

## Lezione 10

Le Idrolasi: Lipasi, Fosfolipasi ed Esterasi.

Le idrolasi sono enzimi che utilizzano l'acqua come reagente.

Le idrolasi sono enzimi particolarmente importanti dal punto di vista industriale, e sono la classe di enzimi più utilizzati, soprattutto le lipasi.

Le lipasi *in vivo* hanno una alta specificità di substrato, mentre *ex vivo* riescono a trasformare substrati anche molto diversi rispetto al substrato naturale. Sono quindi enzimi molto versatili, che però mantengono la loro capacità di stereoselezione.

Le idrolasi possono essere utilizzate per effettuare reazioni chimiche, quali l'idrolisi di esteri e ammidi al loro corrispondente acido carbossilico. Se questo è in posizione  $\alpha$  rispetto al gruppo carbonilico avremo uno stereocentro, il che rende gli enzimi efficienti per la loro stereoselettività e ne rende possibile l'uso nella risoluzione di racemi.

La risoluzione di racemi può anche essere effettuata su strutture esteree o ammidiche in cui Ossigeno o Azoto sono sullo stereocentro, sempre con reazioni di idrolisi.

Fanno parte delle idrolasi le idantoinasi, che idrolizzano le idantoine, molecole caratterizzate da un anello a cinque termini con due atomi di N, due gruppi carbonilici ed un C legato ad un gruppo R. Le idantoinasi idrolizzano in maniera stereoselettiva l'anello idantoinico, portando al corrispondente  $\alpha$ -amminoacido, generalmente in configurazione L, in alcuni casi ad aminoacidi D. È possibile abbinare una reazione di racemizzazione sullo stereocentro dell'idantoina.

Le idrolasi permettono di lavorare su composti  $\beta$ -dicarbossilici.

Le idrolasi possono essere utilizzate non solo per l'idrolisi, ma anche per la sintesi. In condizioni opportune riescono ad effettuare la sintesi con alte rese.

Le idrolasi catalizzano reazione di idrolisi di legami specifici, utilizzando l'H<sub>2</sub>O come nucleofilo. Le idrolasi ricoprono circa il 75% della quantità di enzimi utilizzati in ambito industriale, di cui il 70% sono glicosidasi, proteasi e lipasi.

## I lipidi

I lipidi sono molecole che fanno parte dei metaboliti primari degli organismi viventi.

Sono difficili da classificare, perché non hanno caratteristiche strutturali chimiche comuni uniformi.

Una molecola è classificata come lipide quando ha caratteristiche idrofobiche e non è solubile in acqua. Questa definizione non raccoglie però tutti i lipidi. Gli acidi grassi, acidi carbossilici a catena carboniosa, tendenzialmente sono insolubili in acqua. Ci sono però delle eccezioni, come l'acido butirrico (o butanoico), che ha un gruppo carbossilico e quattro atomi di carbonio. L'acido butirrico o butanoico è perfettamente solubile in acqua. È quindi un lipide che non soddisfa le proprietà chimico fisiche che si utilizzano per classificare i lipidi.

I lipidi possono essere ulteriormente classificati in lipidi idrolizzabili e lipidi non idrolizzabili. L'idrolizzabilità indica il fatto che nella molecola ci sono legami che possono essere idrolizzati in presenza di acqua. Legami esterei e legami fosfoesterei, che sono normalmente idrolizzabili in acqua.

I lipidi non idrolizzabili sono qui composti che non presentano gruppi funzionali che possono essere scissi in presenza di acqua.

### Lipidi idrolizzabili

I *lipidi idrolizzabili* vengono a loro volta suddivisi in tre grandi famiglie di composti, che sono le **cere**, i **triacilgliceroli** ed i **fosfolipidi**.

Le **cere** sono composti che contengono un legame estereo (idrolizzabile) che fa da ponte tra un acido carbossilico a catena lunga che viene condensato con un alcol a catena lunga. Di norma acido carbossilico ed alcol hanno numero di atomi di carbonio pari.

Gli alcoli a catena lunga vengono ottenuti per riduzione, ad opera di alcol deidrogenasi, a partire dall'acido carbossilico corrispondente, che per via del meccanismo sintetico avrà un numero di atomi di carbonio multiplo di 2.

Il palmitato di micrile è uno dei componenti principali della cera d'api. Le mele producono naturalmente alcuni lipidi che servono a proteggere il frutto dai parassiti. Le cere sono presenti sulla nostra pelle ed hanno un ruolo protettivo.

I **trigliceridi** (triacil gliceroli) sono strutturalmente caratterizzati da una unità di glicerolo, che è un triolo, i cui tre gruppi ossidrilici sono acilati da acidi grassi a catena lunga. Nei trigliceridi abbiamo quindi tre legami esterei, tutti e tre saponificabili e quindi idrolizzabili.

I **fosfolipidi** hanno in comune la presenza di un gruppo fosfato, che può avere sostituenti di vario tipo. Possiamo avere fosfogliceridi se il gruppo fosfato sta su un glicerolo, poi ulteriormente funzionalizzato. Negli sfingolipidi il gruppo fosfato sta su una unità di sfingosina, che è un altro acido grasso.

I fosfogliceridi prevedono che il glicerolo abbia sul C3 il gruppo fosfato, un alcol che esterifica il gruppo fosfato e due catene di acidi grassi esterificate ai gruppi ossidrilici.

La sfingosina è un diolo con due gruppi ossidrilici, di cui il primario è normalmente esterificato col fosfato, ed in posizione 2 c'è un gruppo amminico che può essere acilato. Quando questo gruppo amminico è acilato prende il nome di ceramide. Le ammidi vanno al femminile, quindi le ceramidi. Le ceramidi sono importanti molecole biologiche, come gli sfingolipidi quali le sfingomieline, costituenti della guaina mielinica dei neuroni.

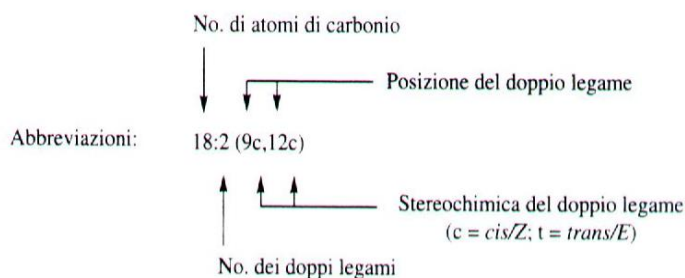
## Gli acidi grassi

Gli acidi grassi presenti in queste biomolecole sono catene carboniose a numero pari di atomi di carbonio, che terminano con un gruppo carbossilico. Nella maggior parte dei casi la catena carboniosa ha un numero pari di atomi di carbonio per via del processo di biosintesi degli acidi grassi.

Gli acidi grassi vengono suddivisi in acidi grassi saturi ed acidi grassi insaturi o poliinsaturi. L'acido grasso più semplice è l'acido butirrico, che contiene 4 atomi di C, legami saturi (singoli) ed il gruppo carbossilico tipico degli acidi grassi.

Gli acidi grassi sono stati inizialmente definiti con nomi in base alla provenienza. La nomenclatura IUPAC come sempre evita fraintendimenti. In ambito nutrizionale si usa spesso una identificazione numerica espressa come 'n° di C : n° di doppi legami'. Ad esempio l'acido butirrico con 4 C e nessun doppio legame è indicato come 4:0.

Gli acidi grassi insaturi o poliinsaturi prevedono un numero pari di atomi di carbonio, un gruppo carbossilico e la presenza di doppi legami. Un acido insaturo interessante dal punto di vista biologico è l'acido palmitoleico 16:1 (9c). Negli acidi grassi il carbonio 1 è il C del gruppo carbossilico, quindi per indicare l'atomo di C in cui si trova il doppio legame si parte a contare dal C1 del gruppo carbossilico.



L'acido linoleico 18:2 (9c, 12c) e l'acido  $\alpha$ -linolenico 18:3 (9c, 12c, 15c) sono acidi grassi essenziali per la nostra alimentazione. Sono essenziali perché precursori di acidi grassi poliinsaturi a catena più lunga, a loro volta essenziali precursori nella sintesi delle prostaglandine.

Gli acidi grassi poliinsaturi sono prevalentemente ritrovati negli oli di origine vegetale e nel pesce. Gli acidi grassi sono componenti dei fosfolipidi, ed i fosfolipidi sono i componenti principali delle membrane biologiche. La membrana cellulare deve essere fluida, e questa fluidità deve essere opportunamente modulata dal sistema biologico. I pesci vivono a temperature inferiori rispetto agli animali a sangue caldo, per cui la loro membrana deve avere una fluidità maggiore per permettere i corretti scambi a basse temperature, e questo viene fatto aggiungendo doppi legami agli acidi grassi che compongono i fosfolipidi di membrana.

Il pesce di allevamento è in parte carente di questi acidi grassi essenziali, perché nutrito con mangimi che non sempre garantiscono la presenza di nutrienti adeguati a favorire la sintesi di acidi grassi poliinsaturi.

Acidi grassi  $\omega$ -3 ed  $\omega$ -6 sono frequentemente nominati. La posizione  $\omega$  fa riferimento alla posizione del doppio legame, iniziando a contare dal carbonio metilico terminale dell'acido grasso. È una nomenclatura utile dal punto di vista nutrizionale, perché facilita il raggruppamento di acidi grassi insaturi essenziali.

I doppi legami sono tutti in configurazione *cis* (con carboni  $sp^2$  legati a due costituenti diversi a coppie, dove i costituenti uguali si trovano dallo stesso lato del doppio legame) perché questo piega la catena carboniosa e ne diminuisce l'interazione (van der Waals) con altre catene carboniose, aumentando la fluidità di membrana (diminuisce il punto di fusione).

Gli animali con gli zoccoli, specialmente quelli che si arrampicano su rocce ghiacciate, devono avere zoccoli flessibili per far presa sulle rocce. Questo è ottenuto modulando la concentrazione di lipidi insaturi negli zoccoli a seconda della stagione.

Sono rilevanti anche acidi grassi poliinsaturi fino a 24 atomi di C. L'acido arachidonico 20:4 (5c, 8c, 11c, 14c), l'acido eicosapentaenoico EPA 20:5 (5c, 8c, 11c, 14c, 17c) e l'acido docosaesaenoico DHA 22:6 (4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c) sono intermedi che derivano dagli acidi grassi essenziali linoleico e linolenico, e sono precursori degli eicosanoidi quali prostaglandine e prostaciline.

### **Lipidi non idrolizzabili**

Tra i lipidi non idrolizzabili troviamo quattro famiglie importanti, che sono le *vitamine liposolubili*, gli *steroidi*, gli *eicosanoidi* ed i *terpeni*.

Strutturalmente molto diversi sia tra le diverse famiglie sia all'interno della stessa famiglia.

Le vitamine liposolubili sono la vitamina D, vitamina A, vitamina E e vitamina K, chiamate così perché quando scoperte si riteneva che il nostro organismo non fosse in grado di sintetizzarle. In realtà alcune vitamine, come la vitamina C, non sono sintetizzate dall'organismo, mentre altre vitamine possono essere sintetizzate, come ad esempio la vitamina D. Altre non vengono sintetizzate dall'organismo, ma dalla flora batterica intestinale, ad esempio la vitamina K. La produzione di alimenti *light* prevede la rimozione della componente lipidica, comprese le vitamine liposolubili, specialmente la vitamina D nei prodotti derivati dal latte.

Gli steroidi hanno strutture policicliche. Ci sono fitosteroli, steroidi di origine vegetale, pubblicizzati come integratori alimentari ma senza evidenze scientifiche. Alcuni fitosteroli sono molto importanti dal punto di vista farmacologico perché intermedi nella sintesi dei contraccettivi orali.

Gli eicosanoidi sono molecole costituite da 20 atomi di carbonio. Il capostipite di questi è l'acido arachidonico. Dal punto di vista biosintetico vengono tutti prodotti da acido linoleico e linolenico.

I terpeni sono prodotti tipicamente vegetali e derivano da un unico monomero. Sono piccole molecole di cui il precursore è l'isoprene, che è un diene coniugato a 5 atomi di C. I terpeni sono composti volatili responsabili di molti aromi e profumi. Molti aromi sono in genere liposolubili, quindi negli alimenti *light* gli aromi vengono rimossi, e sono spesso reintrodotti.

## Le lipasi - Substrati

Le lipasi sono delle idrolasi, questo ci fa pensare che i loro substrati saranno lipidi idrolizzabili. **Bisogna quindi conoscere i lipidi idrolizzabili.**

Le lipasi *in vivo* lavorano su substrati naturali che sono i trigliceridi, che sono triesteri del glicerolo.

La cellula produce diversi trigliceridi, in base agli acidi grassi che si legano al glicerolo.

In base al sostituito che porta il C2 del glicerolo (il C centrale), si può formare uno stereocentro, quando le catene carboniose su C1 e C3 sono differenti.

Se C2 è uno stereocentro si possono generare due stereoisomeri, e vanno quindi usati i descrittori corretti. Attribuire un descrittore IUPAC R o S è difficile perché si deve attribuire la priorità ai sostituenti, e questi sostituenti sono molto simili, per cui per trovare una differenza si deve andare avanti nella catena carboniosa.

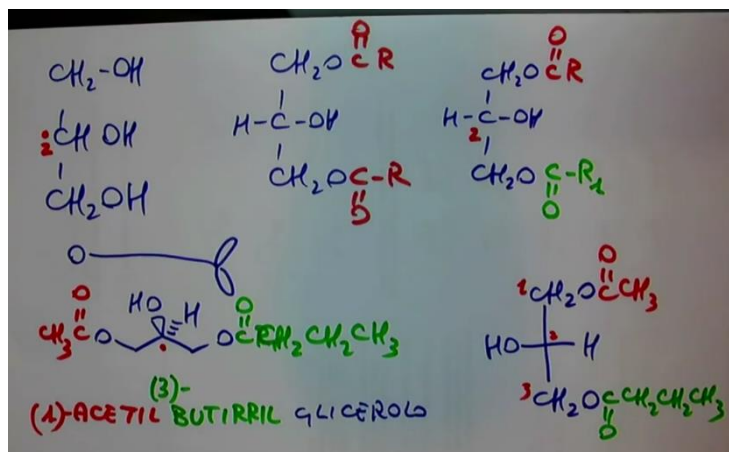
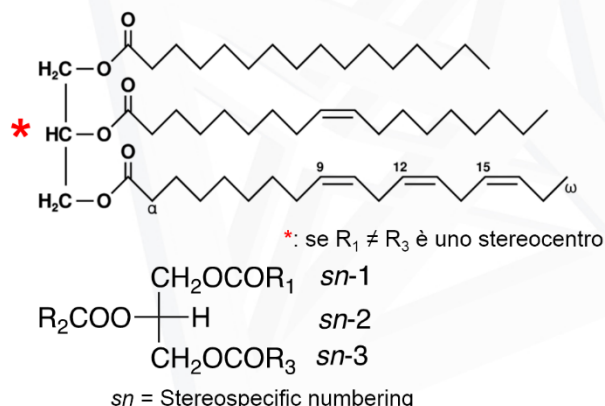
I descrittori D e L di Fischer sono anch'essi difficili da utilizzare. Nella proiezione di Fischer si deve mettere il C più ossidato in alto, ma l'ossidazione di C1 e C3 nel trigliceride è uguale. Anche questi descrittori quindi non sono adeguati.

La nomenclatura dei trigliceridi e dei derivati del glicerolo prende il nome di *stereospecific numbering*. Quando si utilizza questa descrizione stereochimica, il numero dell'atomo di carbonio è preceduto dalle lettere 'sn' minuscole in corsivo. Questa definizione di nomenclatura ci dice di rappresentare il trigliceride in posizione di Fischer facendo in modo che il gruppo funzionale presente sul C2 sia posto sulla sinistra (come da immagine).

In questo modo i trigliceridi vengono nominati facilmente (vai a cercare risorse su questa nomenclatura).

Il glicerolo è una molecola achirale, il C 2 del glicerolo (carbonio centrale) è prostereogenico. Se i carboni primari (C 1 e C 3) del glicerolo vengono modificati inserendo come sostituenti degli acidi grassi uguali, dando un digliceride, il digliceride è achirale ed il C2 resta prostereogenico. Se però i due sostituenti sono acidi grassi diversi si otterrà una molecola chirale, con il C 2 che sarà un centro stereogenico. Si potrà quindi ottenere una coppia di enantiomeri.

Grassi (solidi) ed olii (liquidi) sono triesteri del glicerolo con gli acidi grassi



I trigliceridi possono quindi essere chirali oppure no, in base alle catene carboniose che esterificano i due ossidrili primari.

Le lipasi sono stereospecifiche e regiospecifiche. Le lipasi *in vivo* idrolizzano i trigliceridi in metaboliti che vengono poi degradati oppure rientrano nel ciclo della biosintesi di trigliceridi e fosfolipidi.

I trigliceridi sono abbondanti sia nel regno vegetale che animale. I trigliceridi vegetali sono generalmente più ricchi di insaturazioni nelle catene di acidi grassi, quindi a temperatura ambiente sono liquidi e sono normalmente chiamati oli. I trigliceridi animali sono generalmente solidi per via del basso grado di insaturazione, e sono chiamati grassi. Dal punto di vista nutrizionale sono preferibili gli oli.

Anche l'olio di palma è una miscela di trigliceridi a basso grado di insaturazione, per questo è molto viscoso a temperatura ambiente.

## Le lipasi

Le lipasi sono delle triacilglicerol-esterasi. *In vivo* sono altamente specifiche per l'idrolisi dei legami esterei dei trigliceridi. Sono enzimi fondamentali nell'idrolisi dei grassi assunti con la dieta, sono per questo enzimi ubiquitari. Sono enzimi con un forte potenziale biotecnologico.

Le lipasi sono caratterizzati da una triade catalitica di tre amminoacidi altamente conservati che forniscono dei gruppi funzionali necessari all'attività catalitica. Questi gruppi funzionali sono un *gruppo ossidrilico* fornito da una *serina*, un *gruppo carbossilico* fornito da un residuo di *acido aspartico* o da un residuo di *acido glutammico*, e da un residuo di *istidina* con i suoi atomi di azoto che possono comportarsi da acido o da base.

Tra i settori industriali che utilizzano le lipasi troviamo l'industria oleo-chimica, compreso il biodiesel. Troviamo le lipasi nei detersivi, per idrolizzare lipidi nello sporco. Questi enzimi sono utilizzati nell'industria dei polimeri, per condensare i polimeri quali i poliesteri (policaprolattone, acido polilattico).

L'industria del cibo utilizza le lipasi. L'industria farmaceutica utilizza le lipasi, ad esempio nella risoluzione dell'ibuprofene.

## Caratteristiche delle lipasi

Le lipasi sono caratterizzate da una triade catalitica formata da amminoacidi nucleofili quali *serina*, *istidina* e *aspartato/glutammato*. Questi amminoacidi sono conservati in tutte le lipasi note. L'unica variazione trovata è la sostituzione dell'aspartato con il glutammato, entrambi amminoacidi che comunque garantiscono la presenza di un gruppo carbossilico in catena laterale, che partecipa al meccanismo catalitico. Le lipasi possono essere classificate come *serin-idrolasi*, che utilizzano la serina come nucleofilo.

Le proteasi, che catalizzano l'idrolisi del legame ammidico, hanno meccanismi catalitici più variabili rispetto alle lipasi. Le proteasi possono essere delle cistein-proteasi, in cui il gruppo tiolico fa da nucleofilo nel meccanismo catalitico; ci sono anche le serin-proteasi con gruppo idrossilico, le metallo-proteasi con ioni metallici a catalizzare, e le carbossil proteasi con un gruppo carbossilato.

Gruppo estereo e gruppo ammidico sono gruppi funzionali altamente correlati, perché entrambi derivano dal gruppo carbossilico, con la differenza che il carbonile è sostituito dall'ossigeno negli esteri e dall'azoto nelle ammidi. Chimicamente la reattività è quindi analoga, risulta quindi fonte di interesse il fatto che le

lipasi utilizzino esclusivamente la *serina* come nucleofilo, mentre nelle proteasi ci sia maggior variabilità nei meccanismi.

Negli anni si è provato a sostituire nelle lipasi, in maniera sito diretta, la *serina* del sito catalitico con la *cisteina*. Lo zolfo della cisteina è più nucleofilo dell'ossigeno, per cui ci si aspetterebbe un maggiore attività. Gli esperimenti hanno invece mostrato come l'enzima risulti poco attivo o inattivo dopo la mutazione. La triade catalitica è quindi fondamentale per la reattività.

Interessante il fatto che nelle lipasi, in prossimità della serina del sito catalitico, troviamo una sequenza conservata Glicina/Alanina-X-Serina-X-Glicina, dove X è un qualunque aminoacido.

La gran parte delle lipasi hanno una struttura con un lid (coperchio). Le lipasi sono idrolasi della famiglia  $\alpha/\beta$ .

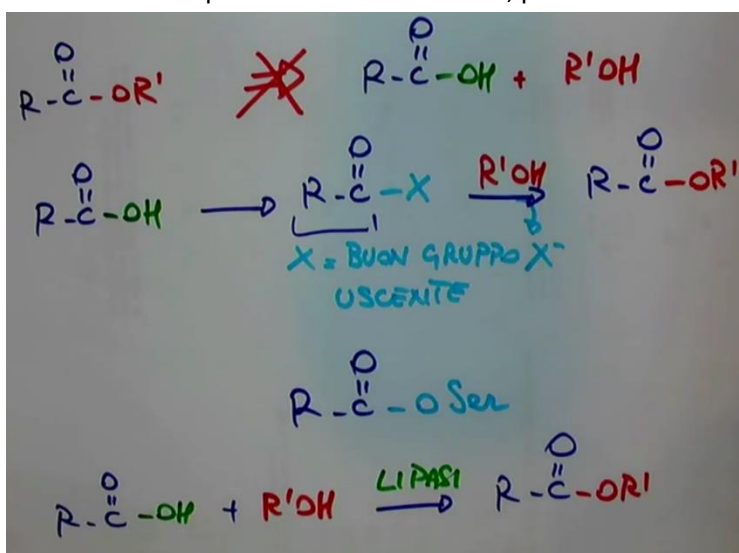
Le lipasi *ex vivo* possono accomunare substrati molto diversi rispetto al substrato naturale, che sono i trigliceridi. I trigliceridi hanno una struttura basata sul glicerolo legato a 3 acidi grassi a catena lunga; le lipasi sono in grado di lavorare anche su dei carboidrati, che sono molecole idrofile che non possiedono lunghe catene carboniose. Si è visto che le lipasi sono in grado di operare sui legami esterei presenti sui carboidrati.

Nonostante la bassa specificità di substrato riescono a mantenere le caratteristiche tipiche degli enzimi, quali stereoselettività e regioselettività.

*In vivo* le lipasi catalizzano la reazione di idrolisi del legame estereo in presenza di una molecola di acqua, che da come prodotti un gruppo acido ed un gruppo alcolico. Il  $\Delta G$  di questa reazione è circa 0, il che vuol dire che la reazione può essere effettuata in entrambi i sensi dall'enzima, quindi sia idrolisi che sintesi. Per questo motivo le lipasi possono anche essere utilizzate *ex vivo* per la sintesi, ad esempio nella sintesi del biodiesel. Il complesso enzima-substrato è considerato un ottimo agente acilante.

Supponiamo di voler sintetizzare un estere chimicamente. La sintesi di un estere non può avvenire in maniera efficiente facendo reagire un acido carbossilico con il corrispondente alcol, a meno che non si usi un catalizzatore acido, utilizzando quindi le condizioni di esterificazione di Fischer. La reazione di Fischer è una reazione di equilibrio, quindi non è un processo efficiente per un utilizzo industriale, perché si ottiene una miscela in equilibrio di diestere, acido carbossilico ed alcol. Per ottenere un estere non è quindi una buona idea partire da acido carbossilico libero ed alcol, e non si utilizza come metodo di produzione industriale, tranne nella produzione di surfattanti, con l'esterificazione di Fischer.

Quello che si può fare per ottenere un estere è partire dall'acido carbossilico e trasformarlo in un derivato attivato, in cui il gruppo X è un gruppo uscente. In seguito alla reazione con l'alcol si potrà ottenere in



maniera efficiente l'estere di interesse. Servono quindi due passaggi di reazione e purificazione.

Durante il processo catalitico l'acido carbossilico, in una delle fasi, si trova legato all'enzima, nello specifico alla serina del sito attivo. La serina si comporta in maniera equivalente ad un gruppo uscente, per cui il complesso enzima-substrato è chimicamente equivalente ad un agente acilante ottenuto per via chimica. Questo significa che a partire dall'acido carbossilico, nella miscela di reazione con l'alcol, la lipasi permette in una unica reazione di avere l'attivazione dell'acido carbossilico e la catalisi della reazione di condensazione con l'alcol.

*In vivo* la lipasi catalizza la reazione di idrolisi dei trigliceridi. *In vitro* la lipasi è in grado di eseguire molte reazioni, e sono particolarmente efficienti.

Le lipasi possono eseguire reazioni di idrolisi del legame estere, anche su composti che non sono dei trigliceridi.

Si può effettuare la reazione opposta all'idrolisi, cioè l'esterificazione.

La lipasi può eseguire una reazione di alcolisi, in cui l'idrolisi del legame estereo avviene non grazie ad una molecola d'acqua, ma con un nucleofilo diverso, che è un alcol. Si ottiene così un nuovo estere ed un altro alcol.

La lipasi può effettuare una reazione di acidolisi, partendo sempre da un estere ed utilizzando come nucleofilo un secondo acido carbossilico (il nucleofilo è l'ossidrilico del carbossile). Si ottiene un nuovo estere ed un nuovo acido grasso libero.

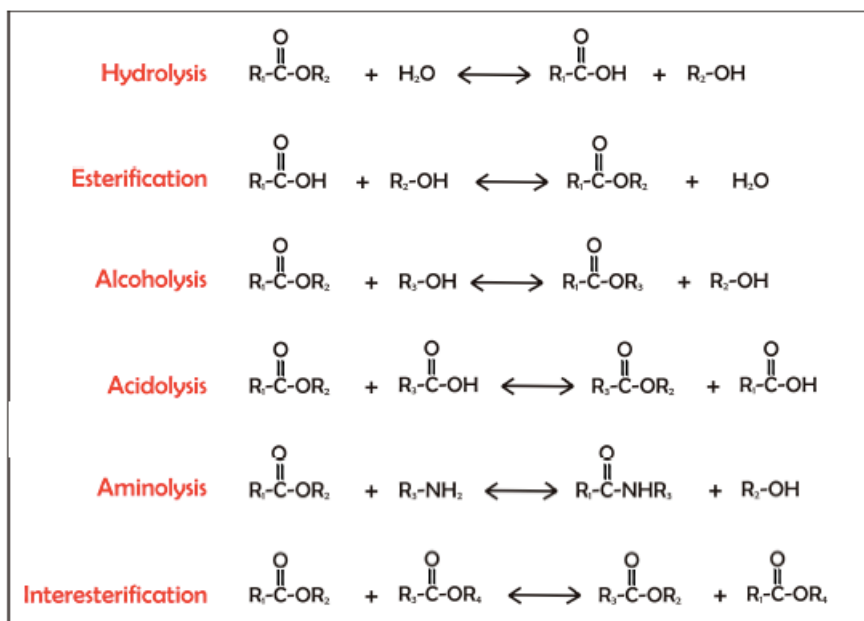
La lipasi può anche eseguire una reazione di aminolisi, dove dall'estere di partenza si ottiene una ammina, rilasciando l'alcol come gruppo uscente. L'utilizzo di un nucleofilo diverso, come una ammina, ci mostra come la lipasi sia un enzima molto versatile.

La lipasi può eseguire reazioni di trans-esterificazione, in cui si parte da due esteri e si scambia il gruppo alcolico tra i due, ottenendo degli esteri diversi.

### La triade catalitica

La triade di aminoacidi fondamentali nel sito catalitico sono quelli che permettono la reazione catalizzata dalla lipasi.

L'acido aspartico e l'acido glutammico possiedono un gruppo carbossilico in catena laterale, basico nelle condizioni di reazione, quindi sotto forma di carbossilato.





L'istidina ha come catena laterale un anello imidazolico, con due atomi di azoto di cui uno basico e l'altro acido, che è fondamentale per il meccanismo catalitico della lipasi.

Troviamo anche una Serina catalitica che si trova con il gruppo ossidrilico in forma protonata (OH normale).

L'enzima presenta questi tre amminoacidi disposti in modo tale che possa essere garantito il passaggio di elettroni e protoni tra lo ione carbossilato (basico) e l'azoto acido dell'istidina, che influenza l'attività dell'azoto basico e quindi va a generare un ottimo nucleofilo sulla serina catalitica tipica delle serina idrolasi.

Si scatena un passaggio di protoni ed elettroni che fanno sì che avvenga il meccanismo catalitico, che prevede una serie di stadi.

## Idrolisi

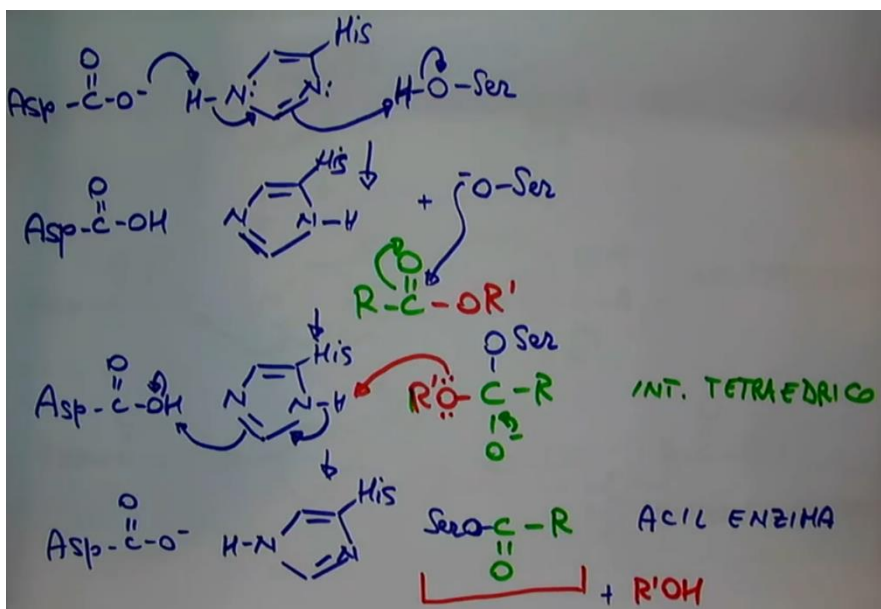
L'*aspartato*/*glutammato* si trova nella forma basica. L'*istidina* ha un anello imidazolico con un azoto basico ed un azoto acido. Dato che il carbossilato dell'aspartato è in forma basica, l'azoto acido si troverà vicino al carbossilato. L'altro azoto dell'anello imidazolico dell'istidina ha carattere basico per via del doppietto elettronico libero, ed interagisce debolmente con il gruppo ossidrilico della *serina*, il quale ha carattere acido. Anche l'azoto a carattere acido ha un doppietto elettronico libero, ma questo è stabilizzato dalla risonanza.

La reazione catalizzata dalle lipasi prevede un attacco nucleofilo da parte della serina sul gruppo carbonilico dell'estere. Il gruppo ossidrilico della serina non è però un buon nucleofilo, perché protonato.

Sappiamo che convertendo il gruppo alcolico della serina in gruppo alcossido (O con carica negativa per perdita del protone), le caratteristiche nucleofile migliorano. Aspartato ed istidina della triade, attraverso un trasferimento di elettroni e protoni, fanno in modo che la serina con il suo idrossile venga trasformata nell'alcolato, ottimo nucleofilo.

L'aspartato si prende il protone acido dell'istidina e gli elettroni

del legame NH dell'anello imidazolico dell'istidina si sposteranno tra l'N ed il C. Il C non può avere più di quattro legami, per cui utilizza gli elettroni per legare l'H del gruppo OH della serina. Gli elettroni del legame OH passano sull'O che diventa O<sup>-</sup>, e si otterrà l'alcolato con lo ione alcossido. La serina è adesso nucleofila.

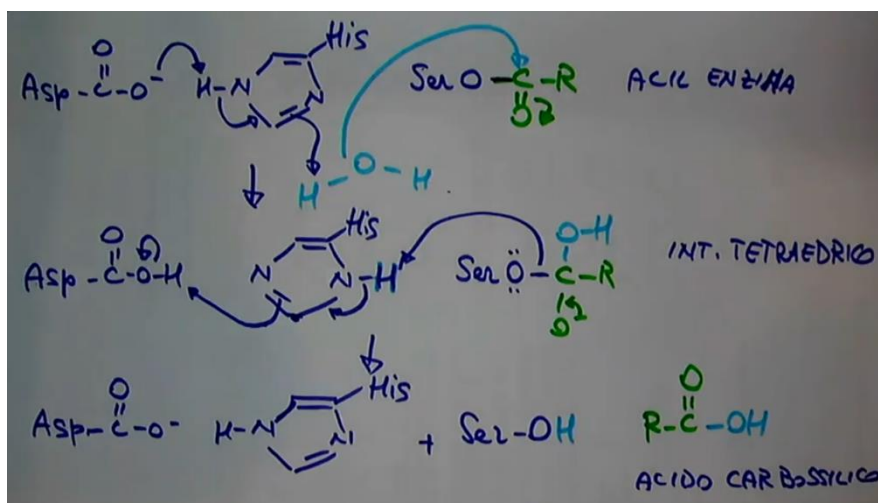


In presenza di un gruppo estereo, la serina darà attacco nucleofilo sul gruppo carbonilico, che è elettronepovero, e dà luogo ad un intermedio tetraedrico. L'intermedio tetraedrico non è stabile; per stabilizzarsi si deve riformare il doppio legame C=O del gruppo carbonilico, con l'uscita del miglior gruppo uscente.

L'alcolato è un gruppo uscente peggiore del corrispondente alcol. A questo punto partecipano nuovamente gli altri due amminoacidi della triade catalitica. L'O del gruppo estereo viene protonato dall'azoto acido dell'istidina, che ora è in posizione opposta rispetto all'inizio della reazione. Sull'anello imidazolico dell'istidina gli elettroni del legame NH si spostano sul carbonio adiacente, formando un doppio legame. L'eccesso di carica sull'N basico dell'anello imidazolico dell'istidina strappa il protone all'aspartato (quello che era stato precedentemente donato dalla stessa istidina all'aspartato) e si ritorna alla configurazione iniziale della triade, mentre viene catalizzata la rottura del legame estereo e la formazione del gruppo carbonilico sul prodotto di reazione, che resta legato all'O della serina. Questo intermedio di reazione legato alla serina prende il nome di **acilenzima**.

L'acilenzima è un ottimo agente acilante, che può trasferire un gruppo acilico a qualsiasi nucleofilo. In vivo avviene normalmente l'idrolisi dell'intermedio acilenzima, in cui il nucleofilo è l'acqua.

L'acqua in realtà non è un buon nucleofilo, ma lo è la sua specie carica, lo ione idrossido. Anche a questa trasformazione contribuiscono aspartato ed istidina della triade catalitica. L'aspartato strappa il protone acido all'N dell'anello imidazolico dell'istidina, gli elettroni di legame si spostano sul carbonio adiacente e l'azoto attiva l'acqua strappando un H.



L'N è normalmente meno elettronegativo dell'O, quindi in condizioni normali non strapperebbe l'H all'acqua. Probabilmente il fatto che N dell'imidazolo leva un H all'H<sub>2</sub>O è dovuto al fatto che c'è un eccesso di carica negativa sull'N dovuto al fatto che l'aspartato leva un H all'N acido dell'imidazolo, e gli elettroni si ridistribuiscono sull'anello imidazolico, rendendo l'N elettronegativo.

La prof dice "non si forma uno ione idrossido, ma si ha attivazione dell'acqua come ione alcossido che attacca il C carbonilico". Non capisco come sia possibile. Se deprotono l'H<sub>2</sub>O ottengo un OH<sup>-</sup> che è un radicale idrossido. Lo ione alcossido richiede un gruppo R legato ad un O<sup>-</sup> per essere definito tale (da <http://goldbook.iupac.org/terms/view/A00225>). Come fa una H<sub>2</sub>O deprotonata ad OH<sup>-</sup> essere un alcossido? Forse ha dato per scontato qualche passaggio che per me non è scontato.

Comunque qui proseguo dando per corretto quanto dice la prof.

L'acqua attivata (alcossido secondo la prof, o idrossido???) attacca il C carbonilico dell'acilenzima, per dar luogo ad un nuovo intermedio tetraedrico, che comprenderà l'OH.

L'intermedio tetraedrico non è stabile, quindi cerca di riformare il carbonile, lasciando uscire il miglior gruppo uscente. Il gruppo uscente è la serina legata al C, di cui l'O leva l'H all'anello imidazolico dell'istidina. Gli elettroni di legame passano al carbonio adiacente. L'eccesso di carica negativa sull'N opposto dell'anello imidazolico permette all'N di strappare l'H all'aspartico che verrà convertito in aspartato.

Si sarà ripristinata la serina col suo gruppo OH, gli altri due gruppi funzionali della triade e si otterrà il prodotto della reazione, che in questo caso è un acido carbossilico.

Il meccanismo di idrolisi del legame estereo da parte delle lipasi prevede la formazione di un intermedio acilenzima, che poi può essere attaccato da un nucleofilo; in vivo il nucleofilo è l'acqua.

L'intermedio acil enzima può essere utilizzato come specie acilica attivata da legare ad un nucleofilo. Il nucleofilo scelto per la reazione, in presenza di lipasi e di un composto iniziale quale un estere, viene trasformato nel prodotto tramite acilazione.

### **Transesterificazione**

Una reazione molto interessante prende il nome di transesterificazione. In questa reazione, partendo da un estere ed utilizzando come nucleofilo un alcol, si ottiene un secondo estere.

La reazione parte sempre da un estere. Si ha il passaggio di elettroni e protoni che attiva la serina legata all'OH, a cui viene strappato l'H e diventa serina-O<sup>-</sup>.

La serina nucleofila attaccata l'estere substrato sul carbonio carbonilico, dando luogo ad un intermedio tetraedrico instabile. Il gruppo R-O dell'estere lega l'H dell'istidina ed esce come alcol R-OH, e si forma l'intermedio acilenzima.

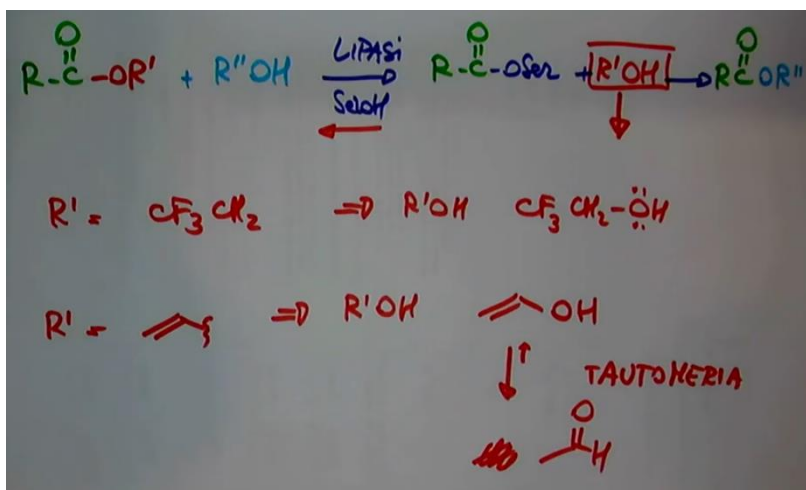
Nella trans esterificazione il nucleofilo è un alcol. Ossidril OH dell'alcol non è un buon nucleofilo. L'H dell'alcol viene strappato dall'N dell'imidazolo in seguito al trasferimento di elettroni e del protone dall'imidazolo all'aspartato. L'R-O<sup>-</sup> formatosi attacca il carbonio dell'acilenzima e si forma un nuovo intermedio tetraedrico.

L'intermedio tetraedrico è instabile. L'imidazolo dell'istidina protona la serina-O che si stacca dall'intermedio come serina-OH, rigenerando l'aminoacido di partenza. Si ha il trasporto di protoni ed elettroni sugli altri due amminoacidi della tetraide. Viene rilasciato il prodotto, che è un estere diverso da quello di partenza. Si ha effettivamente uno scambio di gruppo alcolico.

Nella reazione, dopo la formazione dell'intermedio acilenzima, si ha l'uscita di un alcol. Bisogna evitare che questo alcol rientri nella reazione e reagisca con l'intermedio tetraedrico dando nuovamente l'estere di partenza. Per riuscire in questo, l'estere di partenza va studiato in modo tale che possano esserci fattori elettronici o una reazione di equilibrio che facciano sì che il gruppo uscente non si comporti più da nucleofilo. Dobbiamo quindi rendere irreversibile la nostra reazione.

Un metodo che sfrutta l'effetto elettronico è usare come gruppo R' (quindi il gruppo che si trova attaccato al carbonile ed esce in seguito alla formazione dell'acilenzima) un gruppo trifluoroetilico  $\text{CF}_3\text{CH}_2$ . L'alcol uscente sarà quindi  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$ . La presenza dei tre atomi di fluoro fortemente elettronegativi attrae elettroni e rende l'O di questa molecola meno elettronegativo dell'alcol R''OH, che vogliamo dia luogo all'estere finale. Usando quindi alcol trifluorietilico evitiamo che si rigeneri l'estere di partenza, perché si formerà solo l'estere con l'O più elettronegativo, quello dell'alcol da noi inserito.

L'alternativa a questo è fare in modo che l'alcol uscente porti come R' una struttura vinilica. Se R' è un vinile, R'OH sarà un enolo, che non è stabile e tenderà ad assumere la forma carbonilica, diventando una aldeide (acetaldeide). In questo modo non appena si forma l'alcol uscente questo tautomerizza nell'aldeide corrispondente e rendendo di fatto la reazione irreversibile.



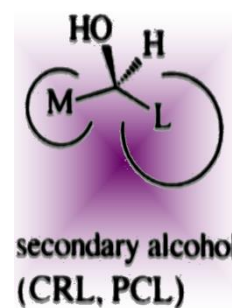
La catena R' dell'estere di partenza è quindi da scegliere attentamente per riuscire ad avere una reazione efficiente.

Se la serina-O dovesse attaccare il gruppo carbonilico dell'aldeide ottenuta dalla tautomerizzazione, si formerebbe un intermedio tetraedrico dove il miglior gruppo uscente sarebbe la serina-O, per cui si rigenererebbe la situazione di partenza.

Le lipasi sono enzimi stereoselettivi, per questo è importante ricordare la regola di Kazlauskas, la quale dice che l'enzima opera preferenzialmente in maniera stereoselettiva quando lo stereocentro che lega l'OH dell'alcol lega anche un sostituito *large* ed un sostituito *medium*.

La selettività è data quindi dalla differenza nell'ingombro sterico dei sostituenti allo stereocentro, che determina una certa posizione del substrato all'interno del sito catalitico dell'enzima.

Kazlauskas ha fatto degli esperimenti con substrati modificati. Si è accorto che esteri derivati del mentolo erano selezionati molto bene dalle lipasi. Il mentolo ha 3 stereocentri, uno dei quali porta come sostituenti un ossidrilico secondario, un idrogeno e due catene sostituenti, una *medium* M ed una *large* L.



Il ricercatore ha usato entrambi gli enantiomeri come substrato della lipasi, accorgendosi del fatto che uno veniva idrolizzato, mentre l'altro rimaneva inalterato.

Successivamente sono stati sintetizzati analoghi del mentolo, introducendo al posto del gruppo carbonilico  $\text{C}=\text{O}$ , un gruppo con una reattività tale da poter subire l'attacco della serina nucleofila dalla lipasi, ma sufficientemente stabile da non proseguire ulteriormente nel meccanismo catalitico. Un gruppo funzionale interessante da questo punto di vista sono i fosfocloruri, con doppio legame  $\text{P}=\text{O}$  e un legame estereo al gruppo alcolico dell'alcol, che portano un atomo di Cl.

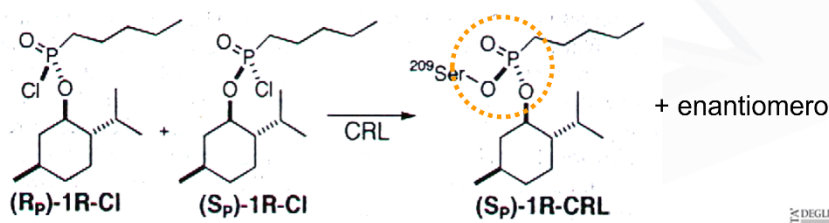
Il legame P=O si comporta in maniera simile a C=O, in quanto il P può subire attacco nucleofilo, in questo caso da parte della serina nucleofila della triade catalitica della lipasi. Si forma quindi un intermedio catalitico simil-tetraedrico. La carica negativa presente sull'O viene stabilizzata per formazione del doppio legame ed esce il miglior gruppo uscente, che è il Cl.

I legami P-O non sono dei legami C-O e sono più stabili, quindi quando si forma l'intermedio acilenzima con substrati di questo tipo la reazione non procede oltre.

Questo intermedio acilenzima con il substrato fosfato legato è stato analizzato con la cristallografia a raggi X per comprendere la disposizione del substrato nel sito attivo.

Usando i due enantiomeri fosfati legati all'enzima si è osservato che: in un caso l'O alcolico che agisce da gruppo uscente con il procedere della reazione si è ritrovato molto vicino all'idrogeno dell'istidina che deve protonarlo. L'O alcolico non esce come alcolato, ma come alcol, e deve essere quindi protonato. Se questo ossigeno è vicino all'H dell'istidina può fare prima un legame ad idrogeno e poi strappare il protone all'istidina. Nell'altro caso la distanza tra lo stesso O e l'H dell'istidina è maggiore, per cui non si può formare il legame idrogeno, non si può verificare il trasferimento di H dall'istidina all'O e quindi la reazione non può avvenire. Questo spiega l'elevata selettività delle lipasi verso uno solo degli enantiomeri.

*Da ricordare quindi il fatto che la sostituzione del gruppo carbonilico con un gruppo fosfato ha permesso di evitare l'idrolisi e mantenere il substrato all'interno del sito attivo dell'enzima, dove è stato poi studiato da un punto di vista strutturale per comprenderne la relazione con il sito catalitico.*



Le lipasi sono anche enzimi regioselettivi. La regioselezione non è ottenibile per via chimica. Immaginando di lavorare su substrati naturali, quindi trigliceridi, questi possono essere idrolizzati mediante idrolisi basica, mediante il processo di saponificazione. Si ottengono i corrispondenti Sali carbossilati (di sodio se usiamo la soda, di potassio se usiamo la potassa), ma non si possono distinguere la posizione del gruppo estereo idrolizzato.

Se si utilizzano le lipasi si può avere regioselezione. Le lipasi possono essere totalmente aspecifiche, quindi alla pari della catalisi chimica, oppure specifiche per le posizioni primarie (1 e 3) oppure secondarie (2), del trigliceride.

I monoacil gliceroli con il legame estereo in posizione 2 in realtà vengono utilizzati dall'organismo come donatori di acido grasso, da trasferire su altre molecole, dando luogo ad una transesterificazione. Il nostro organismo riesce quindi a metabolizzare o glicerolo ed acidi grassi come molecole separate, oppure 2-acilgliceroli.

Le lipasi normalmente utilizzate in ambito industriale, sono o totalmente aspecifiche oppure specifiche per le posizioni 1 e 3. Se produciamo industrialmente 2-acilgliceroli per mezzo delle lipasi, questi monoacil gliceroli portano alla migrazione del gruppo acilico.

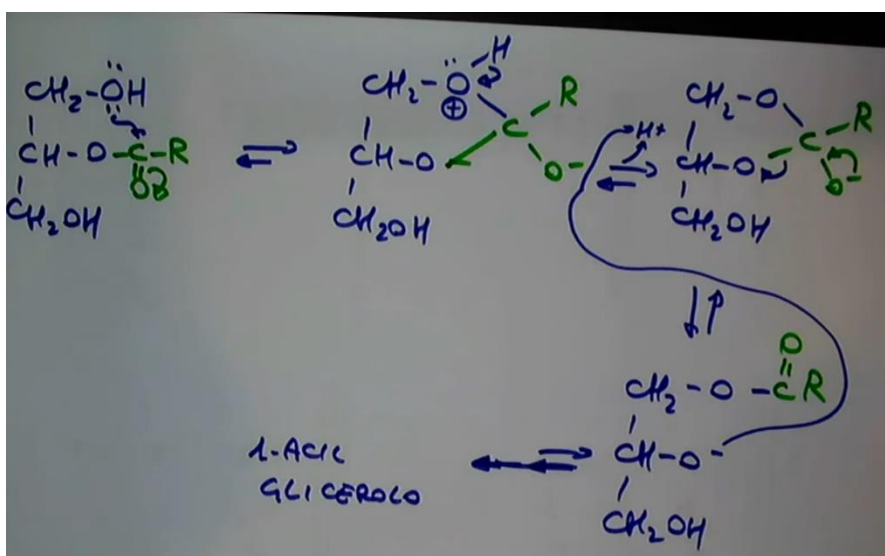
I 2 acil gliceroli (monoacil glicerolo in posizione 2) non sono stabili e si convertono in 1 acil gliceroli. Lo stesso avviene per gli 1,2 acilgliceroli, che per migrazione portano agli 1,3 diacil gliceroli. Il gruppo acilico in posizione 2 non è stabile.

Si ha una reazione intramolecolare per cui succede che l'O dell'OH del monogliceride si trova molto vicino al gruppo carbonilico dell'acile legato con legame estere al glicerolo. In una reazione di equilibrio questo O fa attacco nucleofilo sul carbonile, rompendo il doppio legame del carbonile. L'O del carbonile assume una carica negativa, mentre l'O dell'OH assume una carica positiva perché ha condiviso uno dei suoi doppietti.

Si forma un intermedio ciclico formato da 5 atomi. I cicli a 5 sono cineticamente favoriti, per cui si forma molto facilmente. Questo intermedio in questo caso ha una carica positiva ed una negativa.

La prima che si stabilizza è la carica positiva, strappando il doppietto di legame all'H ad esso legato, e viene rilasciato  $H^+$ .

Si deve stabilizzare la carica negativa. Può succedere che l'O negativo forma nuovamente il doppio legame, e deve quindi rompersi un legame. Può rompersi il legame all'O appena formato, ed in questo caso si torna al prodotto di partenza, oppure può rompersi il legame sull'O che formava un legame estereo con l'acile originariamente, per cui si avrà un trasferimento dell'acile da una posizione a quella vicina sul glicerolo.



La carica negativa sull'O<sup>-</sup> si stabilizza acquisendo un  $H^+$  dalla soluzione.

L'1-acil glicerolo è più stabile da un punto di vista termodinamico rispetto al 2 acil glicerolo, perché il gruppo acilico risente di minore ingombro sterico se si trova sul C1, perché porta un ossidrile primario.

Tutte queste reazioni che chimicamente sembrano in equilibrio sono in realtà spostate verso l'1-acil glicerolo, perché più stabile. Se al livello industriale si produce 2-acilglicerolo, questo porta a migrazione del gruppo acilico dando luogo a 1-acil glicerolo. La migrazione può avvenire ogni qual volta si ha un C primario libero ed un acile sul C2, che migrerà sul C primario.

Bisogna tenere a mente questo meccanismo che porta alla modificazione del prodotto.

### Prodotti ottenuti con le lipasi.

Le lipasi vengono usate per ottenere trigliceridi di rilevanza industriale, con una composizione specifica.

Nei casi presentati, il trigliceride ha una o due catene lunghe oppure una o due catene corte.



Ciò vuol dire che questi trigliceridi hanno un basso contenuto calorico.

Gli oli da cucina sono stati studiati per avere un punto di fumo elevato e per avere un basso potere calorico.

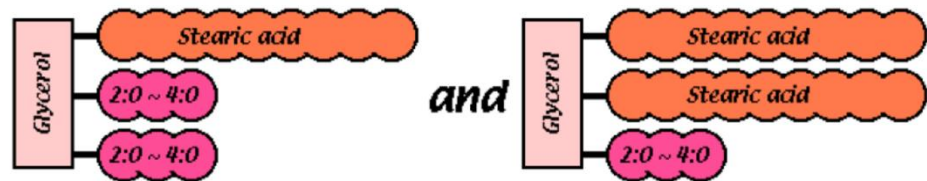


Figure 5-2-1: Salatrim.

Altri esempi sono

trigliceridi con composizione specifica utilizzati nel latte artificiale. Altri sono equivalenti del burro di cacao. Il burro di cacao è usato nell'industria chimica e cosmetica. È inoltre usato nell'industria alimentare. Sostituti per l'industria alimentare possono essere sintetizzati ad hoc.

La migrazione dell'acido grasso può in alcuni casi essere desiderata dall'industria. Si possono quindi usare lipasi 1 e 3 specifiche per ottenere 2 acil glicerolo, che si trasformerà in 1 acilglicerolo, che è un ottimo emulsionante in campo alimentare, estetico e farmaceutico.

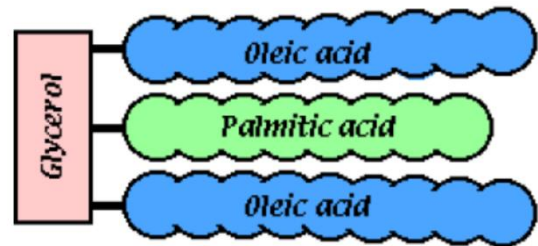


Figure 5-2-4: Betapol<sup>TM</sup>

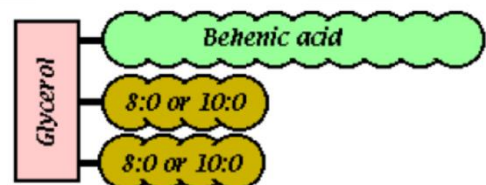


Figure 5-2-2: Caprenin

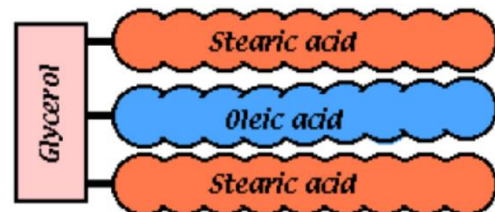


Figure 5-2-5: Cocoa butter equivalent (CBE)