

Lezione 7

Metodi per la separazione di stereoisomeri.

Ci sono diversi metodi per la separazione di stereoisomeri.

- Separazione di diastereoisomeri
 - Metodi cromatografici
 - Cristallizzazione
 - Distillazione
- Miscele di enantiomeri (risoluzione racemi)
 - Metodi fisici
 - Cromatografia in ambiente chirale
 - Metodi chemoenzimatici
 - Derivatizzazione chirale con agenti chirali
 - Risoluzione cinetica e risoluzione dinamica (per via chimica o biocatalitica)

Diastereoisomeri

Al livello industriale è possibile avere metodi di HPLC per la separazione (scala preparativa).

I diastereoisomeri hanno proprietà fisiche diverse, per cui si può sfruttare la differenza di solubilità tra i diastereoisomeri per separare i prodotti. Si può usare quindi la cristallizzazione, che se funziona è un metodo estremamente conveniente. Questo vale se il prodotto è in stato solido.

Con prodotti in fase liquida si può usare la distillazione per separare i diastereoisomeri. Si usa la distillazione frazionata, in base ai punti di ebollizione.

La distillazione richiede normative di sicurezza particolari, quindi in scala industriale sono richiesti costi aggiuntivi per i locali e strumentazioni adatte.

Miscele di enantiomeri

Miscele di enantiomeri possono essere separati con vari metodi.

- Metodi fisici
 - Cromatografia in ambiente chirale
- Metodi chimici e chemoenzimatici
 - Derivatizzazione con agenti chirali
 - Risoluzione cinetica e risoluzione dinamica (per via chimica o biocatalitica).

La cromatografia si può effettuare su scala preparativa. Aumentano i costi per la dimensione delle strumentazioni e per la gestione.

Risoluzione mediante derivatizzazione

Ipotizziamo di essere nella condizione peggiore di miscela di enantiomeri: il racemo.

Ci interessa solo uno dei due enantiomeri.

Nella risoluzione mediante derivatizzazione chirale il racemo viene fatto reagire con un composto chirale enantiomericamente puro. Si ottengono prodotti che sono diastereoisomeri e potranno essere separati.

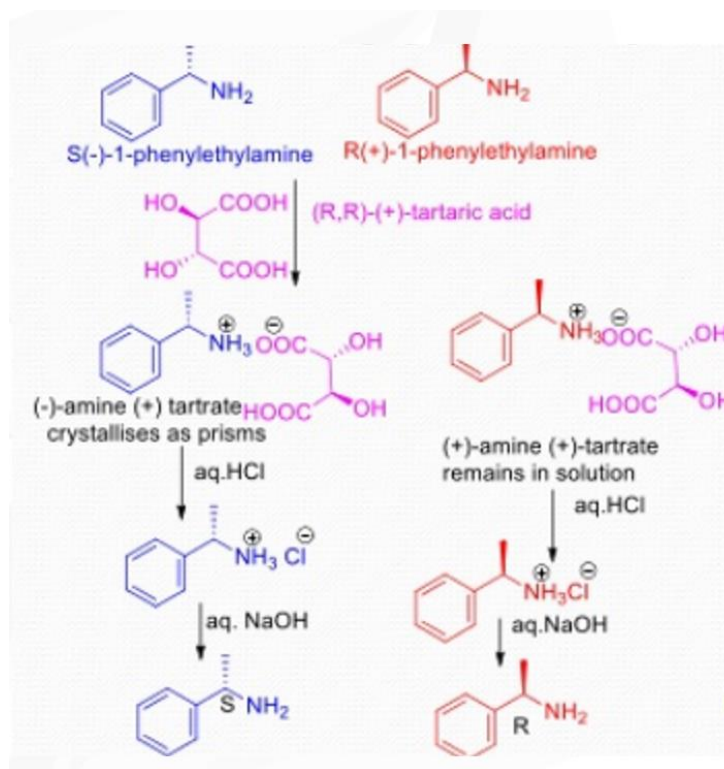
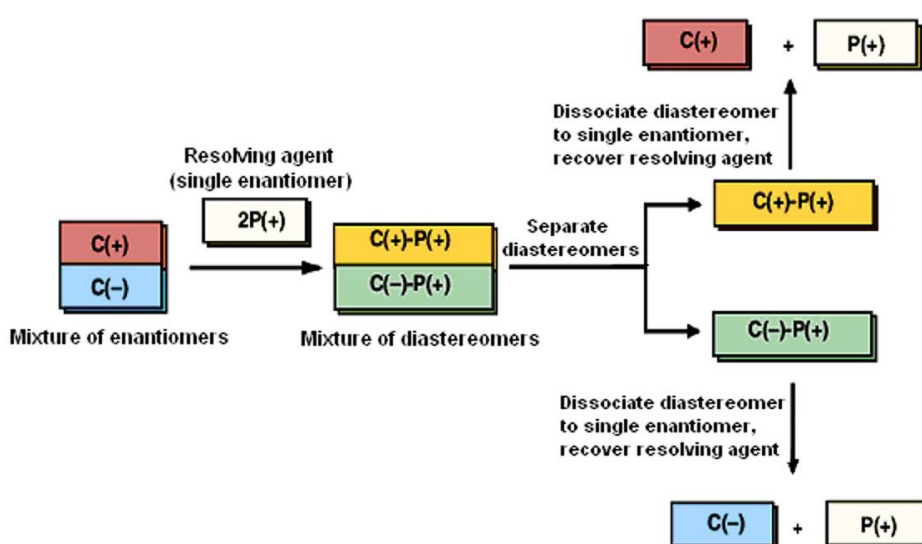
Lo schema generale di questo metodo è qui rappresentato.

Partiamo da una miscela di enantiomeri. Si fa reagire con un agente di risoluzione chirale enantiomericamente puro. Si formano così i diastereoisomeri, che sono agevolmente separabili. Serve però il prodotto, quindi l'agente di risoluzione va separato dall'analita.

Importante è quindi che l'agente di risoluzione sia separabile dall'analita per riottenere il prodotto di partenza.

Da un punto di vista chimico le reazioni più convenienti che permettono di ripristinare il prodotto iniziale sono le reazioni di salificazione con acidi e basi. I sali possono essere idrolizzati e riportati alla struttura iniziale con la sola variazione di pH.

Immaginiamo di avere una coppia di enantiomeri con gruppi basici, ad esempio delle ammine. Si fanno reagire con un acido carbossilico enantiomericamente puro in una reazione acido-base. Si forma un ponte salino, legame ionico. I prodotti saranno dei sali diastereoisomerici, che possono essere facilmente separati, ad esempio per cristallizzazione. Dopo la separazione dei sali, si può mettere la soluzione contenente il sale di nostro interesse in ambiente basico. In questo modo si riotterrà la molecola originale senza agente di derivatizzazione legato.



Composti basici largamente usati come CDA sono la *brucina*, la *stricnina* e la *morfina*.

La reazione di salificazione è auspicabile da utilizzare, perché ha una resa del 100%.

Quando non si può utilizzare la salificazione si utilizzano altre reazioni, ma non è detto che la resa sia del 100%.

Risoluzione cinetica e risoluzione dinamica

La risoluzione di racemi con risoluzione cinetica e risoluzione dinamica sono tecniche che permettono di separare miscele di enantiomeri, utilizzate anche a livello industriale.

Risoluzione cinetica

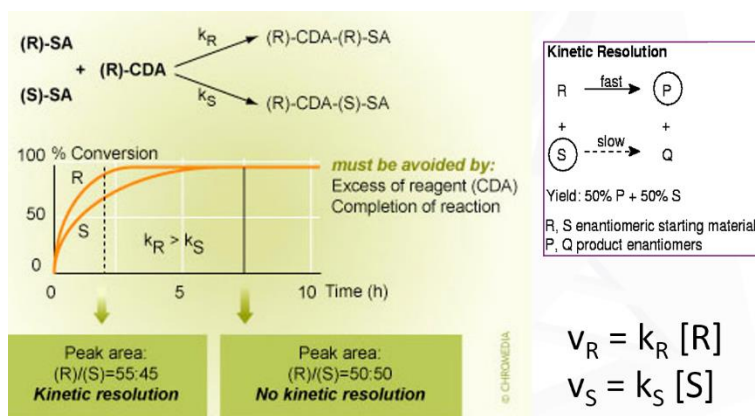
La risoluzione cinetica è un metodo chimico che si basa sull'uso di un agente di risoluzione CDA. Il metodo considera la costante di velocità con cui il CDA reagisce con l'enantiomero R o con l'enantiomero S.

La risoluzione cinetica, rispetto al metodo chimico, non porta a completamento la reazione, ma sfrutta la diversa velocità di reazione del CDA con un enantiomero piuttosto che con l'altro.

La risoluzione cinetica prevede lo studio di una reazione in cui uno degli enantiomeri reagisca molto velocemente col CDA, mentre l'altro enantiomero sia più lento nella reazione, per cui il prodotto non si forma. Se la costante di velocità di un enantiomero più veloce, si vedrà una conversione più veloce di un enantiomero rispetto ad un altro.

Per via chimica è difficile trovare condizioni che favoriscano un enantiomero rispetto ad un altro in maniera completa, senza produzione dell'enantiomero indesiderato. Questo è possibile solo con biocatalizzatori.

La reazione di risoluzione cinetica dovrà essere fermata nel punto in cui c'è la massima differenza nella concentrazione dei due enantiomeri.



Questo permette di avere una miscela arricchita dell'enantiomero desiderato, se questo è il più veloce a reagire.

La risoluzione cinetica è poi stata applicata alle biotrasformazioni, usando enzimi invece dell'agente di risoluzione chirale.

Supponendo di essere in condizioni ottimali, con un enantiomero totalmente convertito nel prodotto, ed uno enantiomero non reagito, la massima resa è del 50% se si parte dalla miscela racema.

Metodo biocatalitico

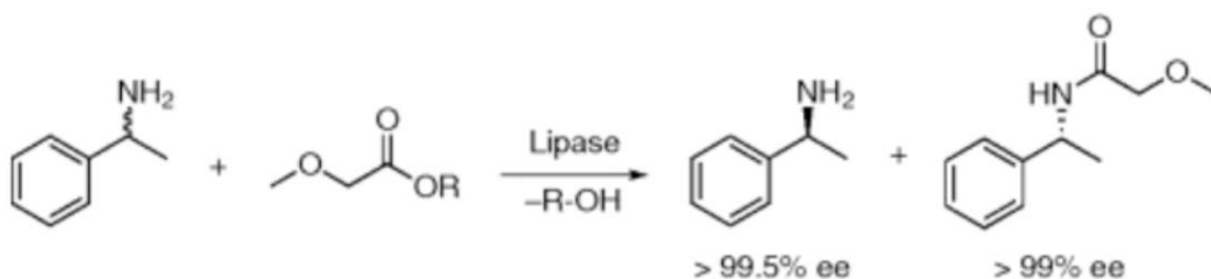
Gli enzimi hanno caratteristiche di regioselezione e stereoselezione. Una reazione di risoluzione cinetica partendo da una miscela racemica di alcoli può essere fatta con un biocatalizzatore. Ad esempio una lipasi in presenza di un agente acilante. Con uno dei due enantiomeri la velocità di reazione da parte della lipasi è massima, mentre con l'altro enantiomero è pari a 0, non si ha trasformazione.

I due prodotti sono diversi: uno un alcol, quello trasformato è un estere, quindi questi sono facilmente separabili.

La lipasi viene utilizzata al livello industriale, ad esempio per produrre il naproxene.

Altri processi che sono consolidati al livello industriali con biocatalizzatori sono nella risoluzione cinetica di substrati diesteri che in posizione β possiedono uno stereocentro. Solo uno dei due enantiomeri viene modificato.

Anche la risoluzione della feniletilammina può essere fatta con una lipasi. Facendo reagire la feniletilammina in presenza di agente acilante con una lipasi di *Burkholderia* la reazione viene catalizzata con un eccesso enantiomerico del 99%.



Limitazioni della risoluzione cinetica

La resa massima non può mai essere superiore al 50%.

La separazione dei prodotti di reazione può essere laboriosa e complessa, soprattutto quando la differenza di velocità tra le due reazioni non è molto alta. In questo caso avremo una miscela di una coppia di enantiomeri non racemica, e due diastereoisomeri. Il processo di purificazione è complesso.

Spesso serve uno solo dei due enantiomeri, quindi si perde del prodotto.

Risoluzione dinamica

La risoluzione dinamica parte da una domanda? ***Gli enantiomeri di partenza sono interconvertibili?***

Se non si possono racemizzare i composti l'uno nell'altro, si potrà utilizzare la risoluzione cinetica.

Se si possono interconvertire, si può applicare la risoluzione dinamica. L'interconversione avviene attraverso una reazione chimica.

La risoluzione dinamica integra i principi della risoluzione cinetica. Nella miscela substrato abbiamo un enantiomero che reagisce più velocemente portando al prodotto, mentre l'altro reagisce più lentamente per arrivare al prodotto corrispondente. Questa condizione di differenza nella velocità di reazione si presenta spesso quando si usa un biocatalizzatore per effettuare la reazione. Gli enzimi sono in genere specifici o selettivi per una delle due forme enantiomeriche, quindi una verrà processata più velocemente, e l'altra più lentamente.

La risoluzione dinamica aggiunge la racemizzazione del substrato, portando ad un equilibrio di concentrazione i due enantiomeri. È importante capire quando la miscela di enantiomeri è effettivamente racemizzabile. Ci sono diversi tipi di racemizzazione:

- Metodi chimici (reazione acido-catalizzata; base catalizzata)
- Metodi termici
- Biotrasformazioni

Enzimi della classe Isomerasi sono in grado di catalizzare reazioni di isomerizzazione. Alcune isomerasi danno isomeri strutturali, ad esempio la Glucosio Isomerasi (GI), che converte il glucosio e fruttosio, che sono isomeri strutturali. Il glucosio e fruttosio sono entrambi carboidrati a sei atomi di carbonio, il glucosio un aldoso con gruppo aldeidico terminale (C1), il fruttosio un chetoso con gruppo chetonico all'interno della catena (C2).

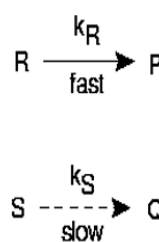
Altre isomerasi catalizzano la racemizzazione di enantiomeri.

In condizioni ottimali di risoluzione dinamica la resa del processo è del 100%.

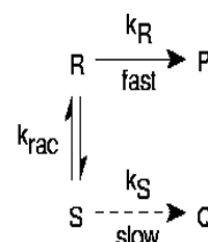
Punti importanti per la risoluzione dinamica

- Il processo di risoluzione cinetica abbinato alla dinamica deve essere irreversibile. Quindi la conversione dell'enantiomero nel prodotto non deve essere all'equilibrio, ma irreversibile.
- Per abbinare il processo di risoluzione cinetica al processo di racemizzazione, la reazione più veloce deve essere almeno 20 volte più veloce di quella lenta ($E = k_R/k_S$ deve essere > 20).
- La reazione di racemizzazione k_{rac} deve essere più veloce della k_R della reazione di conversione più veloce. Valori ottimali sono $10 \cdot k_R$.
- La risoluzione dinamica si utilizza in genere con composti con un singolo stereocentro.

Classic Resolution



Dynamic Resolution



R, S = substrate enantiomers

P, Q = product enantiomers

k_R, k_S = individual rate constants ($k_R \gg k_S$)

k_{rac} = racemization constant ($k_{rac} \gg k_R$)

E = Enantiomeric Ratio

Metodi chimici e termici di racemizzazione

Sono metodi di racemizzazione applicabili a prodotti che hanno un centro stereogenico con protoni acidi. I protoni acidi sono in genere i protoni α dei gruppi carbonilici di aldeidi, chetoni ed esteri. A seconda della natura del composto la reazione di racemizzazione avviene per perdita del protone acido, e può avvenire per catalisi basica, catalisi acida o per riscaldamento.

Alla perdita del protone acido il carbonio sp^3 dello stereocentro diventerà ibridato sp^2 , che da risonanza con l'ossigeno del carbonile adiacente (risonanza che spiega la perdita del protone acido).

Il carbonio sp^3 che passa ad sp^2 perde l'integrità stereochimica, diventa planare. L'enolato o l'enolo (in condizioni acide) che si forma potrà essere riprotonato, rigenerando lo stereocentro con la configurazione iniziale, oppure lo stereocentro con la configurazione opposta.

Il meccanismo di reazione è lo stesso che abbiamo ipotizzato per la talidomide. Si perde il protone acido sullo stereocentro, il carbonio passa da sp^3 ad sp^2 , la carica negativa del carbonio è stabilizzata per risonanza dall'ossigeno del carbonile. Il carbonio sp^2 può essere riprotonato su una delle due facce dando luogo all'enantiomero originario o all'enantiomero speculare.

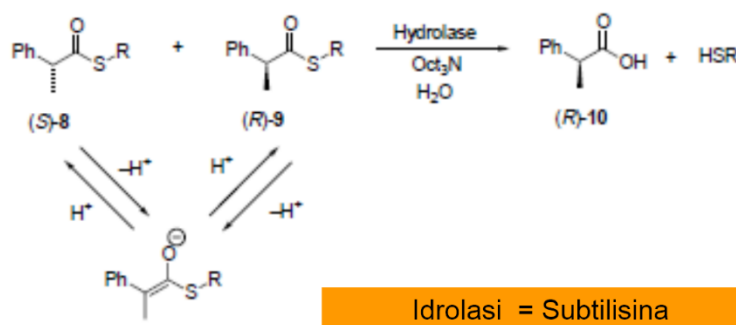
All'equilibrio tra enantiomeri, uno dei due verrà sottratto all'equilibrio dalla reazione di risoluzione cinetica più veloce. L'equilibrio sposta la reazione di isomerizzazione verso la produzione dell'isomero sottratto dalla reazione di risoluzione.

Racemizzazione tioestere con subtilisina

Un esempio di risoluzione dinamica è la risoluzione del tioestere nell'immagine.

Questo tioestere è interessante perché porta alla formazione di un acido chirale.

La reazione di risoluzione cinetica irreversibile è di tipo enzimatico, con una idrolasi specifica per uno degli enantiomeri.



La racemizzazione in questo caso può essere fatta per via termica o chimica.

L'intermedio tioestere, dopo idrolisi del legame tioestereo da parte della idrolasi, porta alla formazione del corrispondente acido carbossilico.

Lo stereocentro è su un carbonio in posizione α e un gruppo carbonilico sulla catena, quindi sappiamo che il carbonio α porta dei protoni acidi. Si può quindi racemizzare per via chimica o termica attraverso la perdita del protone acido, che può riprotonare la molecola sulla stessa faccia, dando la molecola di partenza, o sulla faccia opposta, dando l'enantiomero.

Si utilizza una idrolasi per fare la risoluzione cinetica. L'enzima lavorerà bene con un enantiomero e male o per nulla con l'altro enantiomero.

L'idrolasi idrolizza uno dei due enantiomeri al corrispondente acido in maniera veloce, sottraendolo alla miscela ed abbassandone la concentrazione. Le condizioni di racemizzazione spostano la conversione degli enantiomeri verso la forma che viene sottratta alla miscela dal processo di risoluzione. Dal processo ottengo solo un composto perché uno solo degli enantiomeri, quello processato più velocemente, verrà convertito nella risoluzione.

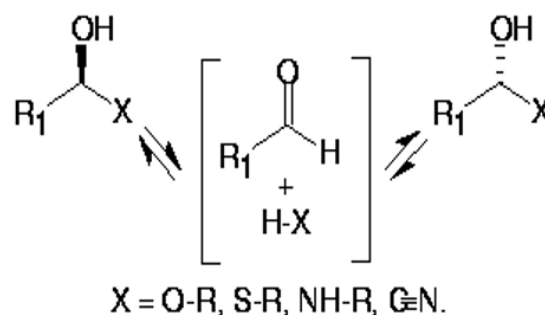
Racemizzazione alcoli

Altre strutture che possono dare racemizzazione per via chimica o termica sono gli alcoli.

La racemizzazione può essere effettuata su alcol in cui l'ossidrile OH è legato al carbonio stereogenico. A seconda dei sostituenti del carbonio stereogenico si possono avere reazioni di racemizzazione.

Il sostituyente, gruppo X, può essere un alcossido OR, tiolo SR, ammina NH-R o nitrile C-triplo legame-N. In condizioni opportune si perde il gruppo X, ed il carbonio da sp^3 diventa sp^2 , con un gruppo carbonilico. Il gruppo X può riattaccarsi al carbonio su una delle due facce, dando luogo alla molecola di partenza o all'enantiomero, secondo l'equilibrio.

Chiral Alcohol Moiety → Decomposition



Quando il gruppo X è un OR abbiamo a che fare con un emiacetale.

Quando il gruppo X è un SR da una struttura senza nome con reattività simile agli emiacetali.

Quando il gruppo X è NH-R abbiamo un emiamminale, intermedio del processo di formazione delle immine.

Quando abbiamo il gruppo X è un C---N abbiamo una cianidrina.

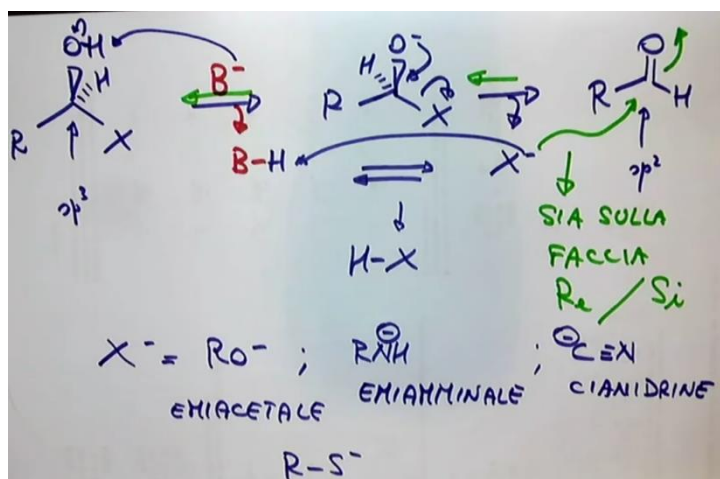
La reazione di racemizzazione può essere chimica o termica.

Meccanismo di distruzione dello stereocentro

Partiamo dal substrato, che è un alcol con uno stereocentro, quindi C ibridato sp^3 .

In ambiente basico la base strappa il protone più acido dal sistema. Nel caso dell'enolo è l'H dell'ossidrile OH. Esce quindi la base protonata e si forma lo ione alcossido.

La carica negativa sull'O dell'alcossido deve essere stabilizzata. Se sullo stereocentro su cui è situato il gruppo alcossido è presente un gruppo X uscente elettronegativo, che



quindi può portare via elettroni di legame, l'ossigeno forma un legame π con lo stereocentro, gruppo carbonilico, ed esce il gruppo X^- (con un elettrone di legame strappato allo stereocentro).

Si forma quindi il composto carbonilico corrispondente, in cui C è ibridato sp^2 .

X^- potrà essere in equilibrio con la base che aveva strappato il protone allo stereocentro, portando alla formazione del prodotto HX.

La reazione è reversibile, perché X può attaccare il composto carbonilico su uno dei due piani in maniera indifferente, potendo dare luogo ad entrambi gli enantiomeri.

Il gruppo uscente non può essere una catena carboniosa, perché dovendo uscire come carbanioni sono pessimi gruppi uscenti, e la reazione di racemizzazione non è favorita.

Negli alcoli secondari, in cui X è una catena carboniosa, la racemizzazione non avviene. Per questo è importante conoscere la struttura chimica della molecola.

Nei due casi che abbiamo visto la distruzione dell'elemento stereogenico.

Nel primo caso il cambio di configurazione è avvenuto passando alla forma enolica, sfruttando l'acidità del protone sullo stereocentro.

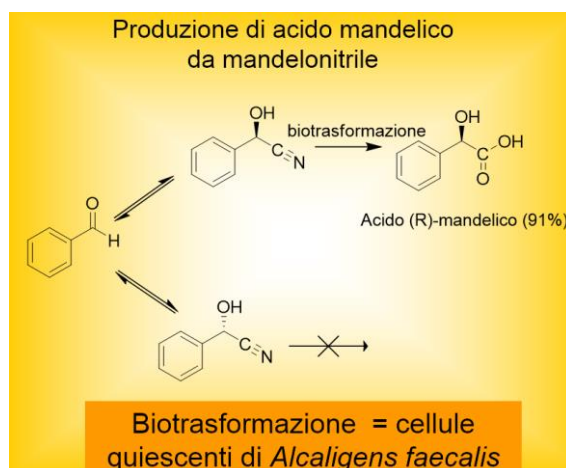
Nel secondo caso si sfrutta la presenza di un buon gruppo uscente sul carbonio stereogenico.

Applicazioni della risoluzione dinamica

La risoluzione dinamica è usata a livello industriale per la sintesi dell'**acido mandelico**. L'acido mandelico è un α -idrossi acido, con gruppo ossidrilico in α al gruppo carbossilico. Questa molecola è un intermedio per l'industria della chimica fine e dell'industria farmaceutica.

L'acido mandelico viene prodotto in forma enantiomericamente pura sfruttando il processo di risoluzione dinamica. Si parte dalla benzaldeide, che è un prodotto della raffinazione del petrolio. La reazione di racemizzazione prevede l'uso dell'acido cianidrico e la formazione di cianidrina. Lo ione cianuro CN^- attacca da sopra o da sotto il piano, si ottiene quindi il racemo. Il racemo è in equilibrio, grazie alle condizioni chimiche che favoriscono l'idrolisi della cianidrina al corrispondente carbonio carbonilico e successivo attacco sul piano dello ione CN^- per la formazione dei due enantiomeri.

Il processo di racemizzazione è abbinato alla risoluzione cinetica con una biotrasformazione che riconosce in maniera selettiva uno dei due enantiomeri. L'enzima utilizzato per la risoluzione cinetica è la **nitrile idrolasi**, molto efficiente nell'idrolisi del gruppo nitrile al corrispondente acido.



La resa del processo di risoluzione dinamica dell'acido mandelico è del 91%, con un eccesso enantiomerico praticamente del 100%. La produzione è quindi estremamente efficiente. Al livello industriale per la reazione si usano cellule intere, non l'enzima isolato.

Da non confondere le *nitrile idrolasi* con le ***nitrile idratasi***. Questi sono un'altra classe di enzimi, che trasforma il gruppo nitrile alla corrispondente ammide. Fanno quindi una idrolisi parziale del gruppo nitrilico. Il nitrile viene convertito ad ammide e poi al relativo acido carbossilico.

Il nitrile è un gruppo funzionale particolarmente stabile, per essere idrolizzato è necessario superare una barriera energetica alta, per cui le condizioni di reazione sono particolarmente drastiche. La prima idrolisi del nitrile porta ad una ammide, che è meno stabile e quindi viene velocemente idrolizzata ad acido carbossilico nelle condizioni della soluzione.

Industrialmente ottenere l'ammide è molto importante. Ad esempio l'acrilammide viene industrialmente prodotta da acrilonitrile per idrolisi parziale, con l'uso di una nitrile idratasi. Chimicamente la reazione sarebbe poco efficiente, ma l'uso dell'enzima ne permette l'efficienza. In Giappone ci sono molte aziende che producono acrilammide.

L'acrilammide monomero è molto tossica, quindi va maneggiata sempre sotto cappa. Il polimero è per la maggior parte chimicamente inerte, perché quando l'acrilammide polimerizza perde il doppio legame che subisce l'attacco dei nucleofili, quindi perde la sua reattività.

Racemizzazione catalizzata da enzimi

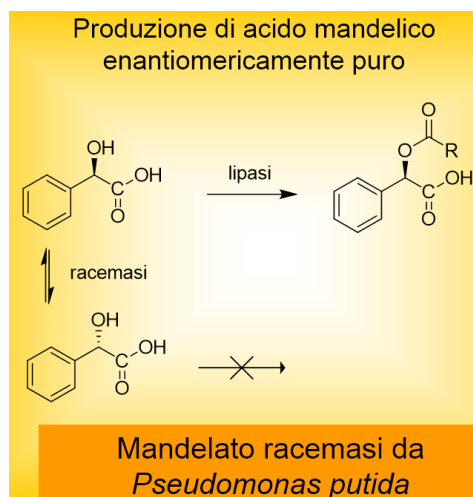
La reazione di racemizzazione può anch'essa essere catalizzata da enzimi. Un esempio è la racemizzazione di acido mandelico enantiomericamente puro, effettuata dall'enzima ***mandelato racemasi***, abbinata ad una risoluzione cinetica anch'essa enzimatica, effettuata da una **lipasi**.

Meccanismo della mandelato racemasi.

Il processo prevede che l'enzima sia in grado di accettare nel sito attivo l'acido mandelico in forma R o in forma S.

I due enantiomeri vengono coordinati nel sito attivo da residui fondamentali ed un metallo bivalente, che è il Mg^{2+} .

L'acido mandelico a pH fisiologico ha il carbossile in forma basica, con carica negativa, e la molecola prende il nome di mandelato. Il Mg^{2+} serve per coordinare il substrato nel sito attivo, e chela strutture che hanno cariche negative o, come il gruppo ossidrilico in questo caso, donatori di elettroni.

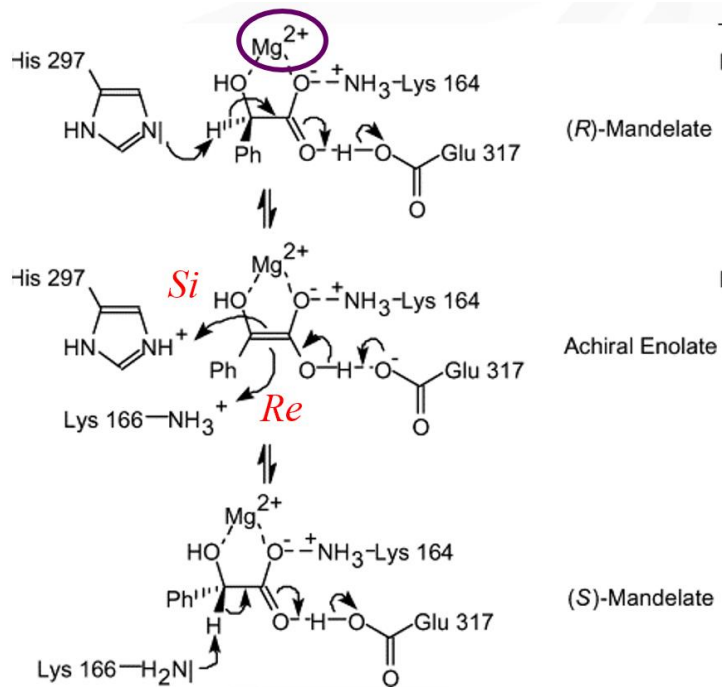


Sito attivo

Il Mg^{2+} coordina l'O negativo dello ione carbossilato e il gruppo ossidrilico del mandelato, e mantiene il substrato nel sito attivo dell'enzima.

Tra gli aminoacidi fondamentali nel sito attivo abbiamo:

- una *lisina*, carica positivamente (forma protonata) che forma un legame ionico (ponte salino) con lo ione carbossilato
- un *acido glutammico*, che in catena laterale ha un gruppo carbossilico, che inizialmente forma un legame idrogeno con l'O carbonilico del carbossilato.



Questi tre fattori sono fondamentali per coordinare sia l'enantiomero R che l'enantiomero S all'enzima.

In posizione α rispetto al carbonio carbonilico del mandelato è presente un H acido. Il meccanismo della racemizzazione catalizzata dell'enzima sfrutta l'acidità del carbonio in α . Se abbiamo un H acido questo sarà complementare ad un residuo basico, ed in questo caso è il residuo di *Istidina*. L'istidina in catena laterale ha un anello imidazolico che porta due atomi di azoto, uno acido e l'altro basico.

Un azoto si comporta da base se può donare un doppietto elettronico. Uno dei due N sull'anello imidazolico dell'istidina è stabilizzato dalla risonanza.

L'N basico dell'istidina lega l'H acido dello stereocentro del mandelato. Gli elettroni di legame sono delocalizzati sul legame C-C; si rompe uno dei legami del carbonile tra C=O e gli elettroni di legame si trovano vicini ad un protone acido dell'acido glutammico. Si ha quindi un trasferimento di protoni ed elettroni che altera l'identità chimica dello stereocentro, che passa da ibridazione sp^3 a sp^2 . L'istidina rimane protonata ed avrà una carica positiva. Abbiamo il doppio legame C=C e l'O carbonilico è protonato ed assume la forma enolica. L'acido glutammico si troverà in forma protonata.

L'enolo è achirale. Questo potrà essere protonato su una delle due facce.

Lo spostamento degli elettroni inizia dal glutammato. Il glutammato si riprende il protone che aveva trasferito e ritorna acido glutammico. Gli elettroni di legame O-H formano nuovamente il gruppo carbonilico. Gli elettroni di legame π possono prendere un protone dall'istidina, che protona sulla faccia Si, oppure da una lisina protonata che si trova dalla faccia opposta, che protona sulla faccia Re.

La reazione è una reazione di equilibrio. Si ha racemizzazione degli enantiomeri.

Questo è oggetto di esame

Specificità di substrato della mandelato racemasi

Osservando il substrato della mandelato racemasi si vede che l'acido mandelico ha un gruppo carbossilico in posizione α ad un gruppo ossidrilico.

Substrati interessanti con uno stereocentro ed un gruppo funzionale carbossilico sul C α sono gli aminoacidi. Si è provato a modificare il mandelato in vari modi per comprendere come l'enzima mandelato racemasi catalizzasse la reazione di racemizzazione di altre molecole

Ricercatori hanno provato a mettere un gruppo NH_2 al posto dell'ossidrilico, per provare a racemizzare un substrato quando più simile agli aminoacidi, senza però avere alcuna reazione. Questo avviene probabilmente perché il gruppo NH_2 , che è protonato, non sarà stabile vicino ad un Mg^{2+} , perché le due cariche positive tenderanno a respingersi.

Se il motivo per cui il gruppo amminico non può essere sostituito all'ossidrilico per via della sua protonazione, si può fare in modo che non venga protonato. Si sostituisce quindi l'ossidrilico con un gruppo ammidico. L'azoto ammidico non viene protonato perché il doppietto elettronico è coinvolto nella risonanza col gruppo carbonilico e non è disponibile per una reazione acido base.

Se trasformo un ossidrilico in gruppo ammidico, quest'ultimo non può essere protonato e si limiteranno le interazioni elettrostatiche negative con il Mg^{2+} . Questo approccio non funziona comunque, per via dell'ingombro sterico dell'ammide.

Sul gruppo carbossilico si possono fare piccole modifiche, trasformandolo nei suoi derivati, per cui si può trasformare in ammide primaria $\text{COOH} \rightarrow \text{CONH}_2$ con attività ridotta al 15%. Trasformando COOH in una idrazide CONHNH_2 l'ingombro sterico diventa eccessivo e la racemasi non lavora più.

Sull'anello aromatico si possono fare delle sostituzioni. È stato sostituito l'anello benzenico con anelli eteroaromatici, che contengono eteroatomi. Con anelli benzenici che contengono gruppi elettronattrattori e con anelli aromatici biciclici.

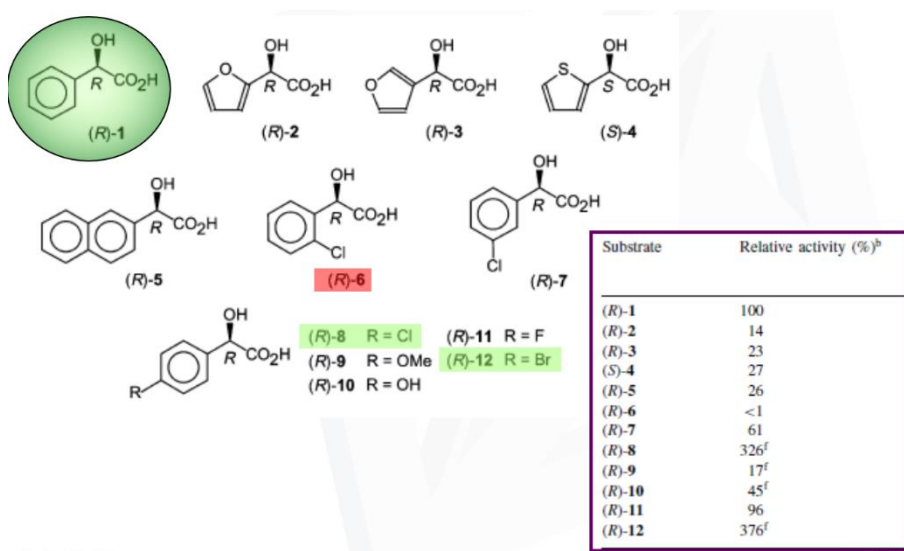
Se si sostituisce l'anello aromatico con anelli eteroaromatici di dimensioni più piccole l'attività enzimatica si riduce molto, probabilmente per via della polarità data dall'eteroatomo nell'anello benzenico.

Se si introducono anelli policiclici l'attività è bassa probabilmente per l'ingombro sterico.

Se andiamo ad inserire sull'anello benzenico degli atomi elettronattrattori avremo dei casi differenti. Se in posizione orto mettiamo un atomo di Cl abbiamo un composto con pochissima attività.

Se spostiamo il Cl in posizione meta l'attività aumenta.

Se l'atomo di Cl è spostato in



posizione para, l'attività è pari a tre volte quella del composto naturale. Questo avviene probabilmente dal fatto che la presenza di un gruppo elettronattrattore come l'atomo di Cl rende più acido il protone in α al carbonile. Se si strappa questo protone avremo inizialmente la formazione di una carica negativa sul carbonio, che poi viene stabilizzato dal gruppo carbonilico, ed in questo caso anche da Cl che si trova sull'anello aromatico. Anche il Bromo Br ha un effetto simile al Cl.

Da ricordare per l'esame la reazione e le modifiche al mandelato che sono stati testati.

La presenza di qualunque sostituente che aumenti l'acidità del protone tende ad aumentare l'attività dell'enzima.

La mandelato racemasi non lascia molto spazio all'utilizzo di substrati diversi dall'acido mandelico.

Le racemasi appartengono alla famiglia delle isomerasi. Questi enzimi hanno molte applicazioni industriali, ad esempio la **glucosio isomerasi** nell'High Fructose Corn Syrup HFCS.

Una possibilità di utilizzo delle isomerasi è la racemizzazione delle idantoine, da parte della **idantoina racemasi**. Sono interessanti per la sintesi di aminoacidi enantiomericamente puri. Le idantoine una volta idrolizzate dalle **idantoinasi** portano al corrispondente amminoacido, per cui le idantoinasi sono molto interessanti dal punto di vista industriale.

La sintesi di aminoacidi enantiomericamente puri è importante nella sintesi di antibiotici beta lattamici.

L'anello dell'acido 6 amminopenicillanico e dell'acido cefalosporanico può essere modificato sul gruppo amminico con aminoacidi enantiomericamente puri, modificando l'attività antibatterica delle molecole. Importanti sono gli aminoacidi della serie D nella funzionalizzazione di questi anelli.