

Noi căi de sinteză pentru biocompuși folosind enzime native și imobilizate

Teză de doctorat – Rezumat

pentru obținerea titlului științific de doctor la

Universitatea Politehnică Timișoara

în domeniul de doctorat Inginerie Chimică

autor ing. Paula Aurelia Borza

conducător științific Prof.univ.dr.ing. Francisc Péter luna octombrie anul 2020

Biocataliza, este definită ca domeniul (ramura) în care microorganismele sau macromoleculele naturale cum sunt enzimele sunt utilizate pentru a cataliza reacții chimice [1].

Aceasta oferă beneficii substanțiale cum ar fi: costul redus al bunurilor, reducerea numărului de etape sintetice dintr-un proces, reducerea impactului asupra mediului, precum și îmbunătățirea siguranței reacției și selectivității [2].

Studii privind imobilizarea enzimelor, adică atașarea biocatalizatorului la un material dorit prin interacțiuni fizice, chimice, electrice sau mecanice, au demonstrat că prin imobilizare biocatalizatorii își pot îmbunătăți activitatea și stabilitatea într-o gamă mai largă de condiții de funcționare [3].

În contextul actualelor tendințe ale biocatalizei, obiectivul acestei teze de doctorat a fost obținerea de noi biocatalizatori prin imobilizarea lipazelor în sol-gel, a lacazei și peroxidazei prin legare covalentă și adsorbție, precum și utilizarea acestora pentru realizarea rezoluției cinetice a amestecurilor racemice, obținerea acidului D-glucaric, respectiv degradarea unor coloranți.

Optimizarea reacțiilor de rezoluție racemică a fost realizată folosind programul experimental factorial și un sistem cu flux continuu „packed-bed”

Prezenta teză este structurată în 4 capitole:

Primul capitol al tezei prezintă un studiu de literatură, care subliniază motivația alegerii acestui subiect precum și aspectele fundamentale referitoare la necesitatea abordării și dezvoltării acestor studii. Tot în cadrul acestui capitol se prezintă stadiul actual al cercetării în domeniul obținerii de noi biocatalizatori cu lipaze din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK), *Burkholderia cepacia* (Amano PS), *Candida antarctica* B (Cal B), *Candida antarctica* A (Cal A), lacaza din *Trametes versicolor* și peroxidaza din hrean obținuți prin diferite tehnici de imobilizare, necesitatea obținerii de noi biocatalizatori stabili la temperatură și în medii organice, căile de optimizare a reacțiilor de rezoluție racemică folosind un sistem cu flux continuu „packed-bed” și obținerea acizilor aldarici.

Capitolul al doilea constă în prezentarea contribuțiilor originale ale tezei de doctorat.

Stabilizarea lipazelor prin imobilizare în matrici de sol-gel

S-a realizat imobilizarea unor lipaze din diferite surse în matrici de sol-gel conținând grupări funcționale vinilice. Se obține astfel o matrice hibridă de tip vinil-polisiloxan, în care prezența grupărilor vinilice influențează atât proprietățile matricei de sol-gel cât și hidrofobicitatea ei, dar și interacțiunea cu enzima.

În acest studiu lipazele din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK), *Burkholderia cepacia* (Amano PS), *Candida antarctica* B (Cal B) și *Candida antarctica* A (Cal A) au fost imobilizate prin tehnica sol-gel folosind sisteme binare și ternare de silani precursori care conțin grupări vinil. Biocatalizatorii obținuți au fost testați în reacții de acilare a 3 alcoolii secundari alifatici (2-hexanol, 2-heptanol și 2-octanol) în mediu de n-hexan în sistem discontinuu, pentru a determina influența grupărilor vinil prezente în matricea sol-gel asupra activității și enantioselectivității (Figura 1).

S-au obținut o varietate mare de preparate care au eficiență catalitică ridicată pe substraturile model.

Lipaza din Cal B entrapată în matricea obținută din silanii precursori PhTMOS:VTMOS:TMOS la un raport molar 1,6:0,4:1, a demonstrat o activitate de 1,32 mol·h⁻¹·mg⁻¹ și un exces enantiomeric >95% pentru rezoluția cinetică a 1-hexanolului [4,5].

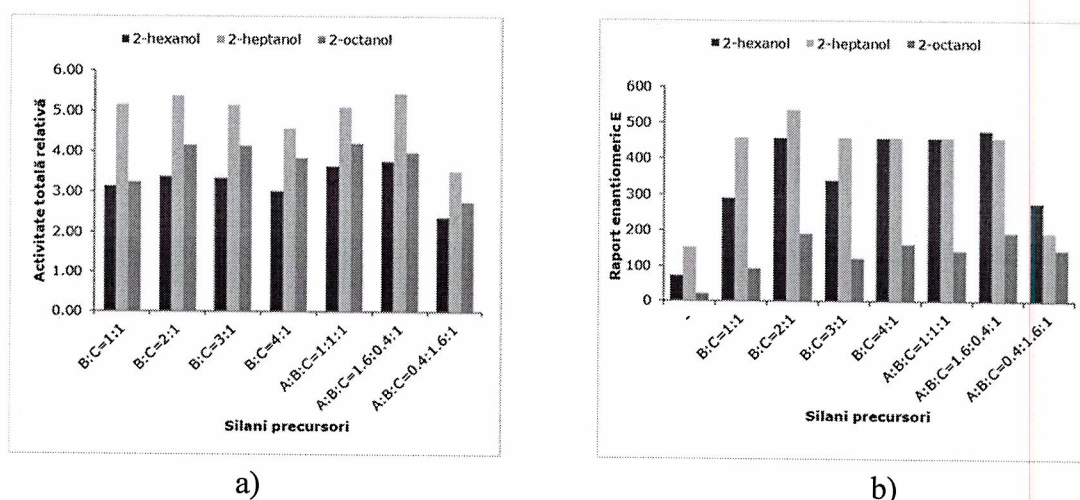


Figura 1. Influența raportului molar al silanilor precursori asupra activității totale relative (a) și a raportului enantiomeric E (b), în reacția de acilare enantioselectivă în n-hexan, la 40°C, a 2-hexanolului, 2-heptanolului și a 2-octanolului, folosind biocatalizatori obținuți cu lipază din *Candida antarctica* B imobilizați prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (A=PhTMOS, B=VTMOS, C=TMOS).

Valorile pentru activitatea totală relativă sunt apropiate. Trebuie remarcat că aceste activități totale relative au fost mari, între 3 și 5, ceea ce denotă o activare consistentă a enzimei în urma imobilizării.

Raportul enantiomeric cel mai mare s-a obținut pentru substratul de 2-heptanol, iar cele mai mici valori pentru 2-octanol, dar valorile au fost în toate cazurile foarte mari, de peste 100. Pentru 2-hexanol și 2-heptanol valorile E au fost de peste 200, ceea ce denotă enantioselectivitate aproape totală.

Caracterizarea biocatalizatorilor obținuți în urma imobilizării

Biocatalizatorii obținuți au fost caracterizați din punct de vedere structural, morfologic și al comportamentului termic prin: microscopie electronică de scanare, microscopie de fluorescență, spectroscopie FT-IR, microscopie atomică de forță și analiză termică cu scopul de a găsi informații care pot fi corelate cu eficiența catalitică în reacția de transesterificare.

Din analiza SEM a rezultat că în cazul metodei SGE-1, indiferent de raportul molar al silanilor precursori, preparatele au o structură poroasă (uneori mai compactă) de tip microcanal, care permite accesul substratului la centrul activ al enzimei.

Pentru biocatalizatorii obținuți utilizând un singur silan precursor, TMOS, morfologia matricii sol-gel este amorfă, cu blocuri compacte și neregulate.

Morfologia biocatalizatorului SGE-A obținut prin entrapare în sol-gel urmată de adsorbția pe un suport solid (Celite 545) a fost diferită, particulele de xerogel fiind distribuite atât pe suprafața suportului solid cât și în interiorul porilor.

Analiza prin microscopie confocală de fluorescență a demonstrat că enzima este distribuită relativ uniform atât la suprafața cât și în interiorul matricii de xerogel.

Analiza FT-IR a confirmat că toți precursorii au fost incluși în matricea sol-gel, iar prezența grupări funcționale provenite de la aceștia este esențială pentru activitatea și stabilitatea operațională a enzimei entrapate.

Toate materialele studiate au fost caracterizate printr-un conținut de nanostructuri cu nanounități bine definite, uniforme ca mărime. Mărimea mesoporilor variază între 2-4 nm pentru toate preparatele testate.

Rugozitatea observată în imaginile AFM depinde de natura precursorilor silanici, iar suprafața a fost uniformă și fină pentru toate preparatele, fără agregate mari.

Curbele DTG ale preparatelor cu lipază din *Candida antarctica* B au arătat că maximum vitezei de descompunere termică a fost deplasat spre temperaturi mai ridicate (pentru enzima nativă picul maxim a fost înregistrat în jur de 300°C iar pentru preparatele imobilizate la temperaturi mai mari de 350°C, în funcție de preparat), ceea ce indică o protecție mai bună a enzimei la temperaturi ridicate după imobilizare.

A fost testată și stabilitatea în solvenți organici și termostabilitatea lipazelor imobilizate. Eficiența unei enzime într-o reacție *De aceea*, poate fi uneori influențată de stabilitatea operațională scăzută în solvenți organici și de rezistența la temperatură.

Materialele obținute au fost supuse unei expuneri prelungite în solvenți organici cu polarități diferite, pentru a evalua potențialul acestora ca biocatalizatori industriali.

În urma acestor studii se poate afirma că stabilitatea pe termen lung a lipazelor după imobilizare a fost excelentă în toți solvenții organici testați. Prin urmare, ei pot fi utilizați ca și catalizatori în medii de reacții de diferite polarități, în funcție de cerințele sistemului de reacție. De asemenea, aceste rezultate demonstrează posibilitatea ca preparatele imobilizate prin ambele tehnici să poată fi utilizate în regim continuu, în procese care necesită stabilitate pe termen lung.

Pentru determinarea termostabilității biocatalizatorilor aceștia au fost preincubați timp de 24 de ore la temperaturi între 40-70°C în n-hexan, după care s-au determinat activitățile în reacțiile de acilare a alcoolilor secundari 2-hexanol, 2-heptanol și 2-octanol, cu acetat de vinil la 40°C, de asemenea în mediu de n-hexan.

Preparatele enzimice obținute cu lipază din *Candida antarctica* B (Cal B) au prezentat cele mai bune rezultate ale stabilității termice pentru domeniul de temperatură investigat

Studiul stabilității operaționale a biocatalizatorilor în sistem discontinuu

Din cauza costului relativ ridicat și a cerințelor de prelucrare, utilizarea enzimelor la nivel industrial este limitată. De aceea, utilizarea enzimelor imobilizate în cicluri repetate de reacție a devenit foarte importantă [6]. O enzimă poate fi reutilizată până când activitatea scade la mai puțin de 25 % din valoarea inițială [7].

Stabilitatea lipazelor Amano AK, Amano PS și Cal B imobilizate prin entrapare în sol-gel și entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție, folosind un sistem ternar de silani precursori PhTMO:VTMO:TMOS la un raport molar 1,6:0,4:1, a fost studiată prin reutilizare în reacția de acilare a 2-hexanolului cu acetat de vinil în n-hexan, la 40°C [8, 9].

Au fost obținute rezultate excelente pentru stabilitatea operațională a lipazei din Cal B (după 14 cicluri de reacție peste 80% din activitate a fost regăsită) și bune pentru lipaza din Amano AK (după 11 cicluri de reacție peste 30% din activitate a fost regăsită), în timp ce lipaza din Amano PS a avut după imobilizare stabilitate operațională mai redusă decât enzima nativă (Figura 2).

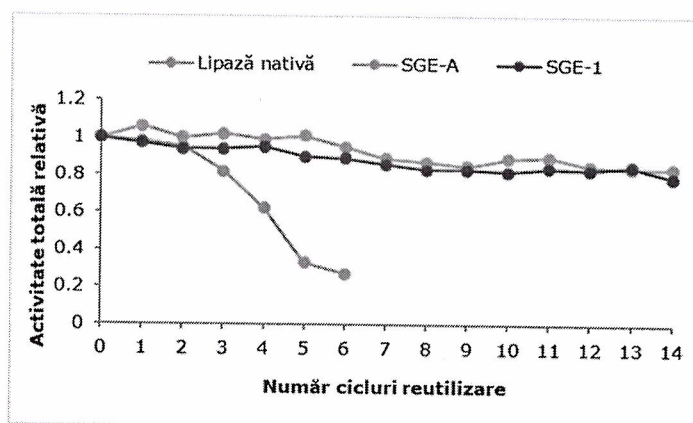


Figura 2. Influența reutilizării enzimei native și imobilizate din *Candida antarctica* B asupra activității relative în acilarea 2-hexanolului la 40°C în n-hexan (lipază nativă, SGE-A-entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție și SGE-1-entrapare în sol-gel).

Acilarea unor substraturi racemice în sistem continuu

În plus față de imobilizare, ingineria de proces poate oferi mijloace suplimentare de îmbunătățire a eficacității biotransformărilor, reducând impactul costurilor de catalizator asupra produsului. Una dintre modalitățile cele mai eficiente de a interveni în ingineria procesului în sensul creșterii productivității și duratei de funcționare a biocatalizatorului este utilizarea unui regim de exploatare continuu [10]. Reactoarele utilizate sunt de mai multe tipuri, dar în cele mai multe cazuri se preferă configurația de tip coloană cu strat fix de catalizator (PBR), în care biocatalizatorul imobilizat este încărcat în reactor, iar soluția de substrat este pompată cu un debit stabilit.

Pe lângă faptul că prezintă o activitate catalitică mai rapidă și mai mare comparativ cu reactoarele în sistem discontinuu, cât și o stabilitate operațională îndelungată, această configurație reduce costul procesului [11, 12].

Studiile anterioare au inclus optimizarea protocolului de imobilizare, testat în reacții în proces discontinuu, ulterior îmbunătățit pentru utilizarea acestuia în reactoare tip sistem continuu cu pat fix (PBR). Pentru a optimiza parametrii care au efect asupra rezoluției cinetice în sistem continuu, doi alcooli secundari (unul alifatic și unul aromatic), 2-octanol și 1-feniletanol (rac-1 și rac-2,) au fost selectate drept substraturi model.

Selecția lipazei imobilizate prin sol-gel s-a bazat pe studiile prezentate anterior, atât în ceea ce privește optimizarea matricei sol-gel cât și caracterizarea detaliată a stabilității termice și reutilizarea biocatalizatorilor imobilizați în sistem discontinuu.

Optimizarea în sistem continuu a rezoluției cinetice enzimatică a 2-octanolului și a 1-feniletanolului s-a realizat folosind un program experimental factorial.

Pentru a elucidă și a înțelege mai bine interacțiunea și efectele variabilelor studiate (concentrația substratului, debitul și temperatura) asupra variabilelor de răspuns, toate datele experimentelor au fost combinate, generând grafice ale suprafeței de răspuns (Figura 3).

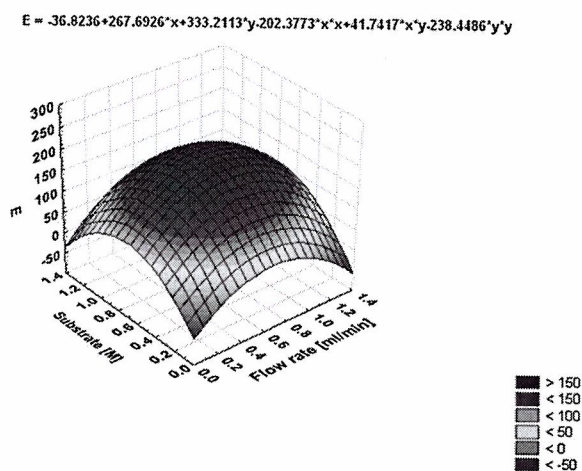


Figura 3. Reprezentarea grafică a raportului enantiomeric E în funcție de concentrația substratului și de debit, în cazul rezoluției cinetice a rac-1

Bazat pe cele mai mari valori ale lui E și excesului enantiomeric de produs ee_p, obținute prin metodologia suprafeței de răspuns (RSM), parametrii optimi de reacție au fost stabiliți la o concentrație de 0,5 M a substratului rac-1, raportul molar acetat de vinil: substrat de 1,5:1, temperatura de reacție 50°C și debitul 0,8 mL/min.

Pentru validarea rezultatelor modelului experimental, reacția de acilare a rac-1 în sistem continuu a fost realizată folosind parametrii optimi rezultați din această modelare. Rezultatele prezentate în Figura 4 arată că timp de 144 de ore de reacție valorile productivității s-au menținut constante la aproximativ 145 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, iar raportul enantiomeric a fost mai mare de 300, demonstrând stabilitatea operațională excelentă în sistem continuu a biocatalizatorului imobilizat și validitatea modelului experimental.

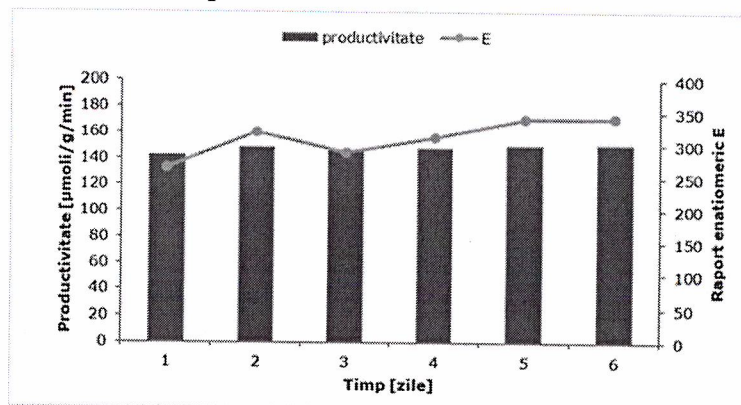


Figura 4. Diagrama productivității și enantioselectivității (E) lipazei Cal B imobilizate în sol-gel, la utilizare îndelungată în sistem continuu într-un reactor cu strat fix de biocatalizator, pentru rezoluția cinetică a rac-1, în condiții de reacție optimizate.

Imobilizarea unor enzime oxidative prin legare covalentă și aplicații biotehnologice

Imobilizarea lacazei și evaluarea utilizării lacazei pentru obținere de acid glucaric

Lacaza din *Trametes versicolor* a fost imobilizată prin legare covalentă utilizând două suporturi cu grupări funcționale epoxidice (epoxi/metacrilat și epoxi/butil-metacrilat) și unul cu grupări amino (amino C2 metacrilat), iar prin adsorbție utilizând 3 suporturi funcționalizate cu grupări diferite: Octadecil metacrilat, DVB/metacrilat, Stiren macroporos. Suporturile sunt disponibile comercial (Purolite).

Pentru a compara cele două metode de imobilizare, s-au reprezentat activitățile lacazei imobilizate în funcție de raportul enzimă/suport, exprimat ca mg proteină/100 mg suport. Figura 5(a-d) prezintă valorile activităților la aceeași încărcare cu enzimă, pentru toate suporturile folosite.

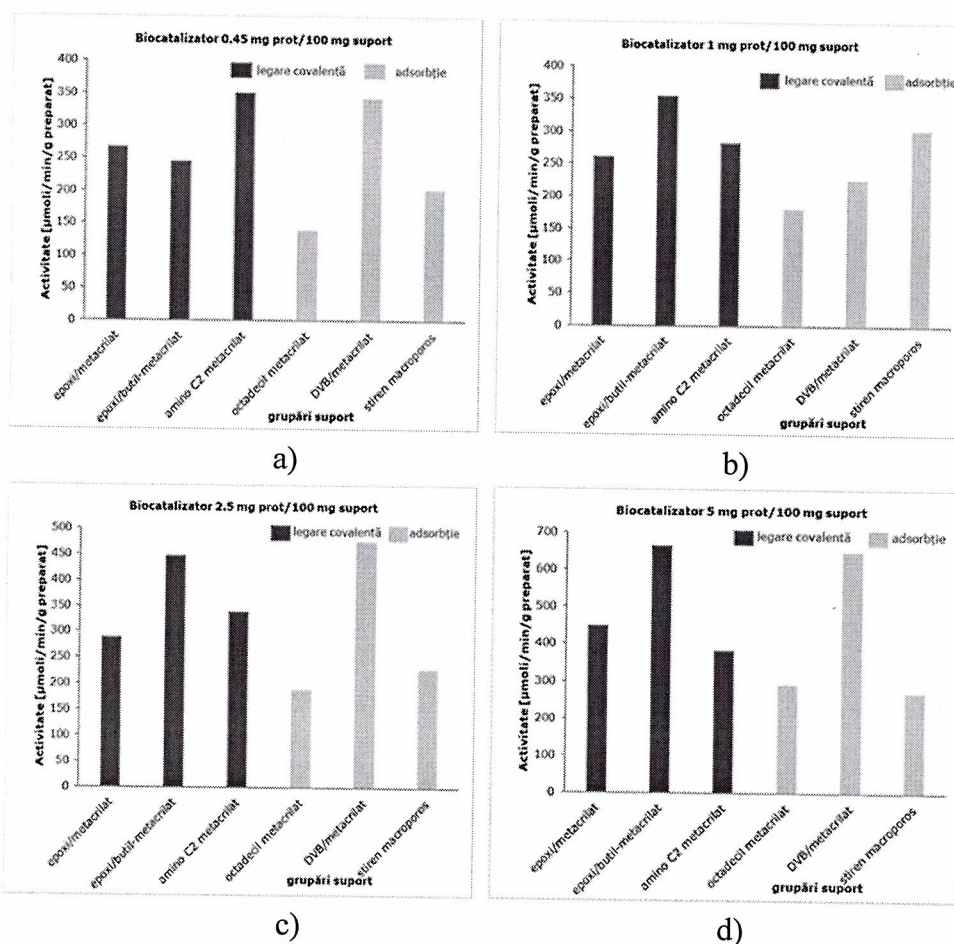


Figura 5. Efectul raportului enzimă/suport asupra activității biocatalizatorilor obținuți prin imobilizarea lacazei prin legare covalentă și adsorbție: (a) 0,45 mg proteină, (b) 1,0 mg proteină, (c) 2,5 mg proteină și (d) 5 mg proteină, raportate în toate cazurile la 100 mg suport.

Pe baza rezultatelor obținute se poate observa că cele mai ridicate valori ale activității au fost obținute la valoarea maximă a cantității de proteină (5 mg proteină/100 mg suport). Totuși, pe baza constatării că activitățile în acest caz au fost doar duble comparativ cu biocatalizatorul obținut utilizând cantitatea minimă de proteină (de 11 ori mai mică) și ținând cont de faptul că prețul enzimei este un element important în procesele biocatalitice, încărcarea optimă poate fi considerată cea de 0,45 mg proteină/100 mg suport.

Așa cum se poate observa din Figura 5, preparatele enzimatiche obținute prin legare covalentă au avut valori ale activităților cuprinse în intervalul 245-665 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ preparat, care au fost în general mai mari comparativ cu biocatalizatorii obținuți prin adsorbție. Totuși, dintre aceștia cei pe suport divinilbenzen/metacrilat, au prezentat de asemenea activități mari, comparabile sau chiar mai ridicate decât cele obținute prin legare covalentă.

Utilizarea peroxidazei imobilizate pentru eliminarea unor coloranți din apă

În cadrul studiilor efectuate pentru obținerea unor noi biocatalizatori imobilizați din clasa oxidoreductazelor, s-a realizat imobilizarea și a unei alte enzime cu aplicații în diverse domenii, peroxidaza [13].

Selectivitatea peroxidazei pentru coloranții azoici comerciali

Selectivitatea peroxidazei a fost testată pentru șase substraturi (coloranți azoici), folosind enzima nativă la 25°C și două valori ale pH-ului, 3,5 și 6,0.

Rezultatele obținute după 24 h de reacție, prezentate în Figura 6, indică faptul că la pH 3,5 conversiile au fost mai mici comparativ cu cele de la pH 6,0, cu excepția colorantului Neutral Gray. Astfel, la pH 6, cele mai mari valori ale conversiilor (până la 80%) au fost obținute pentru coloranții Amido Black 10 (AB10) și Acid Orange 7 (AO7).

Luând în considerare aceste rezultate, colorantul AB10 a fost utilizat ca substrat în următoarele experimente.

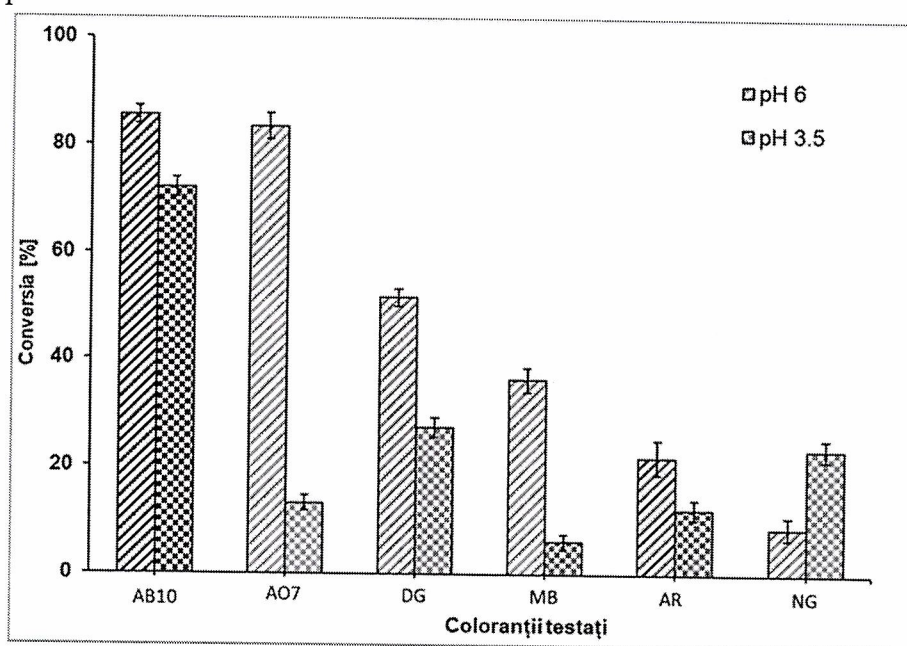


Figura 6. Evaluare comparativă a selectivității peroxidazei din hrean pentru degradarea a șase coloranți diferiți (AB 10 - Amido Black 10, AO7 - Acid Orange 7, DG - Direct green; MB - Methylene blue; AR - Acid red; NG - Neutral grey)

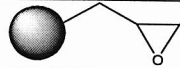
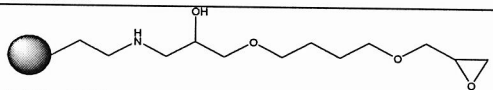
Imobilizarea peroxidazei folosind suporturile ReliZyme™

Dintre metodele de imobilizare disponibile, a fost selectată legarea covalentă, o metodă rapidă și simplă. Având în vedere că biocatalizatorul este utilizat în soluții apoase, legarea covalentă poate evita, de asemenea, pierderea enzimei de pe suport.

Au fost selectate două suporturi comerciale ReliZyme™, cu grupări epoxidice active și cu lungime și structură diferită a linker-ului. Imobilizarea s-a efectuat într-o singură etapă, prin amestecarea soluției de enzimă cu suportul timp de 24 ore. Activitatea peroxidazei imobilizate

a fost determinată prin utilizarea ABTS ca substrat model, așa cum este descris în partea experimentală. Rezultatele prezentate în Tabelul 2.1 indică valori ridicate de încărcare cu proteine (> 90%), pentru ambele tipuri de suport. Activitatea specifică și reproductibilitatea au fost mai mari atunci când a fost utilizat suportul epoxi-amino HFA 403. Probabil, linker-ul mai lung (a se vedea structurile prezentate în Tabelul 1) permite o mai bună legare covalentă a enzimei de grupele epoxidice ale suportului. Cu toate acestea, luând în considerare eficiențele ridicate de imobilizare, studiile de caracterizare au fost efectuate pentru ambii biocatalizatori și rezultatele au fost comparate cu enzima nativă.

Tabelul 1. Încărcarea cu enzimă și activitatea regăsită a peroxidazei imobilizate pe suporturile epoxi-ReliZyme™

Tipul suportului solid	Încărcarea cu enzimă [%]	Activitate specifică [U·g·proteină ⁻¹]
 EP 403	93,5	21,24 ± 2,36
 HFA 403	99,6	37,24 ± 0,78

Capitolul al treilea oferă o vedere de ansamblu asupra materialelor utilizate, metodelor de lucru și caracterizare cât și a echipamentele utilizate în scopul de a realiza programul experimental.

În **capitolul al patrulea** sunt prezentate concluziile finale pentru fiecare subcapitol și contribuțiilor originale

În urma studiilor efectuate au rezultat următoarele concluzii:

a. Imobilizarea unor lipaze microbiene în matrici de sol-gel obținute cu un precursor cu grupare vinil

Prin imobilizarea lipazelor din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK), *Burkholderia cepacia* (Amano PS), *Candida antarctica* B (Cal B) și *Candida antarctica* A (Cal A) în matrici de sol-gel conținând grupări funcționale vinilice s-au obținut noi biocatalizatori. Pentru a determina efectul prezenței grupărilor vinil în matricea sol-gel asupra activității și enantioselectivității acești biocatalizatori au fost testați în reacții de acilare a unei serii de alcooli secundari alifatici (2-hexanol, 2-heptanol și 2-octanol), în mediu n-hexan.

În cazul preparatelor obținute cu lipaze din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) și *Burkholderia cepacia* (Amano PS) prin metoda SGE-1 valoarea ce mai ridicată a activității de transesterificare s-a obținut atunci când matricea sol-gel a fost obținută folosind un sistem ternar cu raportul molar PhTMOS:VTMOS:TMOS de 1,6:0,4:1.

În ceea ce privește enantioselectivitatea biocatalizatorilor obținuți prin metoda SGE-1, pentru preparatele obținute cu lipaze din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) și *Burkholderia cepacia* (Amano PS) valorile acestora au fost mai mari comparativ cu enzima nativă.

Pentru metoda combinată au fost testate și sisteme binare de silani precursori. În cazul sistemelor binare pentru biocatalizatori cu Amano AK și Amano PS cele mai bune valori ale activității s-au obținut la un raport molar VTMOS:TMOS de 4:1 și 3:1, adică un conținut mai ridicat de grupări vinilice.

În cazul preparatelor cu Cal B s-au obținut valori foarte ridicate și ale activității de transesterificare atât pentru sisteme binare cât și pentru cele ternare, fără a se putea face o distincție netă între diferitele preparate.

În ceea ce privește enantioselectivitatea, pentru preparatele cu Amano AK s-au obținut valori mari pentru substratul 2-hexanol, la diferite rapoarte molare de silani precursori. În cazul lipazelor Amano PS și Cal B cele mai ridicate valori ale raportului enantiomeric au fost obținute pentru substraturile 2-hexanol și 2-heptanol, aceste valori fiind asemănătoare indiferent de rapoartele molare utilizate pentru silanii precursori.

b. Evaluare stabilității operaționale a preparatelor cu lipaze în solvenți organici

Stabilitatea în solvenți a lipazelor după imobilizare a fost excelentă, astfel acești biocatalizatori pot fi utilizați ca și catalizatori în medii de reacții de diferite polarități, în funcție de cerințele sistemului de reacție.

Preparatele imobilizate cu Amano AK au arătat activități relative de peste 1, în urma incubării în solvenți organici (de până la 1.4 în acetonitril pentru preparatele obținute prin metoda SGE-1), demonstrând efect de activare.

Preparatele enzimatic obținute au avut valori ridicate și constante ale raportului enantiomeric în toți solvenții testați, comparativ cu enzima nativă. Valorile indicelui de enantioselectivitate E ale biocatalizatorilor obținuți au fost de două ori mai mari pentru preparatele cu Amano AK și Amano PS și chiar de 5 ori mai mari pentru preparatele cu Cal B, comparativ cu enzima nativă.

c. Influența temperaturii asupra stabilității operaționale a preparatelor enzimatic obținute.

Biocatalizatori obținuți în urma imobilizării au avut o stabilitate termică excelentă, activitatea de transesterificare rămânând practic constantă în intervalele de temperatură studiate 40-70°C.

Valorile raportului enantiomeric E au fost mai mari pentru preparatele enzimatic comparativ cu lipazele native, fără a depinde de tehnica de imobilizare utilizată.

După incubarea preparatului cu Cal B la 80°C în iso-octan timp de 120h, valorile activității catalitice au rămas neschimbate, în timp ce activitatea lipazei native s-a redus la mai puțin de 25% din activitatea inițială. Valorile enantioselectivității biocatalizatorilor au rămas neschimbate pe toată perioada de incubare.

d. Evaluarea stabilității operaționale a lipazelor imobilizate prin tehnica sol-gel în mai multe cicluri de reacție

Imobilizarea prin tehnica sol-gel a dus la obținerea unor biocatalizatori cu stabilitate ridicată la utilizarea în mai multe cicluri de reacție în sistem discontinuu. Au fost obținute rezultate excelente pentru stabilitatea operațională a lipazei din Cal B (după 14 cicluri de reacție peste 80% din activitate a fost regăsită) și bune pentru lipaza din Amano AK (după 11 cicluri de reacție peste 30% din activitate a fost regăsită), în timp ce lipaza din Amano PS a avut stabilitate operațională după imobilizare mai redusă decât enzima nativă.

e. Optimizarea rezoluției cinetice enzimatic în sistem continuu a 2-octanolului și a 1-feniletanolului folosind un program experimental factorial

În urma aplicării programului experimental factorial pentru substrat-urile, 2-octanol și 1-feniletanol, s-au optimizat parametrii care influențează rezoluția cinetică în sistem continuu. Prin metodologia suprafeței de răspuns (RSM), bazat pe cele mai mari valori ale lui E și e.p., au fost stabiliți parametrii optimi de reacție pentru procesul de rezoluție cinetică.

Pentru rac-1 parametrii optimi au fost: concentrația de substrat de 0,5 M, raportul molar

acetat de vinil: substrat de 1,5:1, temperatura de reacție 50°C și debitul de 0,8 mL/min, iar pentru rac-2 concentrația de substrat a fost 0,2 M, raportul molar acetat de vinil: substrat de 1,5:1, temperatura de reacție 50°C și debitul de 0,45 mL/min.

f. Creșterea stabilității lacazei din *Trametes versicolor* prin imobilizare covalentă și adsorbție

S-a realizat imobilizarea cu succes a lacazei din *Trametes versicolor* prin legare covalentă și adsorbție, obținându-se 24 de preparate enzimatică cu lacază imobilizată a căror activitate a fost evaluată în reacția de oxidare a unui substrat model, 2,6-dimetoxifenol.

Pentru ambele metode de imobilizare testate, valorile cele mai ridicate ale activității s-au obținut la cea mai mare încărcare cu proteină, de 5 mg proteină/100 mg suport, dar creșterea activității nu a fost proporțională cu creșterea cantității de enzimă supusă imobilizării.

Cele mai mari valori ale activității enzimatică, 665 μ mol/min/g preparat, s-au obținut în cazul legării covalente pe suportul cu grupări active epoxi/butil.

g. Caracterizarea biocatalizatorului obținut cu lacază - imobilizare prin legare covalentă

După imobilizare prin legare covalentă pe suportul de polimetacrilat cu grupări epoxi/butil, valoarea maximă a activității s-a deplasat de la 3,5 în cazul enzimei native la pH 4 la enzima imobilizată.

Eliminarea apei din preparatul enzimatic prin uscare la 25°C a dus la o scădere a activității cu 55% după 24 de h și cu 80% după 48 de h.

Biocatalizatorul imobilizat și-a menținut activitatea în intervalul de temperatură 30-50°C, fiind observată chiar o ușoară creștere, în timp ce la enzima nativă activitatea a scăzut în aceleași condiții.

h. Utilizarea peroxidazei imobilizate pentru eliminarea unor coloranți din apă

Peroxidaza din hrean a fost imobilizată cu succes prin legarea covalentă, pe două suporturi ReliZyme™ care conțin grupări epoxidice active.

Îmbunătățirea stabilității și a activității prin imobilizare pe un interval mai larg de pH, în special în intervalul de pH 5-6, valoare uzuală a pH-ului apelor contaminate cu coloranți.

Termostabilitatea enzimei a fost considerabil îmbunătățită prin imobilizare. În cazul peroxidazei imobilizate pe HFA 403, 90% din activitatea enzimatică inițială a fost regăsită după incubare timp de 30 minute la 55°C, în timp ce enzima nativă a pierdut ~ 60% din activitate în aceleași condiții.

Metoda de imobilizare selectată și suportul favorizat obținerea unui biocatalizator robust stabil, adecvat pentru mai multe cicluri de reutilizare cu o activitate ridicată. Enzima imobilizată a fost reutilizată cu succes în procesele de decolorare discontinue, activitatea rămânând la 80% din valoarea inițială după 10 cicluri de utilizare.

ABREVIERI

e.ep.- exces enantiomeric al produsului de reacție
SGE-1 - imobilizare prin entrapare în sol-gel prin Metoda 1
SGE-A - imobilizare prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite 545
Conv. - conversie
Atrans – activitate de transesterificare
[Oxim]BF₄ - tetrafluorborat de 1-octil-3-metilimidazoliu
PhTMOS - feniltrimetoxisilan
VTMOS - viniltrimetoxisilan
TMOS - tetrametoxisilan
MeTMOS - metiltrimetoxisilan
OcTMOS - octiltrimetoxisilan
Amano AK – lipaza din *Pseudomonas fluorescens*
Amano PS – lipaza din *Burkholderia cepacia*
Cal B - lipaza din *Candida antarctica* B
Cal A – lipaza din *Candida antarctica* A
SEM - microscopie electronica de scanare
FITC - microscopie de fluorescență
AFM - microscopie atomică de forță
FT-IR – Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier
rflow - productivitatea
Rac-1 – 2-octanol
Rac-2 – 1-feniletanol
E – coeficient de enantioselectivitate
THF – tetrahidrofuran
t-BuOH – terț-butanol

Bibliografie

- [1] K. Kakaei, M. D. Esrafil, A. Ehsani, Chapter 1 - Introduction to Catalysis, Interface Science and Technology, 2019, 27, 1-21.
- [2] P. N. Devine, R. M. Howard, R. Kumar, M. P. Thompson, M. D. Truppo, and N. J. Turner, Extending the application of biocatalysis to meet the challenges of drug development, Nature Reviews Chemistry, 2018, 2, 409–421.
- [3] J. Chapman, A. E. Ismail and C. Zoica Dinu, Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks, Catalysts 2018, 8, 238.
- [4] C. Paul, P. Borza and F. Péter, High thermal stability of sol-gel entrapped lipases, Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, 2015, 21(2), 173-180.
- [5] A. Ursoiu, P. Borza, C. Paul, F. Péter, Influence of silane precursors system composition on the catalytic efficiency of sol-gel immobilized lipases, Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara), 2012, 57(71), 1, 42-45.
- [6] K. P. Dhake, A. H. Karoyo, M. H. Mohamed, L. D. Wilson and B. M. Bhanage, Enzymatic activity studies of Pseudomonas cepacia lipase adsorbed onto copolymer supports containing β -cyclodextrin, J. Mol. Cat. B: Enzymatic, 2013, 87, 105-112.
- [7] A. Ursoiu, C. Paul, T. Kurtan, F. Péter, Sol-gel Entrapped Candida antarctica lipase B — A Biocatalyst with Excellent Stability for Kinetic Resolution of Secondary Alcohols, Molecules, 2012, 17, 11, 13045–13061.
- [8] C. Paul, P. Borza, A. Marcu, G. Rusu, M. Bîrdeanu, S. Marc Zarcu, F. Péter, Influence of the physico-chemical characteristics of the hybrid matrix on the catalytic properties of sol-gel entrapped Pseudomonas fluorescens lipase, Nanomater. Nanotechno., 2016, 6:0.
- [9] P. Borza, F. Péter, I. Hulka, C. Paul, Long-term exposure stability of sol-gel immobilized lipases in organic solvents, Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara), 2015, 60(74), 1, 25-30.
- [10] A. Todea, P. Borza, A. Cimporescu, C. Paul, F. Péter, Continuous kinetic resolution of aliphatic and aromatic secondary alcohols by sol-gel entrapped lipases in packed bed bioreactors, Catal. Today, 2018, 306, 223-232.
- [11] J. K. Poppe, C. R. Matte, V. O. de Freitas, R. Fernandez-Lafuente, R. C. Rodrigues, M. A. Z. Ayub, Enzymatic synthesis of ethyl esters from waste oil using mixtures of lipases in a plug-flow packed-bed continuous reactor, Biotechnology Progress, 2018, 34, 4, 952-959.
- [12] F. Strniša, M. Bajić, P. Panjan, I. Plazl, A. M. Sesay, P. Žnidaršič-Plazl, Characterization of an Enzymatic Packed-Bed Microreactor: Experiments and Modeling, Chemical Engineering Journal, 2018, 350, 541-550.
- [13] I. P. Borza, I. C. Benea, I. Bîtcă, A. Todea, S. G. Muntean, F. Peter, Enzymatic degradation of azo dyes using peroxidase immobilized onto commercial carriers with epoxy groups, Studia UBB Chemia, 2020, LXV, 1, 291-303.