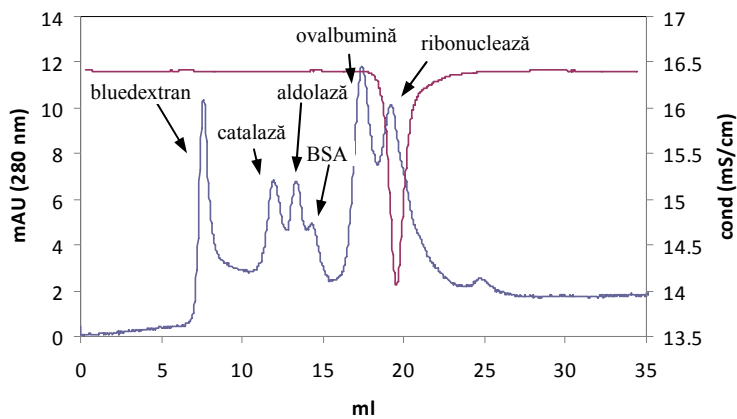


Figura 3.1. Cromatograma amestecului standard de proteine

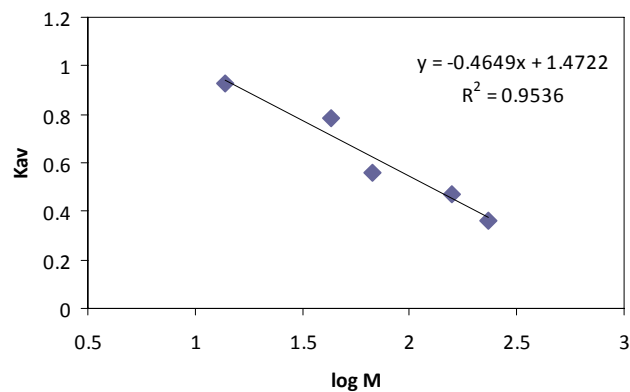


Figura 3.2. Caracteristica de etalonare a soluției standard de proteine realizată prin cromatografia de excluziune

S-a citit absorbanta fracțiunilor colectate la 280 nm. Masa moleculară a proteinelor s-a calculat prin reprezentarea grafică a coeficientului de partiție ca

funcție de logaritmul masei moleculare corespunzător standardelor. Ecuația a fost utilizată pentru determinarea maselor moleculare ale proteinelor necunoscute.

Coeeficientul de partiție (K_{av}) poate fi exprimat ca:

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

unde:

V_e – volumul de eluție al proteinei necunoscute

V_0 – volumul de eluție al blue-dextranului (8,14 ml)

V_t – volumul de eluție al picului corespunzător conductivității obținut la sfârșitul eluției (20,81 ml)

3.2.5. Microscopia electronică de scanare (SEM) cuplată cu spectrometria de raze X cu dispersie de energie (EDX)

Microscopul electronic cu baleiaj (SEM) utilizează un fascicul focalizat de electroni de energie ridicată pentru a genera semnale diferite pe suprafața particulelor solide. Semnalele produse în urma interacțiunilor electron-probă dezvăluie informații despre morfologia (textura) probei, compoziția chimică și structura cristalină a acesteia.

Tehnicile de lucru folosite sunt:

- în vid înaintat (High-vacuum mode) (10^{-5} mbar) folosit pentru imagistica și microanaliza probelor conductoare și/sau probelor preparate convențional.
- în vid preliminar (Low-vacuum mode) (< 270 Pa) folosit pentru imagistica și microanaliza probelor fără preparare.

Imaginile SEM și spectrele EDX au fost realizate cu ajutorul unui microscop electronic de baleiaj Inspect S + Edax Genesis XM 2i (FEI Company, Olanda). Acest microscop conține trei lentile electromagnetice prealiniat răcite cu aer, coloană optimizată pentru rezoluție înaltă și curent de fascicul mare cu o singură deschidere pe lentila fixă. Elementele principale ale opticii electronice în cazul acestui echipament au fost:

- *sursa*: reprezentată printr-un filament de wolfram montat în ansamblul tun electronic de tip tetrodă;
- *tensiunea*: 200 V – 30 kV;
- *curentul fasciculului*: > 2 μ A;
- *rezoluția*: 3 nm pe specimenul standard cu particule de aur separate pe substrat de carbon, la 30 kV pentru ambele moduri de operare (10 nm la 3 kV în modul High-vacuum și <12 nm la 3 kV în modul Low-vacuum);
- *domeniul de focalizare*: 3-99 mm.
- *magnificația*: 6x – 1,000,000x cu afișare pe monitor standard LCD de 19”;
- *câmpul de vizualizare*: identic în High și Low-vacuum (18 mm la cea mai mare distanță de lucru).

Mod de lucru – imagistică calitativă

Proba solidă (aproximativ 1-2 mg) așezată pe o bandă dublu adezivă de carbon a fost inițial pulverizată cu aer comprimat pentru evitarea contaminării coloanei electromagnetice, după care a fost introdusă în camera microscopului. S-a folosit modul vidului înaintat (High-vacuum), iar când presiunea a atins valoarea de

aproximativ $1,56 \cdot 10^{-2}$ Pa și curentul de emisie a ajuns la 100 μ A, s-a început scanarea (baleierea). Zonele de interes au fost aduse la magnificația corespunzătoare, obținându-se astfel imaginile SEM.

Mod de lucru – analiză semicantitativă prin spectrometrie de raze X cu dispersie de energie (EDX)

Spectrele EDX au fost realizate cu ajutorul spectrometrului fotoelectronic cu dispersie. Această tehnică constă în iradierea probei aflată într-un spațiu cu vid înaintat, cu radiații X, fotoelectronii emiși fiind separați în funcție de energiile lor cinetice într-un spectrometru fotoelectronic. Identificarea elementelor se face în funcție de valorile nivelelor energetice ale fotoelectronilor emiși. După identificarea elementelor în spectrul EDX, s-a realizat și cuantificarea acestora, obținându-se astfel informații despre compoziția semicantitativă.

3.2.6. Spectroscopia FTIR

Spectrele FTIR s-au înregistrat folosind spectrometrul Jasco FT/IR-410. Analizele IR s-au realizat în pastilă de KBr în cazul probelor solide.

3.2.7. Marcarea proteinelor cu fluorocromi

Izotiocianatul de fluoresceină este unul dintre cei mai recomandați fluorocromi pentru metoda anticorpilor și proteinelor fluorescente. Izotiocianații reacționează cu grupările aminice libere ale proteinelor, formând o legătură tiocarbamidică. În aceste reacții prezintă interes în special grupările aminice ale lizinei. Superioritatea izotiocianatului de fluoresceină față de izocianat constă nu numai în prepararea ușoară și conservarea mai bună, ci și în fluorescența de patru ori mai intensă a conjugatelor sale.

Materiale și aparatură

Pentru această procedură s-au folosit: alcalază 2,4L FG (Novozymes), 5(6)-izotiocianat de fluoresceină (Fluka), soluție tampon borat (50 mM, pH 8,5), soluție tampon fosfat (0,1 M, 0,15 M NaCl, pH 7,2), N,N-dimetilformamidă (Sigma Aldrich), Sephadex G-25 medium (Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Suedia), saci de dializă 25 mm (1,0 in) (Sigma-Aldrich), microscop inversat cu fluorescență Olympus IX70.

Mod de lucru

Purificarea enzimei s-a realizat prin dializă, în tampon borat de 50 mM, la pH 8,5. După dializă, cantitatea de proteine din probă a fost determinată prin metoda Bradford. Reacția de cuplare s-a realizat într-o eprubetă de sticlă prin incubarea a 3,5 ml soluție de alcalază rezultată la dializă (34 mg proteină/ml) și 1711,5 μ l soluție FITC, timp de o oră la temperatura camerei (conform PIERCE EZ-Label™ FITC Labeling Kit). Reacția s-a realizat la întuneric sub folie de aluminiu.

Numărului de mmoli de FITC a fost calculat cu relația:

$$n_{FITC} = V \cdot c \cdot 10 \cdot \frac{1}{M} \text{ (mmoli)}$$

unde:

n_{FITC} - numărul de moli de FITC necesari (mmoli);
 V - volumul soluției enzimaticice (ml);
 c - concentrația soluției enzimaticice (mg/ml);
 10 - excesul molar al FITC;
 M - masa moleculară a proteinei (mg/mmol).

Volumului de soluție de FITC s-a calculat cu relația:

$$V_{FITC} = n \cdot M \cdot 100 \text{ (}\mu\text{l)}$$

unde:

V_{FITC} - volumul soluției de FITC (μl);
 n - numărul de mmoli de FITC (mmoli);
 M - masa moleculară a FITC (mg/mmol);
 100 - volumul de DMF (μl) necesar pentru a dizolva 1 mg FITC;

Separarea FITC libere de cea legată de proteină s-a realizat pe coloană umplută cu Sephadex G-25. Eluția componentelor s-a realizat cu tampon fosfat 0,1 M, 0,15 M NaCl de pH 7,2. S-a citit absorbanta fracțiunilor colectate la 280 nm. La finalul separării, concentrația soluției de proteină legată a fost de 0,23 mg proteină/ml.

Soluția fluorescentă de proteină legată a fost concentrată prin liofilizare la -55°C timp de 34 de ore. În final, proba solidă a fost redizolvată în apă distilată, obținându-se o suspensie având concentrația de 6 mg proteină/ml. Această suspensie s-a folosit la imobilizare. Imaginile fluorescente au fost înregistrate cu ajutorul microscopului inversat cu fluorescență Olympus IX70.

3.2.8. Metoda spectrofotometrică de determinarea activității subtilizinei A native

Materiale și aparatură

În reacțiile de hidroliză s-au folosit: N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilidă (Sigma Aldrich), N,N-dimetilformamidă, (Sigma Aldrich), soluție tampon fosfat (10 mM pH 6.2) și soluție tampon PBS (20 mM fosfat și 0,15 M NaCl, pH 7,0). Determinările experimentale au fost realizate prin metoda colorimetrică folosindu-se spectrofotometrul UV-VIS (UV-1201 series, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Catalizator: subtilizina A nativă (Sigma Aldrich).

Mod de lucru

Într-o cuvă de plastic de 1 ml s-au adăugat 0,9 ml soluție tampon PBS 20 mM și 0,05 ml soluție N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilidă 10 mM. Amestecul de reacție a fost termostatat la 25°C timp de 5 minute, după care reacția a fost inițiată prin adăugarea a 0,05 ml soluție de enzimă (4 $\mu\text{g/ml}$). S-a urmărit creșterea în absorbanta la 412 nm timp de 10 minute față de un martor conținând aceeași concentrație de substrat.

Activitatea enzimatică a fost determinată pe baza vitezei inițiale de reacție conform următoarei relații:

$$\text{Activitatea} = (\Delta A) \cdot V \cdot 10^{-3} / t \cdot \varepsilon \cdot m \quad (\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}_{\text{enzimă}})$$

unde:

$\Delta A/t$ - viteza inițială de reacție (A.u./min)

ε - coeficientul molar de extincție al p-nitroanilidei ($8,9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

V - volumul de reacție (ml)

m - cantitatea de enzimă (mg)

3.3. Reacția de amidare enzimatică a Z-Ala-Phe-OMe

Materiale și aparatură

În reacțiile de amidare s-au folosit: Z-Ala-Phe-OMe (Bachem AG), carbamat de amoniu (99%, Sigma Aldrich), *t*-butanol (Sigma Aldrich), N,N-dimetilformamidă (Sigma Aldrich), acetonitril (Merck) și carusel pentru reacții paralele termostatat, prevăzut cu agitare magnetică (GreenHouse Plus™ Parallel Synthesizer; Radleys Discovery Technologies).

Catalizatori: proteaza alcalază 2,4L FG (Novozymes) nativă și imobilizată.

Determinările cromatografice au fost efectuate pe un HPLC (Waters) cu fază inversă (RP), echipat cu un detector UV cu șir de diode, autosampler și coloană Atlantis T3 3 μm , 2,1 mm x 100 mm (Waters). Analizele au fost efectuate la 220, 256 sau 280 nm. Compușii au fost eluați cu acetonitril conținând 0,1% acid trifluoracetic (TFA) cu un gradient de la 2% la 98%. Debitul folosit a fost de 0,5 ml/minut.

Conținutul de apă al amestecului de reacție a fost determinat prin titrare Karl-Fischer, folosindu-se titratorul K-F 720 KFS Titrino (Metrohm, Elveția).

Mod de lucru

Condițiile optime pentru reacția de amidare a dipeptidei model (Z-Ala-Phe-OMe) au fost descrise de [172].

Reacțiile au fost realizate în fiole de sticlă de 10 ml în care s-au introdus: 0,05 mmoli Z-Ala-Phe-OMe, 0,5 mmoli carbamat de amoniu și 5 ml solvent (*t*-BuOH/DMF, 82,5/17,5, % vol). Solvenții folosiți în reacție au fost uscați pe site moleculare de 4Å timp de 24 de ore. Amestecul de reacție a fost termostatat la 30°C timp de 30 de minute sub agitare magnetică, după care reacția a fost inițiată prin adăugarea a 10 mg (2,6 U/mg preparat) alcalază imobilizată sau 10 μl (2,6 U/mg proteină) alcalază nativă. Reacția a fost incubată 21 de ore la 30°C. Reacțiile au fost realizate în duplicat. Au fost prelevate probe la diferite intervale care s-au diluat cu un volum egal de acetonitril.

Pe baza analizelor efectuate, s-a calculat randamentul de amidă format la diferite intervale de timp pe baza ariilor picurilor și activitatea enzimatică în primele momente ale reacției.

$$\text{Activitate} = \frac{\mu\text{moli produs format}}{\text{timp} \cdot \text{mg enzima}} \quad (\text{U}/\text{mg})$$

3.4. Hidroliza enzimatică a esterilor *terț*-butilici C-terminali ai peptidelor

Materiale și aparatură

În reacțiile de hidroliză s-au folosit următoarele substraturi:

- *dipeptide*: Z-Ala-Phe-OBu^t, Z-Val-Ala-OBu^t, Z-Val-Asn-O^tBu, Z-Val-Gln-OBu^t, Z-Val-Leu-OBu^t, Z-Val-Lys(Boc)-OBu^t, Z-Val-Met-OBu^t, Z-Val-Phe-OBu^t, Z-Val-Ser-OBu^t, Z-Val-Tyr-OBu^t (Diosynth);
- *tripeptide*: Z-Ala-Phe-Ala-OBu^t (Diosynth) ;
- *tetrapeptide*: Boc-Ala-Asp(OBu^t)-Trp-Phe-OBu^t, Boc-Gly-Phe-Phe-Leu-OBu^t (Diosynth);
- *hexapeptide*: Boc-Gly-Phe-Met-Pro-Phe-Trp-OBu^t (Diosynth).

Catalizatori: alcalaza 2,4L FG, alcalaza 2,5L DX (Novozymes), subtilizina A din *Subtilisin Carlsberg*, 11 U/mg (Sigma Aldrich), alcalaza-CLEA 31 NPA U/g (05789, CLEA Technologies, Olanda) și alcalaza-CLEA (08331, Diosynth).

Solvenți: N,N-dimetilformamidă (Sigma Aldrich) și soluție tampon fosfat 0,1 M, pH 7,0.

Determinările cromatografice au fost efectuate pe un HPLC (Waters) cu fază inversă (RP), echipat cu un detector UV cu șir de diode, autosampler și coloană Atlantis T3 3 μm, 2,1 mm x 100 mm (Waters). Analizele au fost efectuate la 220 sau 280 nm. Compușii au fost eluați cu acetonitril conținând 0,1% acid trifluoracetic (TFA) cu un gradient de la 2% la 98%. Debitul a fost de 0,5 ml/minut.

Mod de lucru

Condițiile optime pentru reacția de hidroliză selectivă enzimatică a esterilor *terț*-butilici ai peptidelor studiate au fost descrise de [9].

Reacțiile au fost realizate în fiole de sticlă de 10 ml la diferite concentrații de substrat (5-150 mM). Hidroliza a fost realizată la un volum total de 1 ml în amestec de DMF/tampon (diferite concentrații). Amestecul de reacție a fost termostatat la 40°C sub agitare magnetică, reacția fiind inițiată prin adăugarea alcalazei native sau imobilizate. S-au prelevat probe la diferite intervale de timp care s-au diluat cu un volum egal de acetonitril.

3.5. Reutilizarea preparatelor enzimatiche imobilizate în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe

Materiale și aparatură

În aceste reacții s-au folosit: Z-Ala-Phe-OMe (Bachem AG), carbamat de amoniu (99%, Sigma Aldrich), *t*-butanol (Sigma Aldrich), N,N-dimetilformamidă (Sigma Aldrich), acetonitril (Merck), incubator (Memmert Modell 500) și rotor (Stuart SB2) pentru reacții paralele.

Catalizatori: preparatul enzimatic obținut prin imobilizarea pretezei Alcalază 2,4L FG în matrici derivate din DMDMOS și TMOS (1:1, raport molar).

Determinările cromatografice au fost efectuate pe un HPLC (Waters) cu fază inversă (RP), echipat cu un detector UV cu șir de diode, autosampler și coloană Atlantis T3 3 μm, 2,1 mm x 100 mm (Waters). Analizele au fost efectuate la 220

nm. Compușii au fost eluați cu acetonitril conținând 0,1% acid trifluoracetic (TFA) cu un gradient de la 2% la 98%. Debitul folosit a fost de 0,5 ml/minut.

Mod de lucru

Reacțiile au fost realizate în fiole de sticlă de 4 ml în care s-au introdus: 0,04 mmoli Z-Ala-Phe-OMe, 0,4 mmoli carbamat de amoniu și 4 ml solvent (*t*-BuOH/DMF, 82,5/17,5, % vol). Solvenții folosiți în reacție au fost uscați pe site moleculare de 4Å timp de 24 de ore. Amestecul de reacție a fost termostatat la 30°C timp de 30 de minute sub agitare magnetică, după care reacția a fost inițiată prin adăugarea a 16 mg alcalază immobilizată. După fiecare reutilizare (22 de ore de reacție) s-a prelevat probă care a fost ulterior diluată cu un volum egal de acetonitril și analizată prin HPLC. Preparatul enzimatic a fost separat prin centrifugare, spălat cu 2 ml solvent (*t*-BuOH/DMF, 82,5/17,5, % vol) și reutilizat într-o nouă reacție. Pe baza analizelor efectuate s-a calculat randamentul de amidă format la sfârșitul reacției pe baza ariilor picurilor și eficiența catalitică. Eficiența catalitică a fost exprimată ca procent de amidă format într-o oră de către 1 mg enzimă immobilizată. Reacțiile au fost realizate în duplicat.

3.6. Utilizarea preparatelor enzimatiche immobilizate în sistem continuu

Materiale și aparatură

În aceste reacții s-au folosit: Z-Ala-Phe-OMe (Bachem AG), carbamat de amoniu (99%, Sigma Aldrich), *t*-butanol (Sigma Aldrich), N,N-dimetilformamidă (Sigma Aldrich), acetonitril (Merck), pompă peristaltică și coloană de sticlă.

Catalizatori: preparatul enzimatic obținut prin immobilizarea proteazei alcalază 2,4L FG în matrici derivate din DMDMOS și TMOS (1:1, raport molar).

Determinările cromatografice au fost efectuate pe un HPLC (Waters) cu fază inversă (RP), echipat cu un detector UV cu șir de diode, autosampler și coloană Atlantis T3 3 μm, 2,1 mm x 100 mm (Waters). Analizele au fost efectuate la 220 nm. Compușii au fost eluați cu acetonitril conținând 0,1% acid trifluoracetic (TFA) cu un gradient de la 2% la 98%. Debitul folosit a fost de 0,5 ml/minut.

Mod de lucru

Sistemul continuu a fost realizat dintr-o coloană de sticlă (15 cm lungime și 0,68 cm diametrul interior) umplută cu enzimă immobilizată (1,2 g) și carbamat de amoniu (3 g) așezate în straturi de aproximativ 1 cm. Soluția de substrat Z-Ala-Phe-OMe (5 ml, 50 mM) a fost introdusă în coloană și recirculată cu un debit de aproximativ 0,5 ml/minut până când conversia acestuia a fost totală. Probele prelevate la diferite intervale de timp s-au diluat cu un volum egal de acetonitril și apoi au fost analizate prin HPLC. Pe baza analizelor efectuate, s-a calculat randamentul de amidă format la diferite intervale de timp pe baza ariilor picurilor cromatografice.

4. CONCLUZII FINALE

Scopul principal al acestei teze de doctorat a fost obținerea de noi biocatalizatori stabili care să prezinte eficiență ridicată în deprotejarea și amidarea peptidelor C-terminale. Producția la scară industrială este favorizată de folosirea enzimelor imobilizate, deoarece permite reutilizarea biocatalizatorului, procesul devenind mult mai economic.

În prima parte a tezei este prezentat un studiu de literatură cu privire la structura și proprietățile catalitice ale serin-proteazelor, imobilizarea acestora prin entrapare în sol-gel, precum și utilizarea enzimelor în sinteza și modificarea peptidelor biologic active. Acest studiu, a reprezentat fundamentul științific pentru obiectivele care au fost urmărite în partea de cercetări experimentale.

Studiile realizate în cadrul contribuțiilor originale au avut următoarele obiective:

- Elaborarea unei noi metode de imobilizare prin entrapare în sol-gel a alcalazei din *Bacillus licheniformis*.
- Optimizarea parametrilor de imobilizare pentru obținerea de biocatalizatori cu eficiență catalitică îmbunătățită în cazul funcționalizării grupării carboxilice C-terminale (amidare și hidroliză).
- Biocatalizatorul obținut să fie stabil în condițiile de proces și să manifeste proprietăți constante indiferent de lotul din care provine.
- Studiul stabilității termice și operaționale a preparatelor enzimaticice în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe.
- Reutilizarea preparatelor enzimaticice obținute prin entrapare în mediu de solvent organic.
- Obținerea de biocatalizatori stabili care să fie utilizați în procese continue.
- Imobilizarea alcalazei prin entrapare în sisteme ternare de silani precursori și prin entrapare combinată cu adsorbție pentru îmbunătățirea activității catalitice.
- Caracterizarea preparatelor enzimaticice folosind metode instrumentale de analiză structurală.

Din studiile experimentale, efectuate în conformitate cu obiectivele stabilite, au rezultat următoarele concluzii:

Reacții de hidroliză selectivă a peptidelor catalizate de alcalaza-CLEA

Preparatul comercial alcalaza-CLEA (imobilizată prin înrețelare) a fost utilizat în reacția de deprotecție selectivă a esterilor *terț*-butilici ai peptidelor în mediu de solvent organic/apă. În urma studiului influenței concentrației de DMF din mediul de reacție asupra eficienței catalitice a proteazei în reacția de hidroliză a dipeptidei Z-Ala-Phe-OBu^t, s-a observat că valoarea optimă pentru care s-a obținut activitatea maximă a biocatalizatorului a fost de 50% (vol). Creșterea concentrației de DMF

(peste 50%) a avut un efect negativ asupra eficienței catalitice determinând o scădere a acesteia datorită efectului inactivant al solventului organic.

La aceeași concentrație de DMF, activitatea esterazică a fost maximă, în cazul hidrolizei selective a tetrapeptidei Boc-Ala-Asp(OtBu)-Trp-Phe-OBu^t. Excesul de apă determină hidroliza produsului format deoarece acesta acționează doar ca agent nucleofil în reacție. De asemenea, flexibilitatea moleculelor de enzimă crește, determinând o scădere a activității catalitice datorită modificărilor conformaționale.

În cazul dipeptidelor cu formula generală Z-Val-AA-OBu^t, prezența aminoacizilor cu grupări hidrofobe la poziția C-terminală, a determinat scăderea activității catalitice a alcalazei-CLEA.

Obținerea de noi biocatalizatori stabili și eficienți pentru funcționalizarea grupării carboxilice C-terminale a peptidelor

Dintre proteazele studiate, cele mai bune activități în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe, folosind carbamat de amoniu ca agent nucleofil, le-a prezentat preparatul comercial alcalaza 2,4L FG din *Bacillus licheniformis*.

Această protează a prezentat proprietăți constante în ceea ce privește compoziția proteică și activitatea catalitică, independent de lotul de proveniență.

La imobilizarea alcalazei 2,4L FG prin entrapare în sisteme binare de precursori metoxisilanici, prezența grupei nehidrolizabile dimetil în rețeaua de sol-gel a dus la cele mai mari valori ale activității și randamentului de produs în reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe. Capacitatea de imobilizare a atins valoarea optimă la 11,5%, corespunzând unui raport masic de 7,5 mg proteină/mmoli silani. De asemenea, raportul molar al silanilor precursori pentru care eficiența catalitică a enzimei a fost maximă, a fost de 1:1. Astfel, prin optimizarea metodei de imobilizare s-au obținut catalizatori eficienți și reproductibili.

În urma imobilizării, afinitatea proteazei a scăzut datorită limitărilor difuzionale ale substratului și/sau produsului în matricea de sol-gel, însă eficiența catalitică (k_{cat}/K_M) a fost de două ori mai mare comparativ cu alcalaza nativă.

Creșterea stabilității termice reprezintă una dintre principalele avantaje ale imobilizării, datorită efectului de protecție al suportului, mai ales în cazul unor supraîncălziri locale, de scurtă durată, cauzate de efectul termic al reacției. Preparatele imobilizate au prezentat stabilitate termică și de păstrare ridicată pe intervalul studiat în comparație cu enzima nativă.

Reutilizarea enzimei reprezintă un alt obiectiv important al imobilizării pentru aplicațiile industriale. Tehnica de entrapare în sol-gel și-a demonstrat eficiența și sub acest aspect. S-a obținut astfel o creștere însemnată a stabilității enzimei, neexistând pierderi de activitate chiar și după 14 reutilizări în solvent organic.

Prin imobilizare, procesele pot fi operate în regim continuu, ceea ce permite automatizarea lor. Alcalaza entrapată în sol-gel a fost astfel utilizată cu succes în producerea continuă a Z-Ala-Phe-NH₂, prin reacția de amidare a Z-Ala-Phe-OMe folosind carbamat de amoniu ca agent nucleofil.

Tehnica de entrapare în sisteme ternare de silani precursori, precum și cea de entrapare combinată cu adsorbție a dus la obținerea unor biocatalizatori cu activitatea catalitică ridicată în reacția de amidare studiată. Sistemele ternare, în care compoziția de MeTMOS a fost de 0,3, 0,9 și 1,5 mmoli, au fost superioare din punct de vedere al activității inițiale comparativ cu sistemul binar format din DMDMOS:TMOS (raport molar, 1:1). Creșterea în continuare a densității grupărilor metil (MeTMOS) în rețeaua de sol-gel a avut efect nefavorabil asupra vitezei inițiale

de reacție, precum și a productivității. Metoda combinată de entrapare și adsorbție este indicată deoarece imobilizarea prin efect dublu, de închidere a enzimei în rețea și depunere pe suport, reduce pierderile fizice de biocatalizator concomitent cu menținerea unei activități ridicate. Dintre suporturile de adsorbție, cele mai bune s-au dovedit a fi cele de tip Celite 545.

Investigarea structurală a preparatelor imobilizate

Imaginile realizate prin microscopia electronică de baleiaj (SEM) cuplată cu spectrometria de raze X cu dispersie de energie (EDX) s-au obținut informații utile despre microstructura, porozitatea și textura preparatelor enzimatic imobilizate, precum și evaluarea prezenței elementelor existente în preparatele caracterizate. S-a observat că morfologia suprafeței gelului este influențată de natura precursorilor silanici folosiți la imobilizare și de raportul molar al acestora. Creșterea densității grupărilor metil a dus la obținerea unor structuri formate din blocuri compacte neregulate, mai puțin poroase. Utilizarea metodei combinate de entrapare și adsorbție pe Celite 545 a dus la o structură total diferită de a preparatului enzimatic, imaginea SEM prezintă zone poroase ce alternează cu structuri sub formă de fagure. Rezultatele analizei cantitative confirmă prezența componentelor utilizate în cursul procesului de imobilizare și în preparatul rezultat după spălare și uscare, ceea ce dovedește faptul că ele rămân parțial înglobate fizic sau chimic în xerogelul obținut.

Spectroscopia FTIR este o metodă utilă pentru confirmarea structurii preparatelor obținute prin metoda sol-gel și prin metoda combinată, prezență enzimei fiind demonstrată de banda caracteristică grupării amidice. În cazul metodei combinate, gelul format se depune pe suprafața suportului solid, fapt demonstrat de identitatea spectrelor celor două preparate enzimatic.

Vizualizarea enzimei în interiorul matricei de sol-gel s-a realizat prin legarea enzimei de un fluorocrom (izotiocianatul de fluoresceină), entraparea complexului enzimă-FITC și folosirea microscopiei de fluorescență pentru a localiza enzima în interiorul matricei de sol-gel. Imaginile de fluorescență au demonstrat o distribuție uniformă a enzimei în interiorul matricei de sol-gel, indiferent de natura silanilor precursori utilizați la imobilizare.

Rezultatele obținute în cadrul studiilor din această teză au constituit subiectul unui număr de 3 lucrări științifice publicate în reviste de specialitate și 4 lucrări comunicate la manifestări științifice din țară și străinătate.

Bibliografie

- [1]. Guzmán F., Barberis S., Illanes A., *Electronic Journal of Biotechnology*, **2007**, 10, 2, 280-314.
- [2]. Filippova I. Y., Lysogorskaya E. N., *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **2003**, 29, 5, 496-501.
- [3]. Yang Y. M., Wang J. W., Tan R. X., *Enzyme and Microbial Technology*, **2004**, 34, 126.
- [4]. Sangeetha K., Morris V. B., Abraham T. E., *Applied Catalysis A: General*, **2008**, 341, 168-173.
- [5]. Hou R. Z., Zhang N., Lib G., Huang Y. B., Wang H., Xiao Y. P., Liu Y. J., Yang Y., Zhao L., Zhang X. Z., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2005**, 37, 9-15.
- [6]. Bacheva A. V., Isakov M. S., Lysogorskaya E. N., Macquarrie D. J., Philippova I. Yu., *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **2008**, 34, 3, 334-338.
- [7]. Gini F., Eggen I. F., van Zoelen D. -J., Boeriu C.G., *Application Chemica Oggi/Chemistry Today, Focus on Tides*, **2009**, 27, 2, 24-26.
- [8]. Boeriu C. G., Eggen I. F., van Zoelen D. J., Bours G. H., *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **2009**, 611, 115-116.
- [9]. Eggen I., Boeriu C. G., WO 2007/082890, **2007**.
- [10]. Eggen I., Boeriu C. G., , WO 2009/000814, **2009**.
- [11]. Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F. J., Ballesteros, A., *Trends in Biotechnology*, **2006**, 24, 281-287.
- [12]. Anastas P. T., Williamson T. C., *American Chemical Society*, **1996**, 1-17.
- [13]. Anastas P. T., Warner J. C., *Green chemistry. Theory and practice*, **1998**, Oxford University Press, New York.
- [14]. (http://www.x-zyme.de/de/biocatalytic_processes_webinar_071210.pdf)
- [15]. Illanes A., *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*, **2008**, Springer Science.
- [16]. Dumitru I. F., Iordăchescu D., *Introducere în Enzimologie*, **1981**, Editura Medicală, București.
- [17]. Péter F., *Biotransformări enzimatică*, **2005**, Editura Politehnică.
- [18]. Gill I., Fandino R. L., Jobra X., Vulfson E. N., *Enzyme and Microbial Technology*, **1996**, 18, 162-183.
- [19]. Huang S. M., Chen K. N., Chen Y. P., Hong W. S., Chen M. J., *International Journal of Food Science & Technology*, **2010**, 45(5), 1061-7.
- [20]. Kim S. -K., Wijesekara I., *Journal of Functional Foods*, **2010**, 2(1), 1-9.
- [21]. Marx V., *Chemical & Engineering News*, **2005**, 83(11), 17-24.
- [22]. Powers J. P. S., Hancock R. E. W., *Peptides*, **2003**, 24, 1681-1691.
- [23]. Lesmes L. P., Bohorquez M. Y., Carreno L. F., Patarroyo M. E., Lozano J. M., *Peptides*, **2009**, 30, 2150-2160.
- [24]. Chan D. I., Prenner E. J., Vogel H. J., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2006**, 1758, 1184-1202.
- [25]. Bertin P. B., Lozzi S. P., Howell J. K., Restrepo-Cadavid G., Neves D., Teixeira R., de Sousa M. V., Norris S. J., Santana J. M., *Infection and Immunity*, **2005**, 73, 2253-2261.

- [26]. Vazquez M. E., Rothman D. M., Imperiali B., *Organic and Biomolecular Chemistry.*, **2004**, 121, 2(14), 1965-1966.
- [27]. Stewart J. M., Young J. D., *Solid phase peptide synthesis*, 2nd Edition, **1984**, Pierce Chemical Company, Rockford, 176.
- [28]. Nilsson B., Soellner M., Raines R., *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, **2005**, 34, 91-118.
- [29]. Banfi D., Mutter M., Patiny L., *Protein and Peptide Letters*, **2004**, 11(6), 539-542.
- [30]. Bray B. L., *Nature Reviews*, **2003**, 2, 587-593.
- [31]. Baca M., Muir T. W., Schnoelzer M., Kent S. B. H., *Journal of the American Chemical Society*, **1995**, 117, 1881-1887.
- [32]. Yan L. Z., Dawson P. E., *Journal of the American Chemical Society*, **2001**, 123(4), 526-533.
- [33]. Lu Y. A., Tam J. P., *Organic Letters*, **2005**, 7(22), 5003-5006.
- [34]. Nardin E. H., Calvo-Calle J. M., Oliveira G. A., Clavijo P., Nussenzweig R., Simon R., Zeng W., Rose K., *Vaccine*, **1998**, 16, 590-600.
- [35]. Tam J. P., Lu Y., Liu C. F., Shao J., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1995**, 92(26), 12485-12489.
- [36]. Ahn, J. M., Boyle, N. A., MacDonald, M. T., Janda, K. D., *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2002**, 2, 463-473.
- [37]. Hamel E., Covell D. G., *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, **2002**, 2(1), 19-53.
- [38]. Sarabia F., Chammaa S., Ruiz A. S., Ortiz L. M., Herrera F. J., *Current Medicinal Chemistry*, **2004**, 11(10), 1309-1332.
- [39]. Chellapan S., Jasmin C., Basheer S., Elyas K. K., Bhat S. G., Chandrasekaran M., *Process Biochemistry*, **2006**, 41, 956-961.
- [40]. Christen P., López-Munguía A., *Food Biotechnology*, **1994**, 8, 167-90.
- [41]. Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V., *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **1998**, 62, 563-97.
- [42]. Niehaus F., Bertoldo C., Kahler M., Antranikian G., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **1999**, 51, 711-29.
- [43]. Bordusa F., *Chemical Reviews*, **2002**, 102, 4817-4867.
- [44]. Capellas M., Caminal G., Gonzalez G., López-Santín J., Clapés P., *Biotechnology and Bioengineering*, **1997**, 56(4), 456-463.
- [45]. Björup P., Adlercreutz P., Clapés P., *Biocatalysis and Biotransformation*, **1999**, 17(5), 319-345.
- [46]. Carrea G., Riva S., *Angewandte Chemie International Edition*, **2000**, 39, 2226-2254.
- [47]. Bonneau P. R., Eyer M., Graycar, T. P., Estelle D. A., Jones J. B., *Bioorganic Chemistry*, **1993**, 21, 431-438.
- [48]. Bornscheuer U. T., Kazlauskas R. J., *Hydrolases in Organic Synthesis, 2nd Edition*, **2006**, Editura Wiley-VCH.
- [49]. Graham L. D., Hagggett K. D., Jennings P. A., Le Brocque D. S., Whittaker R. G., Schober P. A., *Biochemistry*, **1993**, 32, 6250-6258.
- [50]. Barberis S., Quiroga E., Arribere M. C., Priolo N., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2002**, 17, 39-47.
- [51]. Quiroga E., Priolo N., Marchese J., Barberis S., *Acta Farmacéutica Bonaerense*, **2005**, 24(2), 204-208.
- [52]. Quiroga E., Priolo N., Marchese J., Barberis S., *Electronic Journal of Biotechnology*, **2006**, 9, 18-25.

- [53]. Lombard C., Saulnier J., Wallach J., *Protein and Peptide Letters*, **2005**, 12, 621–629.
- [54]. Castro R., *Enzyme and Microbial Technology*, **2000**, 27, 143–150.
- [55]. Illanes A., Anjarí S., Altamirano C., Aguirreb C., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2004**, 30, 95–103.
- [56]. Hou R. Z., Yang Y., Li G., Huang Y. B., Wang H., Liu Y. J., Xu L., Zhang X. Z., *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **2006**, 44(2), 73–80.
- [57]. Trusek-Holownia A., *Journal of Biotechnology*, **2003**, 102, 153–163.
- [58]. van Unen D., Engbersen F., Reinhoudt D., *Biotechnology and Bioengineering*, **2001**, 75, 154–158.
- [59]. van Unen D., Engbersen F., Reinhoudt D., *Biotechnology and Bioengineering*, **2002**, 77, 248–255.
- [60]. van Unen D., Engbersen F., Reinhoudt D., *Biotechnology and Bioengineering*, **1998**, 59, 553–556.
- [61]. Lei H., Wang W., Chen L. -Li, Li X. -C., Yi B., Deng L., *Enzyme and Microbial Technology*, **2004**, 35, 15–21.
- [62]. del Mar Yust M., Pedroche J., del Carmen Millán-Linares M., Alcaide-Hidalgo J. M., Millán F., *Food Chemistry*, **2010**, 122, 1212–1217.
- [63]. Tardioli P. W., Sousa R., Giordano R. C., Giordano R. L. C., *Enzyme and Microbial Technology*, **2005**, 36, 555–564.
- [64]. Ferreira L., Ramos M. A., Dordick J. S., Gil M. H., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2003**, 21, 189–199.
- [65]. Mozhaev V. V., Sergeeva M. V., Belova A. B., Khmel'nitsky Y. L., *Biotechnology and Bioengineering*, **1989**, 35, 653–659.
- [66]. Amorim Fernandes J., McAlphine M., Halling P., *Biochemical Engineering Journal*, **2005**, 24, 11–15.
- [67]. Cao L., van Rantwijk F., Sheldon R., *Organic Letters*, **2000**, 2, 1361–1364.
- [68]. Cao L., van Langen L., Sheldon R., *Current Opinion in Biotechnology*, **2003**, 14, 387–394.
- [69]. Wilson L., Illanes A., Pessela B., Abian O., Fernandez-Lafuente R., Guisan J. M., *Biotechnology and Bioengineering*, **2004**, 86, 558–562.
- [70]. Thurst S., Koksche B., *Journal of Organic Chemistry*, **2003**, 68, 2290–2296.
- [71]. Adamczak M., Hari Krishna S., *Food Technology and Biotechnology*, **2004**, 42(4), 251–264.
- [72]. Fischer U., Zeitschel U., Jakubke H., *Biomedica Biochimica Acta*, **1991**, 50(10–11), S131–S135.
- [73]. Stroud R.M., *Scientific American*, **1974**, 231(1), 86.
- [74]. Copeland R. A., *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, **2000**, Wiley-VCH.
- [75]. Perona J. J., Craik C. S., *Protein Science*, **1995**, 4, 337.
- [76]. Klein J. U., Prykhodzka A., Čeřovský V., *Journal of Peptide Science*, **2000**, 6, 541–549.
- [77]. Takeuchi Y., Noguchi S., Satow Y., Kojima S., Kumagai I., Miura K., Nakamura K. T., Mitsui Y., *Protein Engineering*, **1991**, 4, 501–8.
- [78]. Schmidl M. K., Taylor S. L., Nordlee J. A., *Food Technology*, **1994**, 48, 77–85.
- [79]. Amarowicz R., Shahidi F., *Food Chemistry*, **1997**, 58, 355–359.
- [80]. Möller N. P., Scholz-Ahrens K. E., Roos N., Schrezenmeir J., *European Journal of Nutrition*, **2008**, 47(4), 171–82.
- [81]. Agyei D., Danquah M. K., *Biotechnology Advances*, **2011**, 29, 272–277.

- [82]. Hancock R. E. W., Sahl H. -G., *Nature Biotechnology*, **2006**, 24(12), 1551–1557.
- [83]. Jang A., Lee M., *Meat Science*, **2005**, 69(4), 653–61.
- [84]. Pedroche J., Yust M. M., Lqari H., Megias C., Girón-Calle J., Alaiz M., Vioque J., Millán F., *Food Research International*, **2007**, 40(7), 931–8.
- [85]. Korhonen H., Pihlanto A., *International Dairy Journal*, **2006**, 16(9), 945–60.
- [86]. Shen B., Makley D. M., Johnston J. N., *Nature*, **2010**, 465(7301), 1027–1032.
- [87]. Jang A., Jo C., Kang K. -S., Lee M., *Food Chemistry*, **2008**, 107, 327–336.
- [88]. Kumar D., Bhalla T. C., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2005**, 68, 726–736.
- [89]. Kullmann W., *Enzymatic peptide synthesis*, **1987**, Boca Raton, CRC-Press.
- [90]. Schellenberger V., Jakubke H. D., *Angewandte Chemie International Edition*, **1991**, 30, 1437–1449.
- [91]. Wong C. -H., Whitesides G. M., *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, **1994**, Oxford: Pergamon Press.
- [92]. Drauz K., Waldmann H., *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, 1st Edition, **1995**, vol. 1 și 2, Weinheim: VCH.
- [93]. Park S., Kazlauskas R., *Current Opinion in Biotechnology*, **2003**, 14, 432–437.
- [94]. Lou W., Zong M., Wu H., *Biocatalysis and Biotransformation*, **2004**, 22(3), 171–176.
- [95]. Liu P., Gui-Ling T., Kin-Sing L., Wong M. -S., Ye Y., *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 2423–2425.
- [96]. Hou R. Z., Yang Y., Huang Y. B., Wang H., Zhang N., Liu Y. J., Zhang X. Z., Li G., *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, **2006**, 36(1), 93–105.
- [97]. Kumar D., Chand D., Sankhian U. D., Bhalla T. C., *Indian Journal of Microbiology*, **2003**, 43:131–133.
- [98]. Chen S. T., Chen S. Y., Hsiao S. C., Wang K. T., *Biomedica Biochimica Acta*, **1991**, 50, 181–186.
- [99]. Isowa Y., Ohmori M., Ichikawa T., Mori K., Nonaka Y., Kihara K., Oyama K., Satoh H., Nishimura S., **1979**, *Tetrahedron Letters*, 28, 2611–2612.
- [100]. Fischer A., Bommarius A. S., Drauz K., Wandrey C. *Biocatalysis*, **1994**, 8, 289–307.
- [101]. Moree W. J., Sears P., Kawashiro K., Witte K., Wong C. H., *Journal of the American Chemical Society*, **1997**, 119, 3942–3947.
- [102]. Vogel K., Cook J., Chmielewski J., *Chemistry & Biology*, **1996**, 3, 295–299.
- [103]. Bruckdorfer T., Marder O., Albericio F., *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **2004**, 5, 29–43.
- [104]. Kates S. A., Albericio F., *Solid-phase synthesis: a practical guide*, Marcel Dekker, New York, **2000**, 377–418.
- [105]. Barlos K., Gatos D., *Biopolymers*, **1999**, 51(4), 266–278.
- [106]. Johnson E. C., Malito E., Shen Y., Pentelute B., Rich D., Florián J., Tang W. J., Kent S. B., *Journal of Molecular Biology*, **2007**, 373(3), 573–586.
- [107]. Eggen I. F., Bakelaar F. T., Petersen A., Ten Kortenaar P. B. W., *Organic Process Research & Development*, **2005**, 9, 98–101.
- [108]. Sinisterra J., Alcantara A., *Journal of Molecular Catalysis*, **1993**, 84(3), 327–364.
- [109]. Murakami Y., Yoshida T., Hayashi S., Hirata A., *Biotechnology and Bioengineering*, **2000**, 69, 57–65.

- [110]. Schwarz A., Wandrey C., Steinke D., Kula M. R., *Biotechnology and Bioengineering*, **1992**, 39(2), 132-140.
- [111]. Gill I., Valivety R., *Organic Process Research and Development*, **2002**, 6(5), 684-691.
- [112]. Schwartz G. J., Netterville L. A., McHugh P. R., Moran T. H., *American Journal of Physiology*, **1991**, 261(5 30-5), R1141-R1146.
- [113]. Inouye K., Watanabe K., Morihara K., Techiro Y., Kanaya T., Emura J., Sakikabara S., *Journal of American Chemical Society*, **1979**, 101, 751-752.
- [114]. Thompson P. E., Keah H. H., Gomme P. T., Stanton P. G., Hearn M. T. W., *International Journal of Peptide and Protein Research*, **1995**, 46, 174-180.
- [115]. Merkle D. J., *Enzyme and Microbial Technology*, **1994**, 16, 450-456.
- [116]. Boeriu C. G., Frissen A. E., Boer E., van Kekem K., van Zoelen D. -J., Eggen F., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2010**, 66, 33-42.
- [117]. Chufán E. E., De M., Eipper B. A., Mains R. E., Amzel L. M., *Structure*, **2009**, 17, 965-973.
- [118]. Čeřovský V., Kula M. R., *Angewandte Chemie International Edition*, **1998**, 37, 1885-1887.
- [119]. Čeřovský V., Kula M. R., *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **2001**, 33, 183-187.
- [120]. Chen S. T., Jang M. K., Wang K. T., *Synthesis*, **1993**, 9, 858-860.
- [121]. Hacking M. A. P. J., Wegman M. A., Rops J., Van Rantwijk F., Sheldon R. A., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **1997**, 5, 155-157.
- [122]. Wegman M. A., Hacking M. A. P. J., Rops J., Pereira P., Van Rantwijk F., Sheldon R. A., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 1739-1750.
- [123]. Nuijens T., Cusan C., Kruijtzter J. A. W., Rijkers D. T. S., Liskamp R. M. J., Quaedflieg P. J. L. M., *Journal of Organic Chemistry*, **2009**, 74, 5145-5150.
- [124]. Schmidt M., Barbayianni E., Fotakopoulou I., Höhne M., Constantinou-Kokotou V., Bornscheuer U. T., Kokotos C., *J. Org. Chem.*, **2005**, 70(9), 3737-3740.
- [125]. Hermann P., *Wiss. Z. Univ. Halle* **1987**, 36, 17-29.
- [126]. Hermann P., *Biomed. Biochim. Acta* **1991**, 50, 19-31.
- [127]. Dudek S., Friebe S., Hermann P., *J. Chromatogr.* **1990**, 520, 333-338.
- [128]. Schulz M., Hermann P., Kunz H., *Synlett*, **1992**, 37-38.
- [129]. Guisan J. M., *Immobilization of Enzymes and Cells*, Second Edition, **2006**.
- [130]. Pedroche J., Yust M., Mateo C., Fernandez-Lafuente R., Giron-Calle J., Alaiz M., Vioque J., Guisan J. M., Millan F., *Enzyme and Microbial Technology*, **2007**, 40, 1160-1166.
- [131]. Whittall J., Sutton P., *Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations*, **2010**, John Wiley & Sons Ltd.
- [132]. Cao L., *Carrier-bound Immobilized Enzymes, Principles, Applications and Design*, **2005**, Wiley-VCH, Weinheim.
- [133]. Kawakami K., Yoshida S., *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **1996**, 82, 239-245.
- [134]. Chen J. P., *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **1996**, 82, 404-407.
- [135]. Uhlich T., Ulbricht M., Tomaschewski G., *Enzyme and Microbial Technology*, **1996**, 19, 124-131.
- [136]. Ortega N., Busto M. D., Perez-Mateos M., *Bioresource Technology*, **1998**, 64, 105-111.

- [137]. Veronese F. M., Mammucari C., Schiavon F., Schiavon O., Lora S., Secundo F., Chilin A., Guiotto A., *Farmac*, **2001**, 56, 541–547.
- [138]. Hsu A. F., Foglia T. A., Shen S. Y., *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **2000**, 31, 179–183.
- [139]. Drevon G. F., Russell A. J., *Biomacromolecules*, **2002**, 1, 571–576.
- [140]. Shchipunov Y. A., Karpenko T. Y., Bakunina I. Y., Burtseva Y. V., Zvyagintseva T. N., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **2004**, 58, 25–38.
- [141]. McIninch J. K., Kantrowitz E. R., *Biochimica et Biophysica Acta*, **2001**, 1547, 320–328.
- [142]. Demircioglu H., Beyenal H., Tanyolac A., Hasirci N., *Polymer*, **1995**, 36, 4091–4096.
- [143]. Ghanema A., Schurig V., *Tetrahedron Asymmetry*, **2003**, 14, 2547–2555.
- [144]. Kim Y., Dordick J., Clark D., *Biotechnology and Bioengineering*, **2001**, 72, 475–482.
- [145]. Raviyan P., Tang J. M., Rasco B. A., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 5462–5466.
- [146]. Chen J. P., Hwang Y. N., *Enzyme and Microbial Technology*, **2003**, 33, 513–519.
- [147]. Basri M., Harun A., Ahmad M. B., Razak C. A. N., Salleh A. B., *Journal of Applied Polymer Science*, **2001**, 82, 1404–1409.
- [148]. Suwasono S., Rastall R. A., *Biotechnology Letters*, **1998**, 20, 15–17.
- [149]. Kennedy J. F., Cabral J. M. S. M., Kalogerakis B., *Enzyme and Microbial Technology*, **1985**, 7, 22–28.
- [150]. Furukawa S., Ono T., Ijima H., Kawakami K., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2002**, 17, 23–28.
- [151]. Reetz M. T., Tielman P., Wiesenhoefer W., Koenen W., Zonta A., *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2003**, 345, 717–728.
- [152]. Furukawa S. Y., Kawakami K., *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **1998**, 85, 240–242.
- [153]. Pierre A. C., *Biocatalysis and Biotransformation*, **2004**, 22, 145–170.
- [154]. Avnir D., Coradin T., Lev O., Livage J., *Journal of Materials Chemistry*, **2006**, 16, 1013–1030.
- [155]. Castelvetro V., De Vita C., *Advances in Colloid and Interface Science*, **2004**, 167, 108.
- [156]. Schipunov Y. A., *Journal of Colloid and Interface Science*, **2003**, 268, 68.
- [157]. Martnez-Perez D., Ferrer M. L., Mateo C. R., *Analytical Biochemistry*, **2003**, 322, 238.
- [158]. Arica O., Suzuki T., Sano Y., Murakami Y., *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **1996**, 82, 341–345.
- [159]. Fessner W. -D., Anthonsen T., *Modern Biocatalysis-Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*, **2009**, Wiley-VCH, Weinheim.
- [160]. Wei Y., Xu J. G., Feng Q. W., Lin M. D., Dong H., Zhang W. J., Wang C., *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **2001**, 1, 83–93.
- [161]. Buisson P., Hernandez C., Pierre M., Pierre A. C., *Journal of Non-Crystalline Solids*, **2001**, 285, 295–302.
- [162]. Matsumoto M., Kondo K., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2001**, 92, 197–199.
- [163]. Jin W., Brennan J. D., *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 461, 1–36.

- [164]. Gea S.-J., Bai H., Yuan H.-S., Zhang I.-X., *Journal of Biotechnology*, **1996**, 50, 2-3, 161-170.
- [165]. Kittikun A. H., Kaewthong W., Cheirsilp B., *Biochemical Engineering Journal*, **2008**, 40, 116-120
- [166]. Singh R. S., Dhaliwal R., Puri M., *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **2008**, 35, 777-782.
- [167]. **Corici L. N.**, Frissen A. E., van Zoelen D.-J., Eggen I. F., Peter F., Davidescu C. M., Boeriu C. G., *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **2011**, 76, 361-366.
- [168]. **Corici L.**, Frissen A. E., Gini F., van Zoelen D.-J., Eggen I. F., Peter F., Boeriu C. G., *International Congress on Biocatalysis Hamburg, Germany*, **2010**, P107.
- [169]. **Corici L.**, Frissen G., Gini F., van Zoelen D.-J., Eggen I. F., Boeriu C. G., Netherlands Biotechnology Congress, NBC-13, Ede Wageningen, The Netherlands, **2010**, P110.
- [170]. Affleck R., Xu Z. F., Suzava V., Focht K., Clark D. S., Dordick J. S. (1992), *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, **1992**, 89, 1100-1104.
- [171]. **Corici L.**, Frissen G., Gini F., van Zoelen D.-J., Eggen I. F., Boeriu C.G., *2nd International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Timișoara, Romania*, **2010**, P17.
- [172]. **Corici L. N.**, Frissen A. E., van Zoelen D.-J., Eggen I. F., Peter F., Davidescu C. M., Boeriu C. G., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2011**, 73, 1-4, 90-97.
- [173]. Furukawa S., Ono T., Ijima H., Kawakami K., *Biotechnology Letters*, **2002**, 24, 13-16.
- [174]. Zarcuța C., **Corici L.**, Croitoru R., Peter F., *Annals of West University of Timișoara*, **2008**, Series of Chemistry 17 (3), 61-66.
- [175]. Zarcuța C., Kiss C., **Corici L.**, Croitoru R., Csunderlik C., Peter F., *Revista de Chimie*, **2009**, 60, 922-927.
- [176]. Bruins M. E., Janssen A. E. M., Boom R. M., *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2001**, 90(2), 155-186.
- [177]. Zhuang P., Butterfield D. A., *Biotechnology Progress*, **1992**, 8, 204-210.
- [178]. Kong J., Yu S., *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **2007**, 39(8), 549-559.
- [179]. Pretsch E., Bühlmann P., Affolter C., Structure determination of organic compounds, **2000**, Editura Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- [180]. Zarcuța C., **Corici L.**, Croitoru R., Ursoiu A., Peter F., *Journal of Molecular Catalysis: B Enzymatic*, **2010**, 65, 1-4, 79-86.
- [181]. Tomin A., Weiser D., Hellner G., Bata Z., **Corici L.**, Peter F., Koczka B., Poppe L., *Process Biochemistry*, **2011**, 46, (1), 52-58.
- [182]. Celis J. E., Carter N., Hunter T., Simons K., Small J. V., Shotton D., *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 3th Edition, **2006**, Elsevier, Academic Press.

ANEXE

Michaelis-Menten

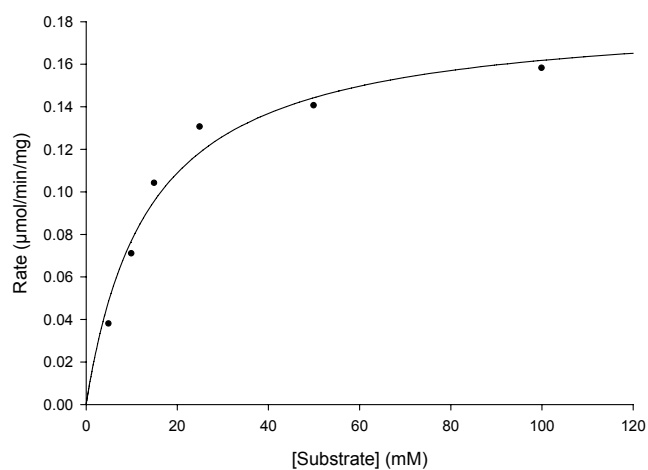


Figura 1. Curba de cinetică Michaelis-Menten în cazul reacției de hidroliză a Z-Val-Leu-OBu^t catalizată de alcalaza-CLEA

Michaelis-Menten

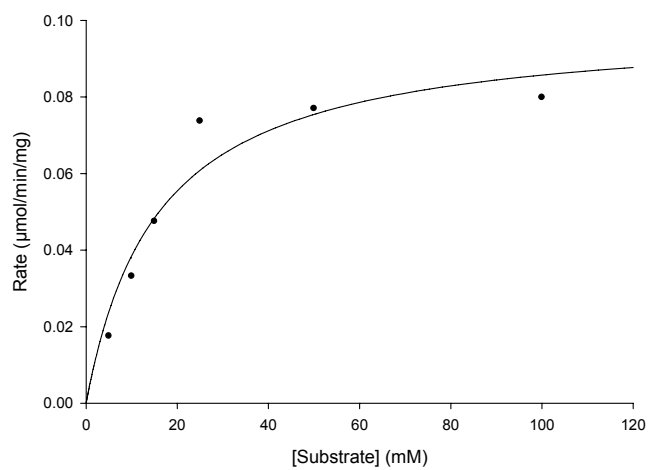


Figura 2. Curba de cinetică Michaelis-Menten în cazul reacției de hidroliză a Z-Val-Asn-OBu^t catalizată de alcalaza-CLEA

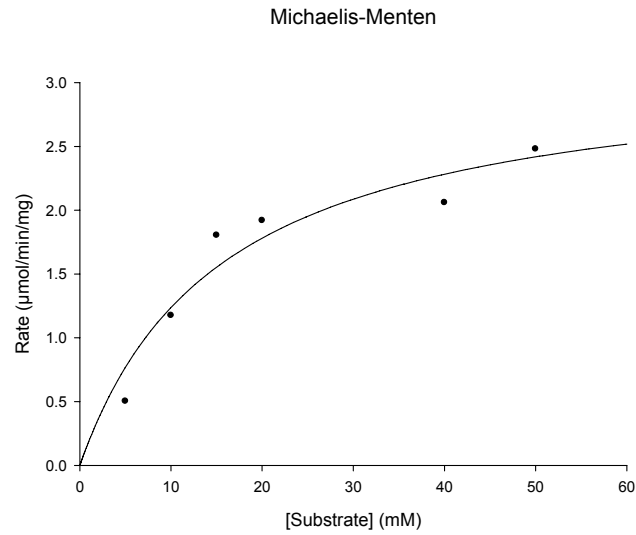


Figura 3. Curba de cinetică Michaelis-Menten în cazul reacției de hidroliză a Z-Ala-Phe-OBu^t catalizată de alcalaza-CLEA

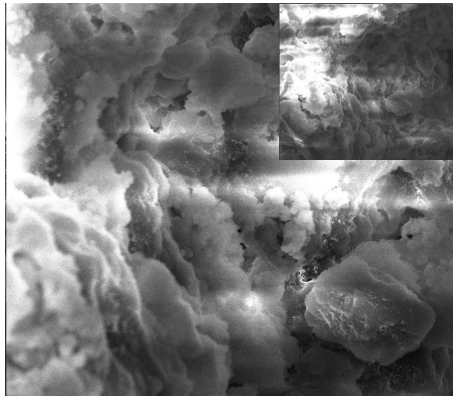


Figura 4. Imaginea SEM a preparatului enzimatic obținut prin imobilizarea alcalazei în matrici de sol-gel derivate de PrTMOS:TMOS (raport molar, 1:1)

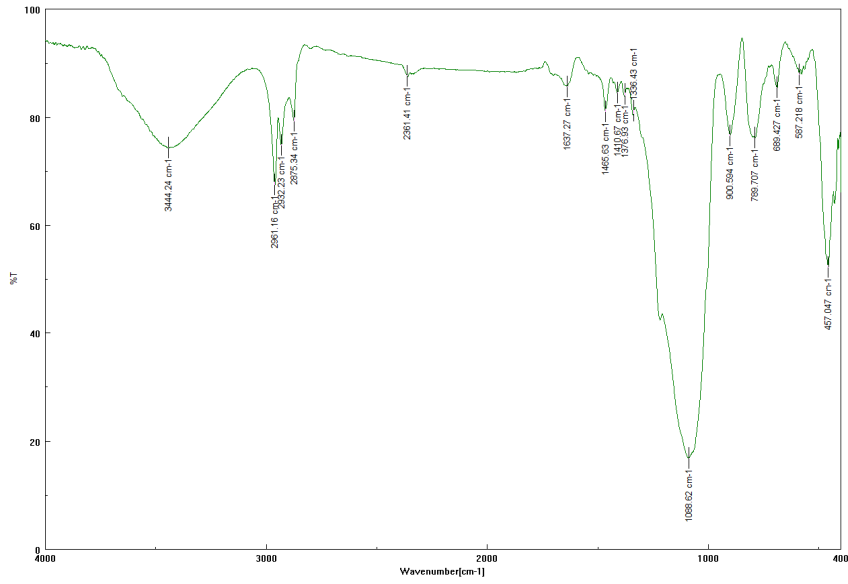


Figura 5. Spectrul IR al sol-gelului martor obținut din precursorii PrTMOs:TMOs (raport molar, 1:1)

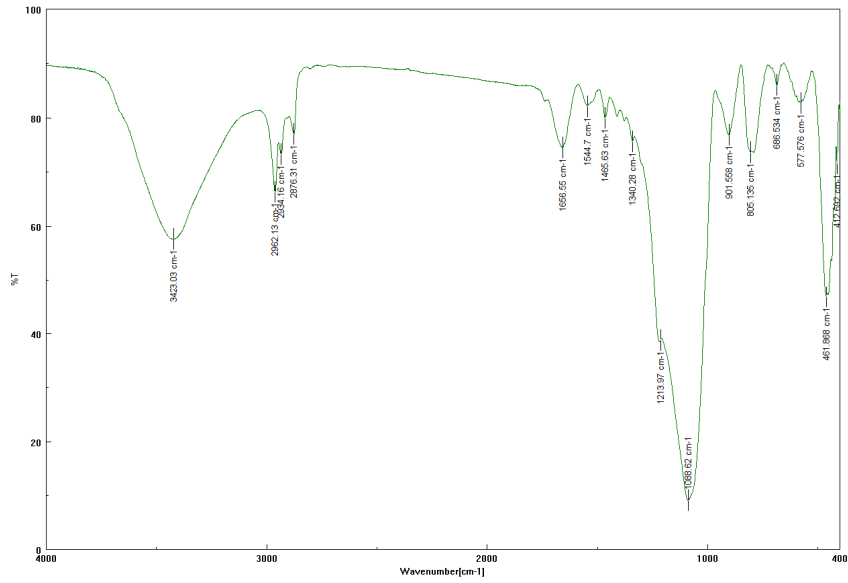


Figura 6. Spectrul IR al preparatului enzimatic obținut prin imobilizarea alcalazei în matrici de sol-gel derivate de PrTMOs:TMOs (raport molar, 1:1)

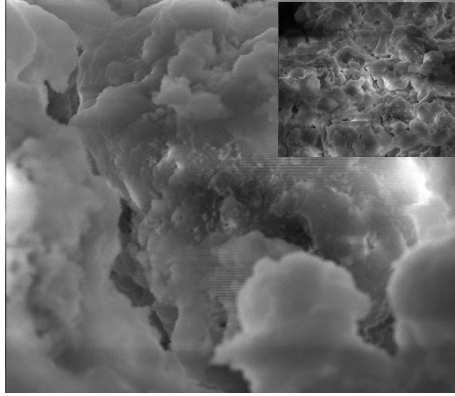


Figura 7. Imaginea SEM a preparatului enzimatic obținut prin imobilizarea alcalazei în matrici de sol-gel derivate de OCTMOS:TMOS (raport molar, 1:1)

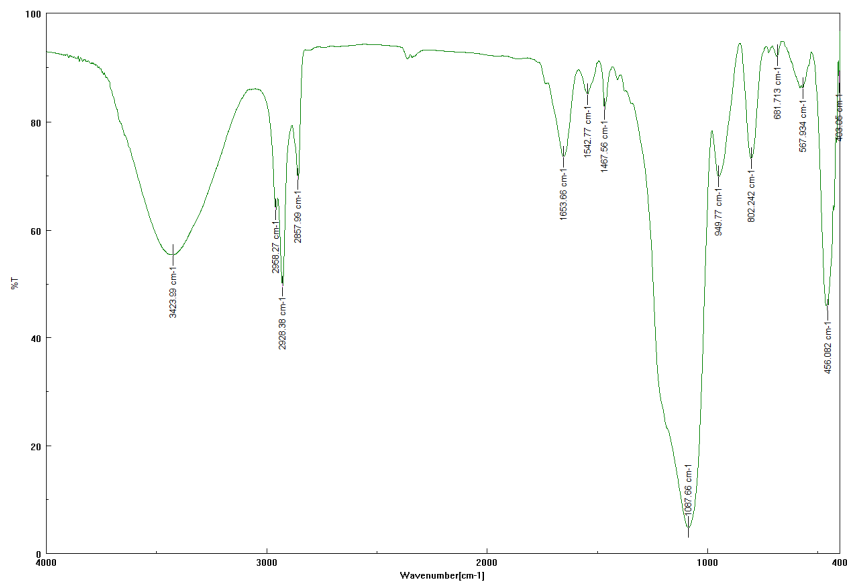


Figura 8. Spectrul IR al preparatului enzimatic obținut prin imobilizarea alcalazei în matrici de sol-gel derivate de OCTMOS:TMOS (raport molar, 1:1)

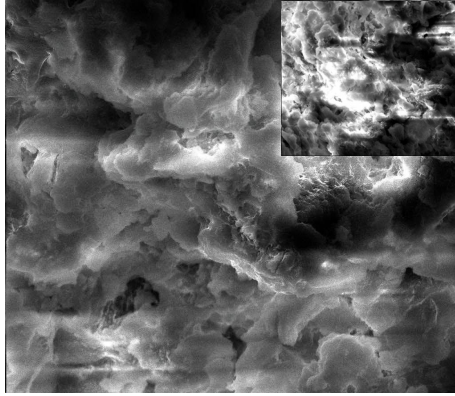


Figura 9. Imaginea SEM a preparatului enzimatic obținut prin imobilizarea alcalazei în matrici de sol-gel derivate de PhTMOs:TMOS (raport molar, 1:1)

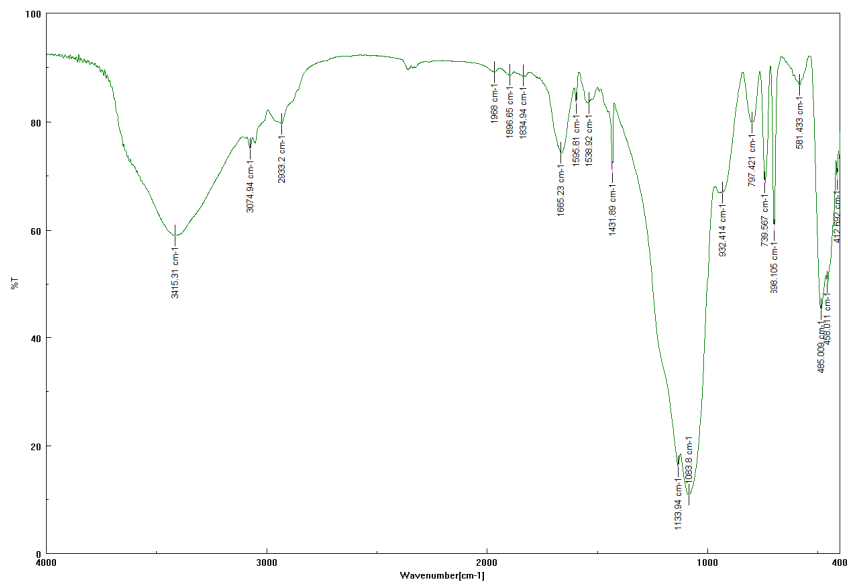


Figura 10. Spectrul IR al preparatului enzimatic obținut prin imobilizarea alcalazei în matrici de sol-gel derivate de PhTMOs:TMOS (raport molar, 1:1)

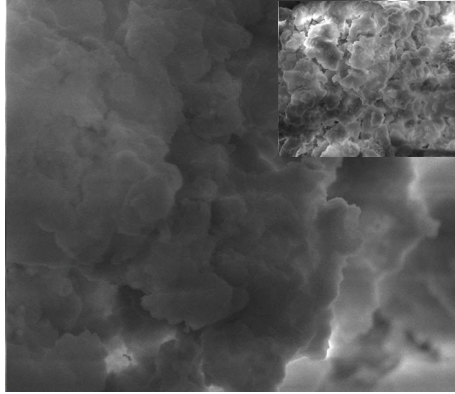


Figura 11. Imaginea SEM a preparatului enzimatic obținut prin imobilizarea alcalazei în matrice de sol-gel derivate de *i*-BuTMOS:TMOS (raport molar, 1:1)

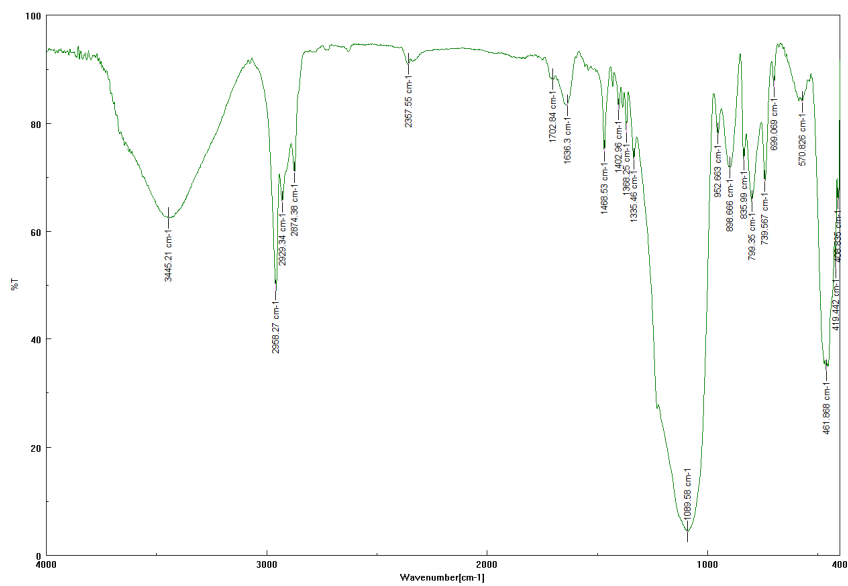


Figura 12. Spectrul IR al sol-gelului martor obținut din precursorii *i*-BuTMOS:TMOS (raport molar, 1:1)

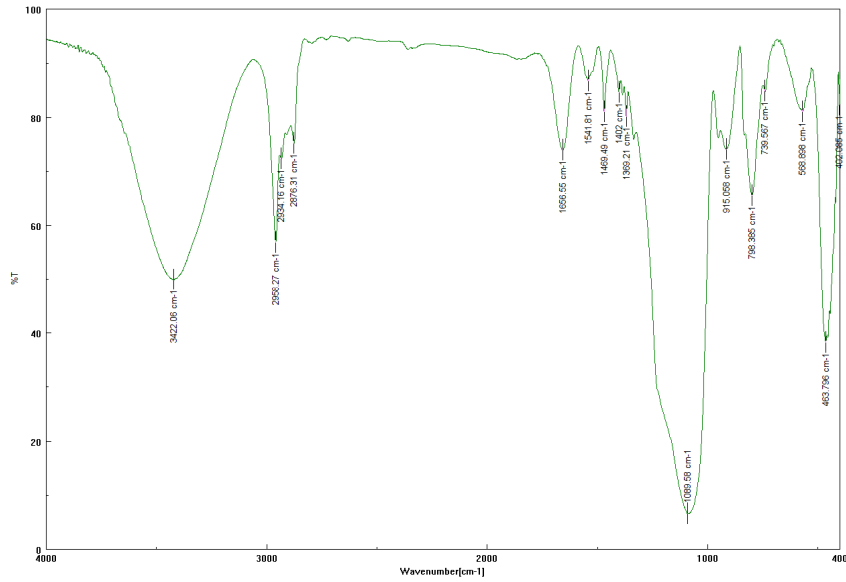


Figura 13. Spectrul IR al preparatului enzimatic obținut prin imobilizarea alcalazei în matrici de sol-gel derivate de *i*-BuTMOS:TMOS (raport molar, 1:1)

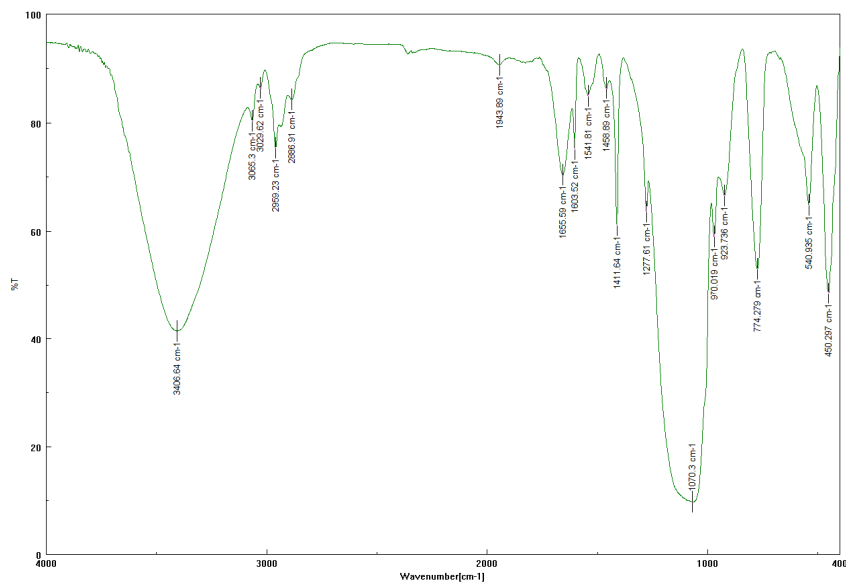


Figura 14. Spectrul IR al preparatului enzimatic obținut prin imobilizarea alcalazei în matrici de sol-gel derivate de VTMOs:TMOS (raport molar, 1:1)

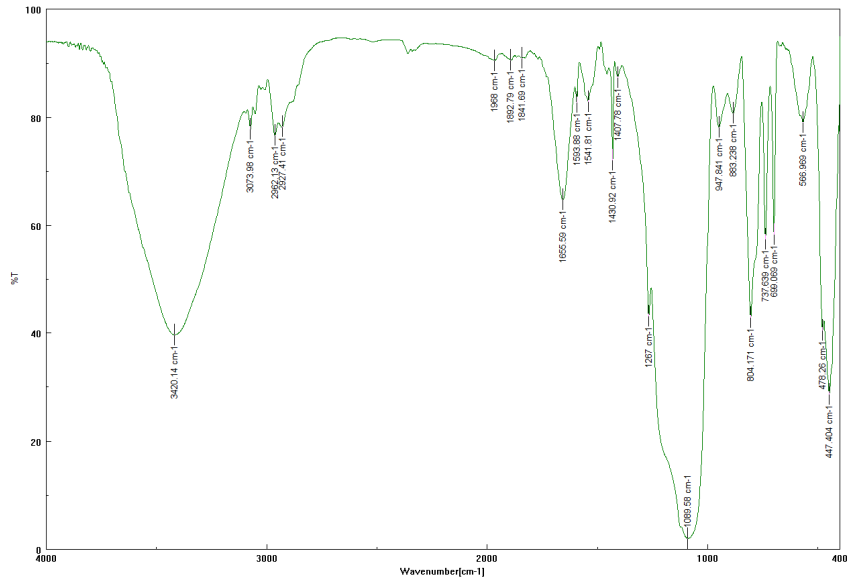


Figura 15. Spectrul IR al preparatului enzimatic obținut prin imobilizarea alcalazei în matrici de sol-gel derivate de MPDMOS:TMOS (raport molar, 1:1)

LISTA DE LUCRĂRI

Lucrări publicate

Corici L. N., Frissen A. E., van Zoelen D. -J., Eggen I. F., Peter F., Davidescu C. M., Boeriu C. G., Sol-gel immobilization of alcalase from *Bacillus licheniformis* for application in the synthesis of C-terminal peptide amides, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011, 73(1-4), pp. 90-97.

Tomin A., Weiser D., Hellner G., Bata Z., **Corici L.**, Peter F., Koczka B., Poppe L., Fine-tuning the second generation sol-gel lipase immobilization with ternary alkoxysilane precursor systems, *Process Biochemistry*, 2011, 46 (1), pp. 52-58.

Corici L. N., Frissen A. E., van Zoelen D -J., Eggen I. F., Peter F., Davidescu C. M., Boeriu C. G., Synthesis of peptide amides using sol-gel immobilized alcalase in batch and continuous reaction system *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 2011, 76, pp. 303-308.

Lucrări comunicate

Corici L., Frissen G., Gini F., van Zoelen D.-J., Eggen I. F., Boeriu C. G., Protease kinetics: selective hydrolysis of C-terminal tert-butyl esters of peptides by alcalase immobilized as cross-linked enzyme aggregates, *Netherlands Biotechnology Congress*, NBC-13, Ede, The Netherlands, 2010, p.110.

Corici L., Frissen G., Gini F., van Zoelen D.-J., Eggen I. F., Boeriu C.G., Hydrolysis kinetic studies of C-terminal tert-butyl esters of peptides catalyzed by alcalase-CLEA, *2nd International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, Timișoara, Romania, 2010, p.17.

Corici L., Frissen A. E., Gini F., van Zoelen D. -J., Eggen I. F., Peter F., Boeriu C. G., Protease-catalyzed selective deprotection of C-terminal tert-butyl esters of peptides, *International Congress on Biocatalysis Hamburg*, Biocat2010, Germany, 2010, p.107.

Corici L., Frissen A. E., van Zoelen D.-J., Eggen I. F., Péter F., Davidescu C. M., Boeriu C. G., Immobilization of Alcalase on silica matrices for highly efficient C-terminal amidation of peptides, *12th Edition of Timișoara's Academic Days*, Chemistry, Timișoara, Romania, 2011, p.116.