

CREȘTEREA EFICIENȚEI CATALITICE ȘI STABILITĂȚII OPERAȚIONALE ȘI TERMICE A LIPAZELOR PRIN IMOBILIZARE, FOLOSIND METODE BAZATE PE TEHNICA SOL-GEL

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

Ing. Anca Ursoiu

Conducător științific:
Referenți științifici:

prof.univ.dr.ing. Francisc Péter
prof. dr. ing. Carmen Gabriela Boeriu
prof.dr. Andrei Anghel
prof.dr.ing. Corneliu-Mircea Davidescu

Ziua susținerii tezei: 19.12.2012

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

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

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

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2006

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

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

Cuvânt înainte

Teza de doctorat a fost elaborată pe parcursul activității prestate în perioada stagiului de doctorat cu frecvență la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului a Universității „POLITEHNICA” din Timișoara.

Mulțumiri deosebite, pentru realizarea acestei lucrări, se cuvin conducătorului științific, domnului Prof. Dr. Ing. Francisc PÉTER, pentru tot ce m-a învățat, pentru îndrumarea și sprijinul moral și științific acordat pe parcursul întregii perioade de stagiu.

Îmi exprim întreaga considerație față de membrii comisiei de doctorat, domnul președinte al comisiei, Prof. Dr. Ing. Nicolae VASZILCSIN, decan al Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului din cadrul Universității „Politehnica” din Timișoara, doamna Prof. Dr. Ing. Carmen Gabriela BOERIU de la Wageningen University and Research Center, Food & Biobased Research, Olanda, Prof. Dr. Andrei ANGHEL de la Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara, Prof. Dr. Ing. Corneliu-Mircea DAVIDESCU de la Universitatea „Politehnica” din Timișoara, care au răspuns solicitării de a face parte din comisia de analiză a tezei și pentru timpul acordat lucrării.

Doresc să mulțumesc de asemenea doamnei Asist. Dr. Ing. Ana Cristina Paul pentru sprijinul și sfaturile acordate de-a lungul elaborării tezei de doctorat. Mulțumesc doamnei Dr. Med. Simona Marc-Zarcula de la Universitatea de Științe Agronomice și Medicină Veterinară a Banatului pentru analizele de fluorescență, doamnei Dr. Paula Sfârloagă de la Institutul Național de Electrochimie și Materie Condensată Timișoara pentru analizele SEM și domnului Dr. Zoltán-Imre Dudás pentru analizele BET. Totodată, adresez mulțumiri colegilor mei, din cadrul Departamentului de Chimie Aplicată și Ingineria Compușilor Organici și Naturali, pentru ajutorul acordat, în special lui Ramona, Livia, Miha, Ana și Firuța și colegilor de la Disciplina de Biochimie din cadrul Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” din Timișoara.

Nu în ultimul rând, doresc să mulțumesc soțului și întregii mele familii, care mi-au fost alături și m-au susținut pe toată perioada derulării stagiului de doctorat.

Timișoara, decembrie 2012

Anca Ursoiu (căs. Marcu)

Lui Claudiu și părinților mei

Ursoiu, Anca

Creșterea eficienței catalitice și stabilității operaționale și termice a lipazelor prin imobilizare, folosind metode bazate pe tehnica sol-gel

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 66, Editura Politehnica, 2012, 194 pagini, 56 figuri, 66 tabele.

ISSN: 1842-8223; ISBN: 978-606-554-595-3

Cuvinte cheie:

biocataliză, lipaze, sol-gel, lichide ionice, enantioselectivitate, stabilitate

Rezumat:

Rezoluția amestecurilor racemice prin biocataliză cu hidrolaze este una dintre cele mai folosite strategii pentru obținerea la scară industrială a compușilor optic activi. Majoritatea biotransformărilor sunt efectuate cu preparate comerciale, iar lipazele din *Candida antarctica* și *Pseudomonas fluorescens* sunt cele mai enantioselective față de alcoolii secundari. Aceștia din urmă sunt de mare importanță, fiind compuși de pornire des utilizați în industria farmaceutică. Majoritatea metodelor convenționale de sinteză a medicamentelor sunt relativ costisitoare. Este necesară parcurgerea unui mare număr de etape sintetice în urma cărora rezultă amestecuri greu de purificat. Din acest motiv, biocataliza cu lipaze s-a dovedit a fi un procedeu convenabil. În cazul proceselor biocatalitice numărul etapelor este redus considerabil și nu mai sunt necesare purificări ulterioare.

Obiectivul principal al acestei teze de doctorat a fost obținerea unor noi biocatalizatori pentru rezoluția cinetică a amestecurilor racemice. S-a pus accent pe imobilizarea unor lipaze de origine microbiană folosind tehnici de tip sol-gel, optimizarea metodei de imobilizare, precum și caracterizarea din punct de vedere morfologic a preparatelor enzimatic obținute. S-a studiat influența sistemului de silani precursori asupra eficienței catalitice a lipazelor imobilizate. Pentru aceasta s-au studiat atât sisteme binare cât și ternare de silani precursori, formate din tetrametoxisilan (TMOS) și derivați silanici de tipul $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$, unde R poate fi o grupare alchil sau aril. De asemenea, s-a studiat influența lichidelor ionice folosite ca aditivi și influența suportului în cazul imobilizării prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție. S-a realizat caracterizarea din punct de vedere morfologic a lipazelor imobilizate. Activitatea preparatelor enzimatic obținute a fost testată în reacțiile de acilare enantioselectivă a unor alcoolii secundari (de la 2-pentanol la 2-nonanol). De asemenea, s-a studiat stabilitatea termică, posibilitatea de reutilizare a biocatalizatorilor, precum și stabilitatea în solvenți organici.

Teza de doctorat a fost realizată cu sprijin parțial din grantul strategic POSDRU/88/1.5/S/50783, Proiect ID50783 (2009), cofinanțat din Fondul Social European "Investește în oameni", în cadrul Programului Operațional Sectorial Dezvoltare Resurse Umane 2007-2013

CUPRINS

ABREVIERI

INTRODUCERE

1.	Capitolul 1. STUDIU DOCUMENTAR	12
1.1.	Biotehnologii industriale	12
1.2.	Biocataliza cu enzime izolate	12
	1.2.1. Generalități	12
	1.2.2. Clase de enzime	14
	1.2.3. Organizarea structurală a enzimelor	15
	1.2.4. Cataliza enzimatică	25
	1.2.5. Avantaje și dezavantaje ale biocatalizei comparativ cu cataliza enzimatică	26
	1.2.6. Cinetica enzimatică	26
	1.2.7. Proprietățile enzimelor	29
	1.2.7.1. Specificitate	30
	1.2.7.2. Stabilitate	34
	1.2.8. Aplicații industriale ale enzimelor	37
1.3.	Lipaze. Noțiuni generale	38
	1.3.1. Surse de lipaze	42
	1.3.2. Reacții catalizate de lipaze	44
1.4.	Imobilizarea enzimelor	49
	1.4.1. Necesitatea imobilizării	49
	1.4.2. Alegerea suportului	51
	1.4.3. Imobilizarea prin adsorbție	54
	1.4.4. Imobilizarea prin entrapare	55
	1.4.5. Entraparea în sol-gel	58

	1.4.6. Lichide ionice – aditivi la imobilizarea prin entrapare în matrici de sol-gel a lipazelor	61
	1.4.7. Evaluarea comparativă a metodelor de imobilizare	61
1.5.	Reacții biocatalitice în medii neconvenționale	61
	1.5.1. Reacții catalizate de lipaze în solvenți organici	63
	1.5.2. Biotransformări în lichide ionice	64
1.6.	Metode specifice pentru caracterizarea biocatalizatorilor imobilizați	68
	1.6.1. Investigarea structurii cu ajutorul microscopiei electronice de scanare (SEM)	68
	1.6.2. Măsurători ale ariei suprafeței specifice – metoda Brunauer-Emmet-Teller (BET)	70
2.	Capitolul 2. CONTRIBUȚII ORIGINALE	71
2.1.	Imobilizarea prin entrapare în matrici de sol-gel a unor lipaze de origine microbiană	72
	2.1.1. Influența raportului enzimă/suport asupra eficienței catalitice	72
	2.1.2. Optimizarea raportului molar al silanilor precursori	76
	2.1.3. Sisteme binare și ternare de silani precursori cu grupări vinil	81
	2.1.4. Influența lichidelor ionice folosite ca aditivi de imobilizare	85
	2.1.5. Influența mediului de reacție asupra activității lipazei din <i>Candida antarctica</i> B imobilizată în sol-gel	91
	2.1.6. Concluzii parțiale	92
2.2.	Imobilizarea prin entrapare în matrici de sol-gel combinată cu adsorbție a lipazelor microbiene	94
	2.2.1. Optimizarea încărcării cu enzimă	94
	2.2.2. Influența raportului silan-suport asupra eficienței catalitice	96
	2.2.3. Influența silanilor precursori asupra eficienței catalitice a lipazelor microbiene dublu imobilizate	99

	2.2.4. Influența naturii adsorbentului asupra eficienței catalitice	102
	2.2.5. Lichide ionice – aditivi la dubla imobilizare a lipazei din <i>Candida antarctica</i> B	109
	2.2.6. Influența mediului de reacție asupra enantioselectivității lipazei din <i>Candida antarctica</i> B imobilizată prin metoda combinată	113
	2.2.7. Concluzii parțiale	117
2.3.	Creșterea stabilității lipazelor prin imobilizare în sol-gel	119
	2.3.1. Reutilizarea lipazelor microbiene imobilizate	119
	2.3.2. Studiul termostabilității lipazelor microbiene imobilizate	124
	2.3.3. Stabilitatea în solvenți organici	126
	2.3.4. Concluzii parțiale	130
2.4.	Caracterizarea morfologică a unor lipaze microbiene imobilizate	131
	2.4.1. Microscopie electronică de scanare (SEM)	131
	2.4.2. Microscopie cu fluorescență	138
	2.4.3. Determinarea suprafeței specifice cu ajutorul metodei BET	143
	2.4.4. Concluzii parțiale	147
3.	Capitolul 3. PARTEA EXPERIMENTALĂ	148
3.1.	Metode de imobilizare a lipazelor	148
	3.1.1. Imobilizarea prin entrapare în sol-gel	148
	3.1.2. Imobilizarea prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție	152
3.2	Metode de analiză	156
	3.2.1. Analiza cantitativă prin cromatografie de gaze	156
	3.2.2. Metoda Bradford de determinare a proteinelor	158

3.2.3. Microscopie electronică de scanare (SEM)	160
3.2.4. Marcarea proteinelor cu fluorocromi	161
3.2.5. Determinarea suprafeței specifice (BET)	162
3.3. Rețete de lucru	162
3.3.1. Reacții de transesterificare	162
3.3.1.1. Reutilizarea preparatelor enzimaticice în reacții de transesterificare în mediu organic	164
3.3.1.2. Stabilitatea termică a biocatalizatorilor obținuți în reacții de transesterificare în mediu de solvent organic	164
3.3.1.3. Stabilitatea în solvenți organici a lipazei din <i>Candida antarctica</i> B	165
CONCLUZII FINALE	166
BIBLIOGRAFIE	171
ANEXE	178

INTRODUCERE

Chimia verde este un subiect intens discutat în ultimii ani. Aceasta se bazează pe utilizarea unui set de principii care reduc sau elimină folosirea substanțelor periculoase în proiectarea, sinteza și aplicarea unor produse chimice.

Rezoluția amestecurilor racemice prin biocataliză cu hidrolaze este una dintre cele mai folosite strategii pentru obținerea la scară industrială a compușilor optic activi. Majoritatea biotransformărilor sunt efectuate cu preparate comerciale, iar lipazele din *Candida antarctica* și *Pseudomonas fluorescens* sunt cele mai enantioselective față de alcoolii secundari. Aceștia din urmă sunt de mare importanță, fiind compuși de pornire des utilizați în industria farmaceutică. Majoritatea metodelor convenționale de sinteză a medicamentelor sunt relativ costisitoare. Este necesară parcurgerea unui mare număr de etape sintetice în urma cărora rezultă amestecuri greu de purificat. Din acest motiv, biocataliza cu lipaze s-a dovedit a fi un procedeu convenabil. În cazul proceselor biocatalitice numărul etapelor este redus considerabil și nu mai sunt necesare purificări ulterioare.

Utilizarea enzimelor imobilizate în practica biocatalitică oferă o serie de avantaje față de cele solubile. Aceste avantaje includ activitate și selectivitate ridicate, stabilitate îmbunătățită și posibilitatea de reutilizare. Există multe lucrări de specialitate dedicate descrierii metodelor de imobilizare a enzimelor și celulelor. Dintre acestea, entraparea în matrici de tip sol-gel este o tehnică ușor de realizat și cu o reproductibilitate ridicată.

Obiectivul principal al acestei teze de doctorat a fost obținerea unor noi biocatalizatori pentru rezoluția cinetică a amestecurilor racemice. S-a pus accent pe imobilizarea unor lipaze de origine microbiană folosind tehnici de tip sol-gel, optimizarea metodei de imobilizare, precum și pe caracterizarea din punct de vedere morfologic a preparatelor enzimatic obținute. S-a studiat influența sistemului de silani precursori asupra eficienței catalitice a lipazelor imobilizate. Pentru aceasta s-au studiat atât sisteme binare cât și ternare de silani precursori, formate din tetrametoxisilan (TMOS) și derivați silanici de tipul $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$, unde R poate fi o grupare alchil sau aril. De asemenea, s-a studiat influența lichidelor ionice folosite ca aditivi și influența suportului în cazul imobilizării prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție. S-a realizat caracterizarea din punct de vedere morfologic a lipazelor imobilizate. Activitatea preparatelor enzimatic obținute a fost testată în reacțiile de acilare enantioselectivă a unor alcoolii secundari (de la 2-pentanol la 2-nonanol). De asemenea, s-a studiat stabilitatea termică, posibilitatea de reutilizare a biocatalizatorilor, precum și stabilitatea în solvenți organici.

Această teză de doctorat este structurată în patru părți:

- ❖ **1. Studiu de literatură** – în care este prezentat stadiul actual al cercetărilor în domeniul biocatalizei cu lipaze, importanța temei, structura proteinelor, cinetica enzimatică, metode de imobilizare a enzimelor și metode de caracterizare a morfologiei preparatelor enzimatiche.
- ❖ **2. Contribuții originale** – în această parte sunt cuprinse rezultatele obținute pe parcursul cercetărilor experimentale efectuate, cuprinzând și obținerea unor noi lipaze imobilizate pentru rezoluția cinetică a alcoolilor secundari.
- ❖ **3. Partea experimentală** – prezintă procedurile experimentale folosite la imobilizarea lipazelor cu ajutorul tehnicilor de tip sol-gel, precum și metodele de analiză utilizate.
- ❖ **4. Concluzii finale** – în această secțiune sunt prezentate concluziile rezultate pe baza studiilor experimentale în conformitate cu obiectivele stabilite în cadrul programului de cercetare științifică.

ABREVIERI

Ser	serină
His	histidină
Asp	acid aspartic
[S]	concentrația molară a substratului
[E]	concentrația molară a enzimei
HNL	hidroxinitril liază
e.e.	exces enantiomeric, puritate optică
E	raport enantiomeric, enantioselectivitate
k_{cat}	constantă catalitică
k_M	constanta Michaelis-Menten
K	constanta de echilibru
CaLB	lipaza din <i>Candida antarctica</i> B
[Bmim]PF ₆	hexafluorofosfat de 1-butil-3-metilimidazoliu
PEG	polietilenglicol
[Emim]PF ₆	hexafluorofosfat de 1-etil-3-metilimidazoliu
[Omim]PF ₆	hexafluorofosfat de 1-octil-3-metilimidazoliu
Amano PS	lipaza din <i>Burkholderia cepacia</i> Amano PS
[Bmim]BF ₄	tetrafluoroborat de 1-butil-3-metilimidazoliu
MTBE	metil- <i>terț</i> -butil-eter
TMOS	tetrametoxisilan
MeTMOS	metiltrimetoxisilan
VTMOS	viniltrimetoxisilan
OctMOS	octiltrimetoxisilan
[Omim]BF ₄	tetrafluoroborat de 1-octil-3-metilimidazoliu
Conv.	conversie
A_{trans}	activitate de transesterificare
$\eta_{regăsire}$	randament de regăsire a activității enzimatice
PhTEOS	feniltrietoxisilan
OctTEOS	octiltrietoxisilan
[Emim]BF ₄	tetrafluoroborat de 1-etil-3-metilimidazoliu
PhTMOS	feniltrimetoxisilan
Amano AK	lipaza din <i>Pseudomonas fluorescens</i> Amano AK
[Hmim]BF ₄	tetrafluoroborat de 1-hexil-3-metilimidazoliu
[Emim]OOCCH ₃	acetat de 1-etil-3-metilimidazoliu
[Emim]OOCF ₃	trifluoroacetat de 1-etil-3-metilimidazoliu
[Bmim]Tf ₂ N	bis[(trifluorometil)sulfonil] amida de 1-butil-3-metilimidazoliu
THF	tetrahidrofuran
SG	imobilizare prin entrapare în sol-gel
<i>i</i> -PrOH	alcool izopropilic
$\eta_{imobilizare}$	randament de imobilizare

1. STUDIU DOCUMENTAR

1.1. Biotehnologii industriale

Biotehnologia reprezintă o serie de tehnologii care permit manipularea organismelor vii sau a subcomponentelor celulare pentru a dezvolta produse, procese sau servicii. Biotehnologia cuprinde o gamă largă de domenii, inclusiv științele naturii, chimia, agricultura, ecologia, medicina, medicina veterinară și știința calculatoarelor [1]. Biotehnologia modernă a avansat foarte mult în ceea ce privește controlul proceselor biologice. Intervine în mod rațional cu ajutorul modificării direcționate a materialului genetic (ADN) al organismelor, sau prin cultivarea in-vitro (într-un bioreactor sau fabrică) a microorganismelor, celulelor vegetale sau animale pentru sinteza unor produși utili sau pentru a permite dezvoltarea unor procese care nu sunt eficiente sau nu pot avea loc pe cale chimică clasică [2].

Biocataliza exploatează de obicei proprietăți avantajoase ale enzimelor, cum ar fi chemo-, regio- și enantioselectivitatea și varietatea de substraturi folosite. În ciuda progresului înregistrat în ultimii ani, potențialul biocatalizei este în continuă creștere. Sunt dezvoltați noi catalizatori care să satisfacă cerințele producătorilor [3].

1.2. Biocataliza cu enzime izolate

1.2.1. Generalități

Enzimele, cunoscute și sub denumirea de biocatalizatori, sunt acceleratori naturali ai reacțiilor (bio)chimice. Sunt proteine active catalitic care au evoluat și s-au perfecționat de-a lungul a bilioane de ani. Fiind catalizatori foarte specifici și eficienți, ele direcționează chimia vieții fără a necesita condiții extreme de temperatură, presiune și pH, spre deosebire de procesele sintetice chimice. Enzimele sunt mașinăria lumii vii, iar proprietățile lor uimitoare sunt intens folosite pentru aplicații industriale. Această disciplină tehnică este numită biocataliză [3].

Termenul „enzimă” a fost folosit ca noua denumire pentru a indica fenomenul cunoscut anterior ca „fermenți neorganizați”, care au fost izolați din organisme viabile în care se formau. Ad literam, cuvântul înseamnă „în drojdie” și derivă din grecescul „en” (în) și „zyme” (însemnând drojdie sau plămădă). În organismele vii, majoritatea reacțiilor sunt catalizate de molecule proteice numite enzime, care sunt mașinăria catalitică a sistemelor vii. Omul a folosit enzimele indirect aproape de la începuturile istoriei umanității. Acestea sunt responsabile pentru fermentația biocatalitică a zahărului la etanol cu ajutorul drojdiilor, o reacție care constituie bazele fabricării berii și vinului. Enzimele oxidează etanolul la acid acetic. Această reacție a fost utilizată la obținerea oțetului de mii de ani. O scurtă istorie a enzimelor și aplicațiilor lor se poate găsi în Tabelul 1.1 [3].

Tabelul 1.1. Scurt istoric al enzimelor și aplicațiilor lor [3]

Data	Descoperire și aplicații	Referințe
î.e.n.	Chimozina din stomacul bovinelor tinere, oilor și caprelor, a fost folosită pentru producerea brânzei în multe culturi antice pentru aproximativ 7000 ani	
1783	A fost demonstrată hidroliza cărnii cu ajutorul sucului gastric	Spallazani
1814	A fost observată degradarea amidonului și obținerea zahărului cu ajutorul orzului fermentat	Kirchhoff
1833	Diastaza este principiul activ al malțului și a fost descrisă aplicația sa industrială	Payen și Persoz
1846	A fost observată activitatea invertazei	Dubonfout
1867	Este inventat termenul „enzimă” pentru a descrie activitatea catalitică fără legătură cu celulele vii (fermenți neorganizați). Denumirea este extinsă mai târziu și pentru catalizatorii intracelulari (denumiți de Pasteur fermenți organizați)	Kühne
1893	Este dată definiția catalizatorului care include și enzimele	W. Ostwald
1894	Este anticipată stereospecificitatea enzimelor. Apare conceptul „lacăt-cheie”	E. Fischer
1894	„Taka diastaza” este produsă comercial prin cultura de suprafață cu <i>Aspergillus oryzae</i>	Takamine
1897	A fost demonstrată conversia glucozei la etanol de către un extract fără celule din drojdie	E. Buchner
1906	S-a efectuat separarea preparativă a L-leucinei din racemic obținut prin hidroliza esterului propilic cu extracte din ficat	Warburg
1908	A fost descrisă sinteza cianhidrinelor active optic folosind D-oxinirerilază din migdale ca și catalizator	Rosenberg
1908	Folosirea enzimelor pancreatice în pielărie	O. Röhm
1911-1913	Este descrisă sinteza glucozidei în prezența unei concentrații ridicate de etanol sau acetonă	Bourquelot, Bridel și Verdon
1913-1915	A fost introdusă folosirea enzimelor pancreatice pentru curățarea rufelor, primul produs comercial vândut	Compania Röhm
1916	A fost demonstrată imobilizarea invertazei pe cărbune cu reținerea activității	Nelson și Griffin
1926	A fost cristalizată ureaza din boabele de fasole	J. B. Summer
1936	A fost îmbunătățită sinteza enzimatică a esterilor folosind lipaza pancreatică în prezență de benzen	E. Sym
1953	A fost stabilită prima structură primară a unei proteine (insulina), fiind demonstrată astfel identitatea chimică a proteinelor	F. Sanger, H. Tuppy
1960	S-a cultivat <i>Bacillus licheniformis</i> în cultură imersată pentru producția proteazei la scară mare de către Novo	Novo
1980-	Aplicarea tehnicilor de inginerie genetică pentru a îmbunătăți producerea enzimelor și pentru a modifica proprietățile acestora prin ingineria proteinelor	

1.2.2. Clase de enzime

Enzimele sunt clasificate de către **Sistemul de Nomenclatură al Uniunii Internaționale de Biochimie (IUB)** în funcție de tipul reacției catalizate și de mecanism [5]. Acest sistem divide reacțiile și enzimele care le catalizează în șase categorii. Fiecare clasă este constituită din 4-13 subclase. Numele enzimelor este format din două părți. Prima parte indică substratul și a doua tipul de reacție, cu informații adiționale date între paranteze unde este cazul [4].

A fost adoptat un sistem de numerotare datorită confuziilor și denumirilor contradictorii date de IUB (de exemplu, pentru o enzimă care catalizează o reacție reversibilă, ar putea fi dificil de determinat care compus este substratul). Acest cod este sub forma:

EC a.b.c.d., unde:

- a- reprezintă clasa
- b- reprezintă subclasa
- c- reprezintă sub-subclasa
- d- reprezintă numărul pentru enzima specifică [4].

Tabelul 1.2. Clasificarea internațională a enzimelor [4]

1. Oxidoreductaze (reacții de oxido-reducere)	4. Liaze (adiția la legături duble)
1.1. Acționează asupra legăturii hidroxilice	4.1. Legături duble C=C
1.2. Acționează asupra legăturii carbonilice	4.2. Legături C=O
1.3. Acționează asupra legăturii duble C=C	4.3. Legături C=N
1.4. Acționează asupra legăturii aminice	
1.5.	
1.6. Acționează asupra NADH; NADPH	
2. Transferaze (transferul unor grupe funcționale)	5. Izomeraze (reacții de izomerizare)
2.1. Grupe cu un atom de carbon	5.1. Racemaze
2.2. Grupe aldehydice sau cetonice	
2.3. Grupe acil	
2.4. Grupe glicozil	
2.7. Grupe fosfat	
2.8. Grupe care conțin sulf	
3. Hidrolaze (reacții de hidroliză)	6. Ligaze (Formarea de legături cu scindarea ATP)
3.1. Esteri	6.1. C-O
3.2. Legături glicozidice	6.2. C-S
3.3. Legături peptidice	6.3. C-N
3.4. Alte tipuri de legături C-N	6.4. C-C
3.4. Anhidride acide	

1.2.3. Organizarea structurală a enzimelor

În chimia polipeptidelor, termenul de **conformație** trebuie utilizat pentru a descrie diferite aranjamente spațiale ale atomilor produse prin rotația lor în jurul legăturilor covalente; o modificare conformațională nu implică scindarea legăturilor chimice (excepție fac legăturile de hidrogen) sau scindări în chiralitate [5, 6].

Structura proteinelor poate fi descrisă prin patru nivele de organizare: primară, secundară, terțiară și cuaternară.

Structura primară este reprezentată de secvența (numărul și succesiunea) aminoacizilor și nu înglobează aranjamente spațiale, cu excepția configurației α -atomului de carbon. Din considerente practice, α -aminoacizii din structura primară a moleculelor proteice sunt simbolizați cu denumiri codificate. Succesiunea aminoacizilor în aceste catene polipeptidice este reglată de aparatul genetic al celulei. De aceea, aceeași enzimă provenită din surse diferite nu va avea obligatoriu aceeași structură primară, însă ele vor fi asemănătoare [6].

Ca structură primară, enzimele sunt polipeptide rezultate prin policondensarea aminoacizilor care intră în componența lor. Catena polipeptidică rezultată va fi polară la cele două capete, la un capăt având o grupare aminică încărcată pozitiv, acesta fiind denumit **capătul N-terminal**, iar la celălalt capăt va avea o grupare carboxilică încărcată negativ, acesta fiind **capătul C-terminal**. Resturile de aminoacizi din componența moleculei proteice se numerotează în ordine, începând de la capătul N-terminal. Astfel, o referire la "restul activ Ser 152" din lipaza pancreatică înseamnă că este vorba de cel de-al 152-lea aminoacid din structura primară a enzimei respective, care face parte din structura centrului activ [6].

Elucidarea structurii primare a unei enzime este un procedeu extrem de laborios ce cuprinde izolarea ei în stare pură, scindarea în catenele polipeptidice componente și determinarea numărului lor, scindarea acestor catene peptidice în peptide mai mici, apoi a acestora în aminoacizi și identificarea tuturor acestor aminoacizi. Trebuie menționat că în cazul enzimelor extracelulare resturile de cisteină se leagă adeseori unele de altele formând așa-numitele punți disulfidice, ceea ce face ca molecula proteică să poată fi constituită din mai multe catene polipeptidice. Structura primară nu include pozițiile acestor legături disulfidice [6].

La ora actuală s-a reușit stabilirea secvenței primare de aminoacizi pentru un număr mare de enzime și chiar este posibilă înlocuirea unor aminoacizi din această secvență, folosind metodele ingineriei genetice [6].

Structura secundară reprezintă structura tridimensională de bază conținând aranjamentul spațial al principalilor atomi ce constituie scheletul catenei polipeptidice, fără a ține cont de conformația catenelor laterale și de relațiile cu alte segmente [6].

Aceasta se bazează pe formarea de legături de hidrogen în cadrul aceleiași catene polipeptidice, donorul fiind hidrogenul grupării NH al unui aminoacid, iar acceptorul oxigenul carbonilic al altui aminoacid. O asemenea legătură de hidrogen intracatenară se poate realiza doar prin răsucirea a două legături cu rotire liberă, astfel ca grupările respective să devină stereochemic adiacente [6].

S-a arătat că din cauza caracterului parțial de dublă legătură, a legăturii C-N, cei șase atomi ai unei unități peptidice vor trebui să se găsească în același plan. Singurele legături din scheletul de bază care permit rotația liberă în aceste condiții sunt legăturile simple din cadrul fiecărui rest de aminoacid [7]:

- legătura dintre α -atomul de carbon și atomul de azot amidic;

- legătura dintre α -atomul de carbon și atomul de carbon carbonilic.

S-a demonstrat că pentru formarea unor legături de hidrogen intracatenare stabile există două conformații pe care le poate adopta catena polipeptidică: **α -elicooidală** și **β -pliată**. Există și alte structuri posibile, însă acestea sunt de departe cele mai importante [6].

În **structura α -elicooidală**, ce se întâlnește în interiorul aceleiași catene polipeptidice, această catenă este răsucită ca în jurul unui cilindru și permite un aranjament liniar al atomilor implicați în legătura de hidrogen, ceea ce conferă legăturii tăria maximă posibilă. Pentru aceasta este necesar ca între cele două grupări implicate să fie cel puțin 3 resturi de aminoacizi. S-a demonstrat experimental că **un pas de elice** este format din **3-6 resturi de aminoacizi**, α -elicea este orientată spre dreapta, iar distanța dintre două puncte echivalente, corespunzătoare unor rotații succesive, este de 5,4 Å (Figura 1.1. a) [7].

Cel de-al doilea tip de structură secundară întâlnit la enzime este **structura β -pliată**, care ia naștere datorită legăturilor de hidrogen ce se stabilesc mai ales între catene polipeptidice diferite. Aceasta diferă total de structura elicooidală, deoarece scheletul polipeptidic nu mai este răsucit ci aproape complet întins (Figura 1.1. b) [7].

Dacă cele două catene polipeptidice merg în aceeași direcție (considerând de la capătul N-terminal spre cel C-terminal), se obține o structură **β -pliată paralelă**, iar dacă merg în sens invers, o structură **β -pliată antiparalelă**. Formarea legăturilor de hidrogen între catenele polipeptidice duce la un aranjament în zig-zag a fragmentelor peptidice, care a primit din acest motiv denumirea de structură pliată [6].

Structurile α -elicooidale și cele β -pliate sunt combinate într-o serie de modalități în proteine și enzime, întrucât catena polipeptidică se răsucește de mai multe ori. Această răsucire se face, din considerente sterice, doar în dreptul unor aminoacizi care pot avea o conformație care se poate răsuci invers pentru a permite întoarcerea catenei. Acest lucru este posibil în cazul glicinei, care are doar un atom de hidrogen în catena laterală ce nu creează probleme de împiedicare sterică și în cazul prolinei care are o structură ciclică. Combinațiile care iau naștere în acest mod sunt numite **structuri supersecundare**, cele mai răspândite fiind cele de tipul **$\beta\alpha\beta$** , în care două structuri β -pliate antiparalele sunt conectate prin intermediul unei structuri α -elicooidale [6].

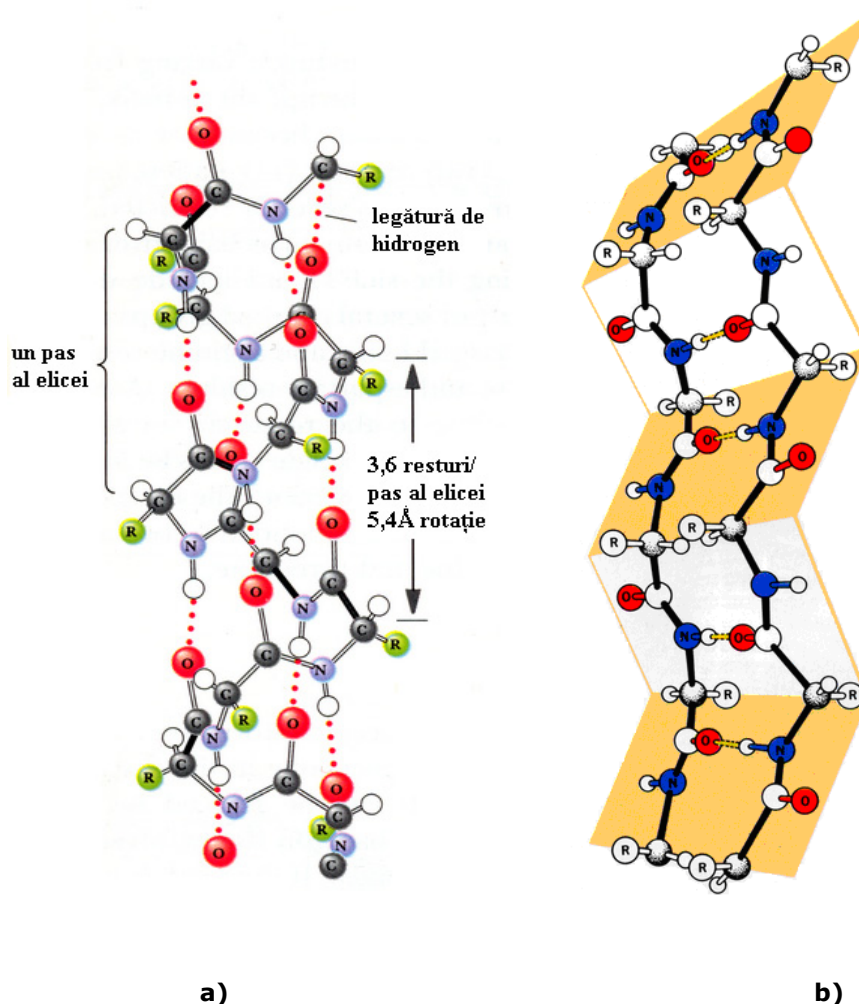


Figura 1.1. Structura secundară a) conformația α -elicoidală și b) conformația β -pliată a enzimelor [7].

Structura terțiară constă din aranjamentul spațial al tuturor atomilor, fără a ține cont de relațiile cu moleculele vecine sau cu subunități ale moleculei. Conformațiile grupărilor care fac parte din catenele laterale și cele ale grupărilor prostetice sunt componente ale structurii terțiare, cât și aranjamentele unele față de altele ale secțiunilor elicoidale și ale celor pliate [6].

Principalele legături de tip covalent implicate în menținerea structurii terțiare sunt *punțile disulfidice*, care pot fi inter- sau intramoleculare. Alături de acestea, la stabilizarea structurilor terțiare mai contribuie *legăturile de hidrogen*, *legăturile ionice*, *legăturile coordinative ale ionilor metalici* și *legăturile hidrofobe de tip Van der Waals* așa cum se poate observa și din Figura 1.2 [7].

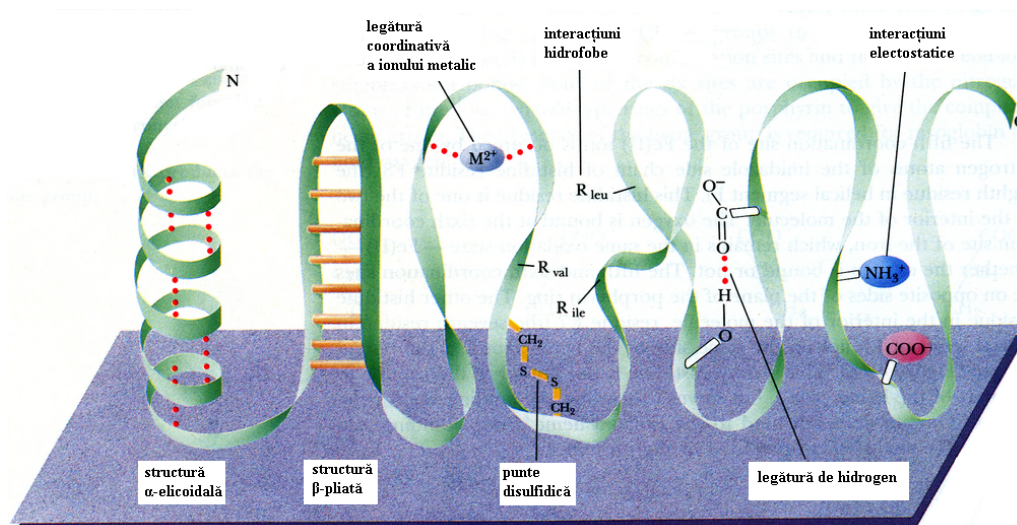


Figura 1.2. Legături care stabilizează structura terțiară a enzimelor [7].

Putem considera că diferitele elemente ale structurii secundare se aranjează unele față de altele într-un spațiu tridimensional, realizându-se anumite legături între aminoacizii din aceeași catenă sau cei din catene diferite și rezultând structura terțiară a enzimei respective [6].

Structura terțiară se poate determina combinând rezultatele obținute prin analiză de difracție cu raze X și rezonanță magnetică nucleară bidimensională. În acest mod, a fost posibilă elaborarea unor modele moleculare care redau structurile terțiare respective. La ora actuală a fost determinată structura terțiară a unui mare număr de enzime. Aceste structuri de găsesc în bănci de date specializate, de exemplu www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes al European Bioinformatics Institute, care la data de 8 iulie 2012 conținea un număr de 43.939 de structuri [8].

Cunoașterea structurilor terțiare are o mare importanță deoarece permite stabilirea conformației centrului catalitic activ. În cazul enzimelor, rolul principal al organizării moleculei într-o structură terțiară răsucită (folding) este aducerea unor resturi de aminoacizi aflate în diferite părți ale catenei polipeptidice într-o proximitate geometrică, tocmai în scopul formării acestor centre active. Un exemplu tipic în acest sens sunt **serinproteazele**, care scindează anumite legături peptidice din moleculele proteinelor. Toate aceste enzime trebuie să conțină în centrul lor activ un rest de serină care acționează ca agent nucleofil de bază la atacarea legăturii peptidice. Pentru a crește nucleofilicitatea acestuia, hidroxilul serinic participă la o legătură de hidrogen cu un atom de azot din restul de histidină aflat tot în centrul activ. Hidrogenul legat de celălalt atom de azot al histidinei participă la rândul său la o legătură de hidrogen cu oxigenul dintr-un rest de aspartat, al treilea constituent al centrului active [6].

Acest triplet, **Ser-His-Asp**, se numește **triadă catalitică** și este caracteristică tuturor serin-proteazelor. De exemplu în enzima chimotripsină, triada catalitică este compusă din resturile Ser 195, His 57 și Asp 102. În alte serin-proteinaze vom avea în triada catalitică aceiași trei aminoacizi dar provenind din alte

poziții ale moleculei, ceea ce înseamnă că și specificitatea enzimelor respective va fi diferită de cea a chimotripsinei [6].

Centrul activ se poate defini așadar ca o zonă (cavitate) distinctă în care se leagă molecula de substrat pentru a se iniția reacția enzimatică. Între structura moleculei de substrat și cea a centrului activ trebuie să existe o strânsă relație stereochemică [6].

Structura cuaternară reprezintă cel mai înalt nivel de organizare a macromoleculei proteice, constând în aranjamentul subunităților ei în spațiu și ansamblul interacțiunilor dintre aceste subunități, fără a ține cont însă de geometria internă a subunităților. De multe ori, apariția funcției biologice necesită existența nu doar a unei singure catene polipeptidice răsucite, ci a mai multor asemenea catene. Fiecare subunitate a structurii cuaternare reprezintă o catenă polipeptidică ce posedă o structură primară, secundară și terțiară proprie. Aceste catene polipeptidice sunt legate prin interacțiuni necovalente. Cea mai mică subunitate se numește monomer, structura constituită din cel puțin doi monomeri se numește multimer, iar starea asociată respectivă structură cuaternară sau agregat cuaternar. În general, enzimele cu structură cuaternară sunt constituite din subunități identice (homomultimeri) (Figura 1.3), dar există și enzime formate din subunități diferite (heteromultimeri). *Activitatea biologică* poate fi o proprietate specifică numai multimerului dar și monomerii pot poseda funcție catalitică. Astfel, enzima prostaglandin sintază este un homodimer, în care fiecare subunitate are câte un centru activ ce acționează independent. În schimb în citocrom oxidaze, centrul activ se găsește în subunitatea 1, iar alte 3-12 subunități (în funcție de specie), au rolul de a stabiliza structura și de a modifica activitatea specifică a enzimei. Există și enzime în care resturile de aminoacizi din centrul activ provin din mai multe subunități ale moleculei, un exemplu în acest sens fiind HIV proteaza [9].

În cazul enzimelor formate din două sau mai multe catene polipeptidice, legate între ele prin legături de tip covalent (de exemplu punți disulfidice), aceste catene trebuie considerate ca unități constituente ale unei structuri terțiare și nu cuaternare [6].

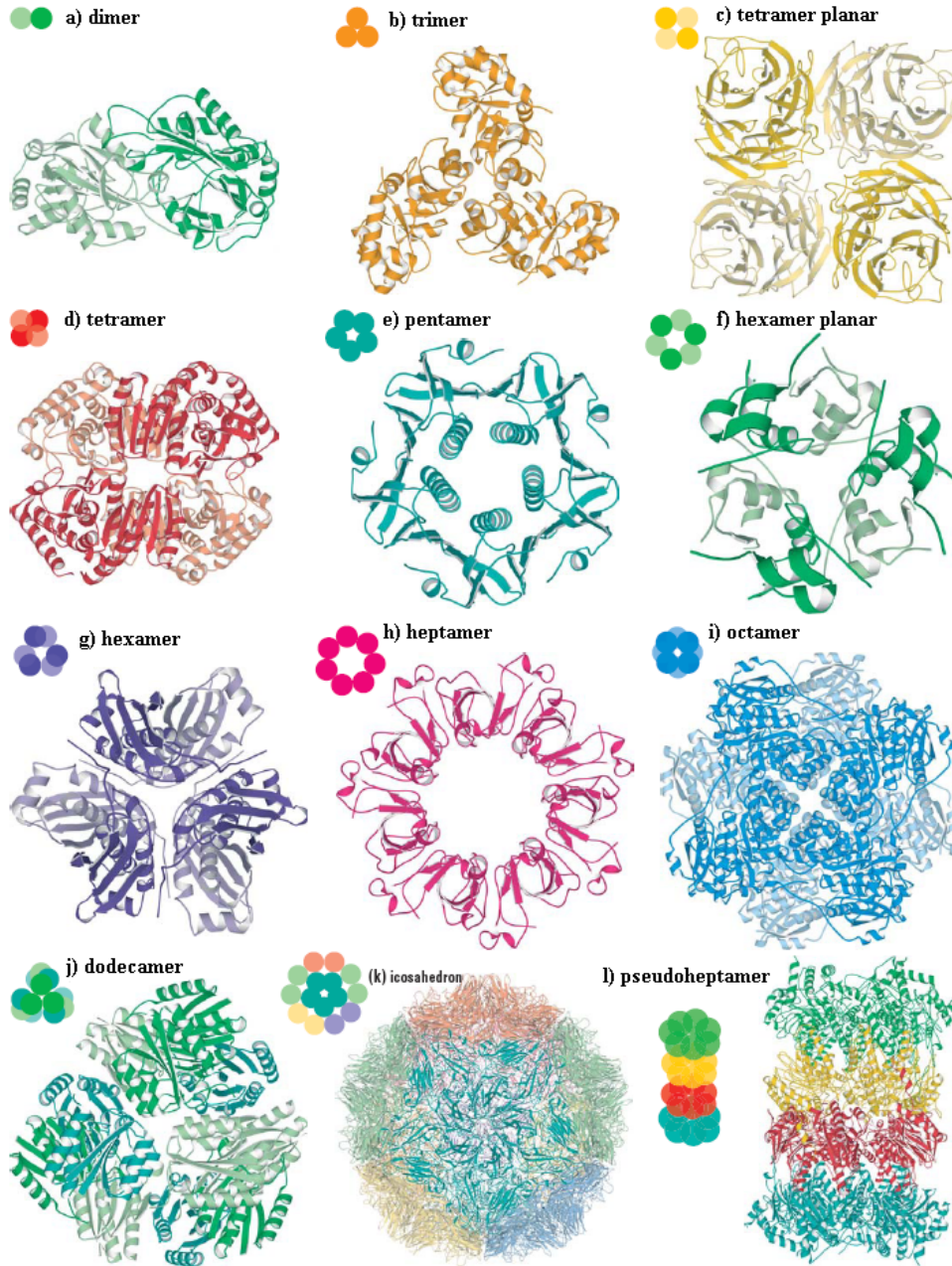


Figura 1.3. Structură cuaternară a enzimelor constituite din subunități identice, homomultimeri [9].

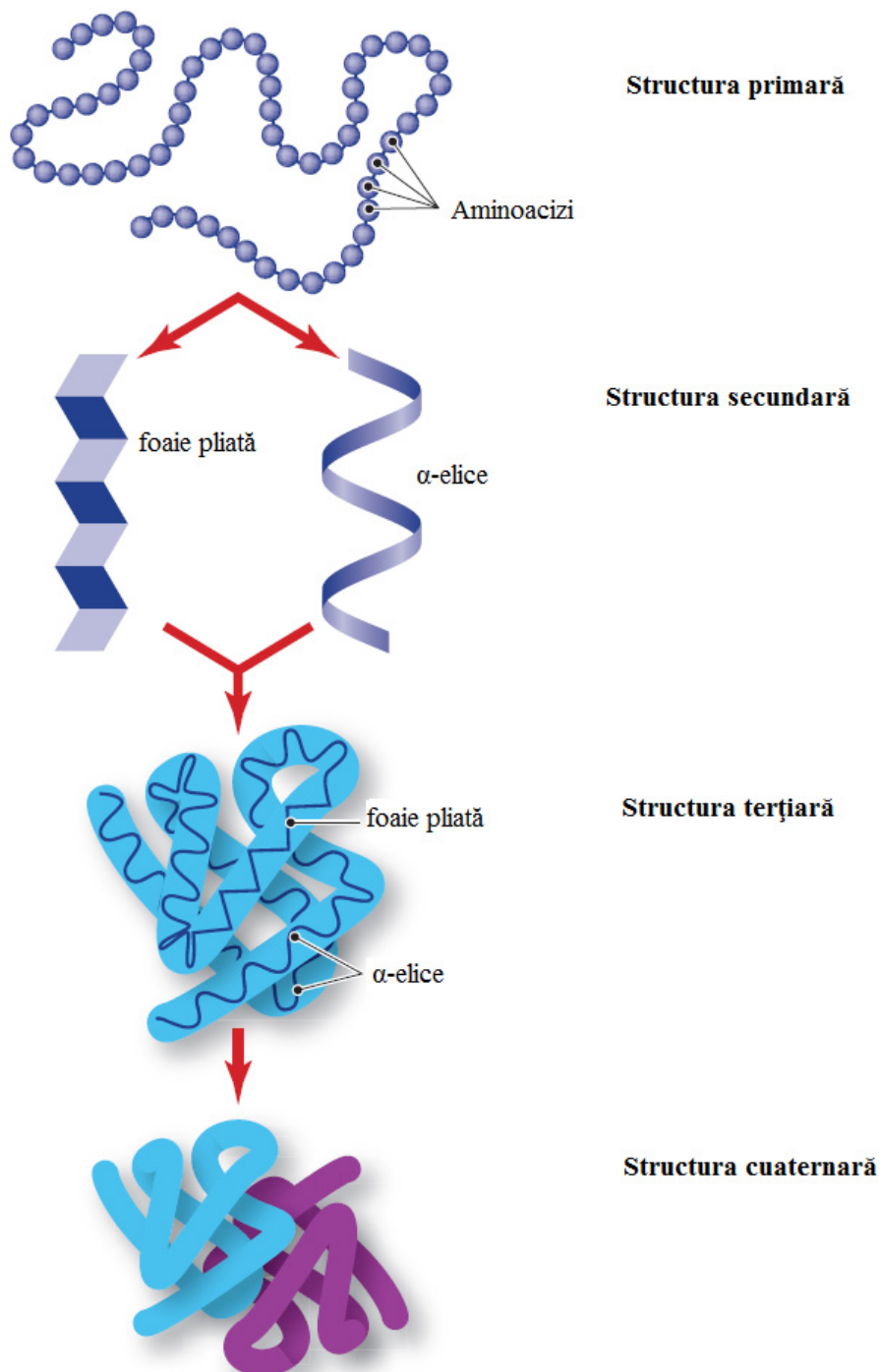


Figura 1.4. Structura proteinelor [10].

Enzimele în general conferă viteză, specificitate și control reacțiilor pe care le catalizează. Reacțiile catalizate de enzime urmează trei pași de bază:

- Legarea de substrat: $E + S \leftrightarrow ES$
- Conversia legării de substrat la cea de produs: $ES \leftrightarrow EP$
- Eliberarea produsului: $EP \leftrightarrow E + P$

Enzima se leagă de substraturile reacției pe care o catalizează și le aduce împreună la orientarea potrivită pentru a reacționa. Apoi participă la formarea și scindarea legăturilor necesare pentru formarea produsului, eliberarea sa și revenirea la starea inițială odată ce reacția este completă. Puterea catalitică a unei enzime (viteza reacției catalizate raportată la cea a reacției necatalizate) este de obicei de ordinul 10^6 până la 10^{14} . Fără puterea lor catalitică, reacții cum ar fi cele implicate în conducția nervoasă, contracția inimii și digestia alimentelor ar fi prea lente pentru ca viața să existe [11, 12].

Fiecare enzimă catalizează de obicei o reacție biochimică specifică. Abilitatea unei enzime de a selecta un singur substrat și de a-l distinge dintr-un grup de compuși foarte similari este denumită **specificitate**. Aceasta rezultă din unicitatea secvenței de aminoacizi specifici care formează structura tridimensională a enzimei [12].

Pentru a cataliza o reacție chimică, enzima formează un complex enzimă-substrat în *centrul* său *catalitic*. Grupele funcționale sunt cedate de către lanțul polipeptidic sau de către cofactori (metale sau molecule organice complexe denumite coenzime). În timp ce are loc legarea substratului, acesta induce modificări conformaționale în enzimă ce promovează mai departe interacțiuni între moleculele substratului și grupele funcționale ale enzimei (de exemplu, o coenzimă poate forma un intermediar covalent cu substratul, sau un lanț lateral de aminoacizi poate sustrage un proton din substratul reactiv). Substratul activat și enzima formează o stare de tranziție, un complex instabil cu structură intermediară între cea a substratului și cea a produsului. Legături adiționale cu enzima stabilizează complexul intermediar și scad energia necesară pentru formarea sa. Complexul de tranziție se descompune în produși. Enzima revine în forma sa inițială de obicei, apoi se leagă de un alt substrat și repetă întreg procesul [12].

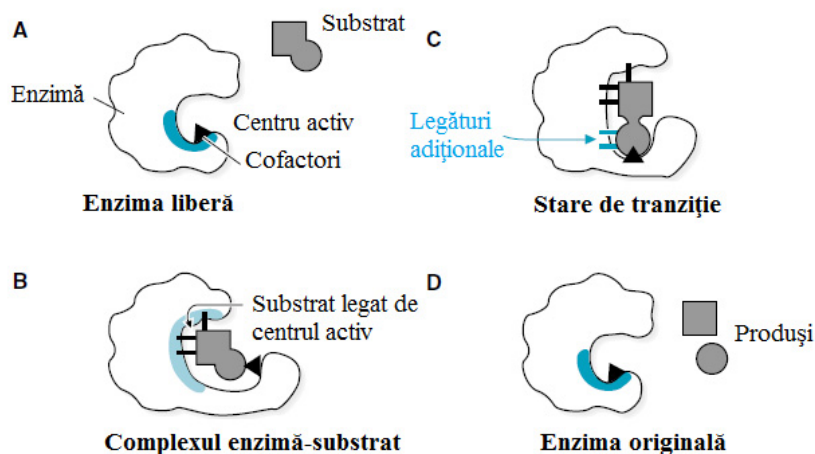


Figura 1.5. Reacția în centrul activ catalitic al enzimei. **A.** Enzima conține un centru activ catalitic, cu o regiune sau un domeniu unde se leagă substratul. Centrul activ poate conține și cofactori, componente neproteice care asistă în procesul catalitic. **B.** Substratul formează legături cu resturile de aminoacizi din centrul de legare. Legarea substratului induce o modificare conformațională în centrul activ. **C.** Grupele funcționale din resturile de aminoacizi și cofactorii participă la formarea stării tranziționale, care este stabilizată prin legături necovalente adiționale cu enzima. **D.** Pe măsură ce produsul de reacție este eliberat, enzima revine la conformația sa originală [12].

Specificitatea enzimelor (abilitatea de a reacționa cu un singur substrat) rezultă din aranjamentul tridimensional al resturilor de aminoacizi specifici din enzimă care formează centri de legare pentru substraturi și le activează pe parcursul reacției. Modelul „cheie-lacăt” și „potrivire indusă” pentru legarea substratului descriu două aspecte ale interacțiunii de legare dintre enzimă și substrat [12].

Modelul cheie-lacăt pentru legarea substratului

Centrul de legare conține resturi de aminoacizi aranjate într-o suprafață tridimensională complementară care „recunoaște” substratul și îl leagă prin interacțiuni hidrofobe multiple, interacțiuni electrostatice sau legături de hidrogen. Resturile de aminoacizi care leagă substratul pot proveni din diferite părți ale secvenței liniare de aminoacizi ai enzimei. Legarea unor compuși cu o structură care diferă de substrat chiar și într-o mică măsură poate fi prevenită prin împiedicare sterică și sarcină de respingere. În cazul modelului descris mai sus, complementaritatea dintre substrat și centrul său de legare este comparată cu potrivirea unei chei într-un lacăt rigid [12].

Pentru ca o reacție să aibă loc, substratul trebuie să fie activat. Dacă nivelele energetice ale acestuia sunt reprezentate grafic pe măsura convertirii substratului în produs, curba va prezenta un nivel de energie maxim care este mai mare decât cel al produsului sau al substratului. Acest nivel ridicat apare la formarea stării de tranziție. În cazul unor reacții catalizate de enzime, starea de

tranziție este o condiție în care legăturile din substrat sunt tensionate la maximum. Pentru alte reacții enzimactice, configurația electronică a substratului devine foarte tensionată și instabilă pe măsură ce trece în starea de tranziție. Cel mai ridicat nivel energetic corespunde celei mai instabile configurații a substratului și momentului în care molecula substratului modificat este cel mai puternic legată de grupele funcționale participante din enzimă. Diferența de energie dintre substrat și starea de tranziție este denumită **energie de activare** [12].

În cadrul reacțiilor catalitice, catalizatorii – prezenți în cantități mici, controlate și neafecțați la sfârșitul reacției - accelerează viteza de reacție. Ei sunt folosiți pentru a micșora energia de activare a reacției comparativ cu reacția necatalizată corespunzătoare, având astfel ca rezultat viteze de reacție mai ridicate la aceeași temperatură. În acest fel, catalizatorul permite ca reacțiile sau procesele să aibă loc mai eficient sau în condiții mai blânde decât ar fi altfel posibil. Spre deosebire de alți reactanți, un catalizator nu se consumă în reacție [12].

Cataliza este o tehnologie cheie care oferă soluții reale pentru multe probleme de mediu și care promovează sustenabilitatea, ecologia, energia, sănătatea și calitatea vieții [13].

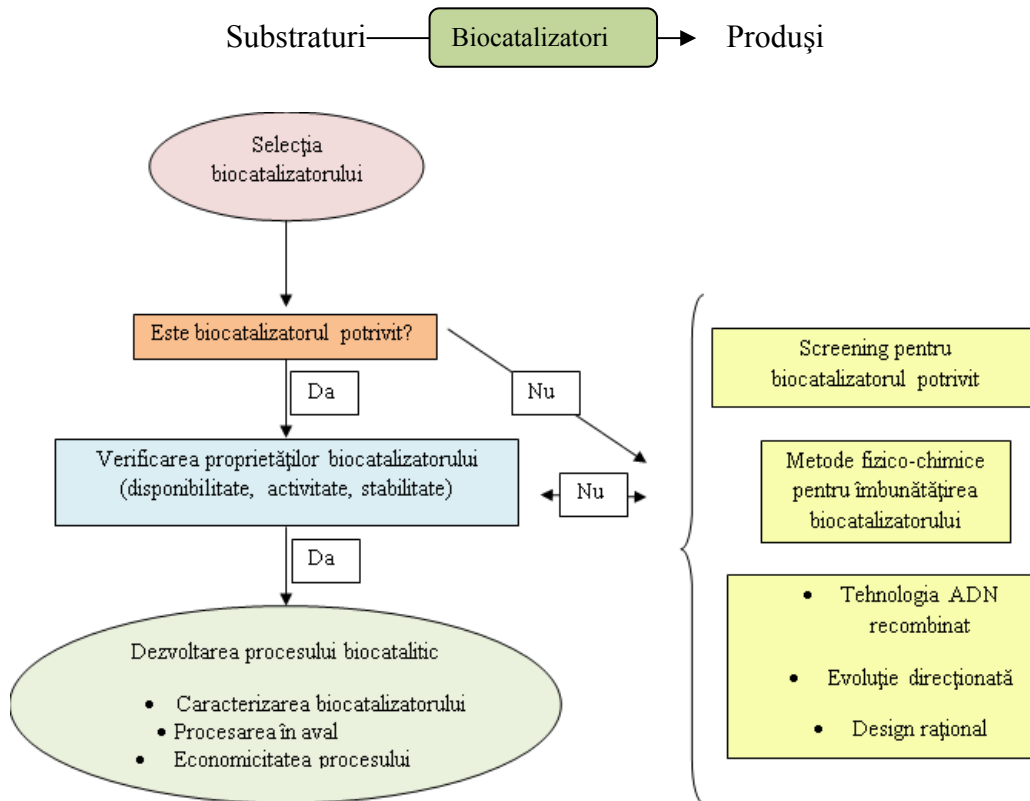


Figura 1.6. Strategii pentru dezvoltarea unui proces biocatalitic [176]

1.2.4. Cataliza enzimatică

Reacțiile chimice sunt mult prea lente pentru a fi eficiente în condițiile normale pentru sistemele vii, cum ar fi medii apoase cu pH neutru și temperaturi cuprinse între 20-40°C. Cu ajutorul enzimelor se pot atinge viteze de reacție de până la 10^7 ori mai mari decât cu ajutorul catalizatorilor dezvoltați de industria chimică. Ele modifică viteza la care este atins echilibrul termodinamic, fără a schimba acest echilibru și aceasta datorită faptului că enzimele acționează reversibil. Creșterea vitezei de reacție se realizează prin reducerea energiei de activare a procesului global, așa cum reiese din figura 1.7:

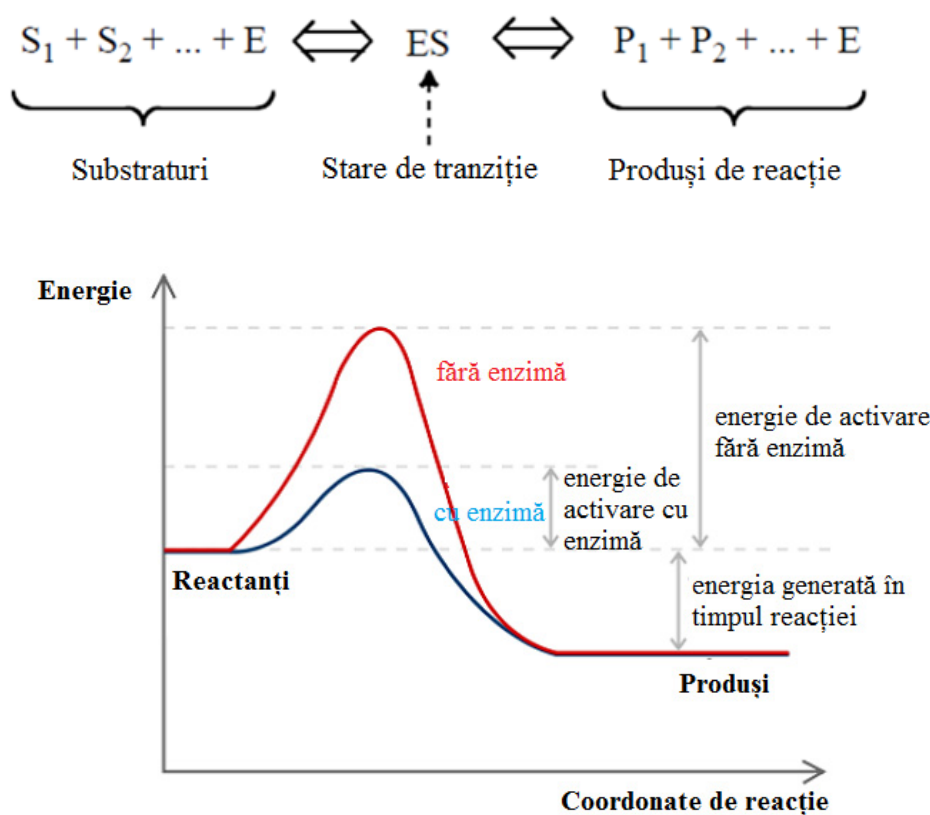


Figura 1.7. Principiul general al catalizei enzimatice [12]

Motivul pentru care chimiștii au devenit interesați de domeniul biocatalizei este datorat mai ales necesității de a sintetiza compuși chirali ca și blocuri de pornire pentru obținerea medicamentelor și a produselor agrochimice. Alt avantaj important al biocatalizatorilor este acela că sunt ecologici, fiind degradați complet în mediu. Mai mult, enzimele acționează în condiții blânde, lucru care minimizează problema reacțiilor secundare nedorite, cum ar fi descompunerea, izomerizarea, racemizarea și rearanjarea, care adesea îngreunează metodologia tradițională.

Utilizarea enzimelor ca și biocatalizatori simplifică procesul de separare, se obține un randament mai ridicat și datorită condițiilor de reacție blânde, se reduc costurile energetice și de tratare a apelor [12].

1.2.5. Avantaje și dezavantaje ale biocatalizei comparativ cu cataliza chimică

Similar cu alți catalizatori, biocatalizatorii măresc viteza de reacție, dar nu afectează termodinamica acesteia. Cu toate acestea, ei oferă niște caracteristici unice față de catalizatorii convenționali. Cel mai important avantaj este acela că ei sunt foarte selectivi. Această selectivitate este adesea chirală (*stereoselectivitate*), pozițională (*regioselectivitate*) și specificitate de grupă funcțională (*chemoselectivitate*). O astfel de selectivitate ridicată este foarte dorită în sinteza chimică deoarece poate oferi mai multe beneficii, cum ar fi utilizarea redusă sau lipsa grupărilor protectoare, minimizarea reacțiilor secundare, separarea ușoară și reducerea problemelor legate de protecția mediului. Alte avantaje, cum ar fi eficiența catalitică ridicată și condițiile operaționale blânde sunt de asemenea foarte atractive în aplicațiile comerciale [13].

Condițiile de operare limitate, inhibiția de substrat sau de produs și reacțiile în soluții apoase sunt adesea considerate cele mai serioase dezavantaje ale biocatalizatorilor. Multe enzime disponibile comercial prezintă stabilitate excelentă în condițiile de proces. În plus, există câte o reacție enzimatică echivalentă pentru aproape fiecare tip de reacție organică cunoscută. Multe enzime pot accepta substraturi sintetice și le pot converti în produși de reacție. Majoritatea caracteristicilor biocatalizatorilor pot fi modificate și proiectate rațional pentru a îndeplini condițiile dorite pentru un anumit proces [13].

1.2.6. Cinetica enzimatică

Biochimistii folosesc de obicei câteva abordări pentru studiul mecanismului de acțiune al enzimelor purificate. O cunoaștere a structurii tridimensionale a proteinei oferă informații importante, iar valoarea informației structurale este suplimentată de chimia clasică a proteinelor și de metodele moderne de mutagenză direcționată (modificarea secvenței de aminoacizi a unei proteine prin inginerie genetică). Aceste tehnologii permit enzimologilor să examineze rolul și modul de acțiune al aminoacizilor individuali din structura enzimei. Cu toate acestea, abordarea principală pentru studiul mecanismului unei reacții enzimatică este determinarea vitezei de reacție și a modului de răspuns la modificarea parametrilor experimentali, disciplină denumită **cinetică enzimatică**. Aceasta este cea mai veche și cea mai importantă abordare pentru înțelegerea mecanismelor enzimatică [14].

Un factor important care afectează viteza reacției enzimatică este concentrația substratului, [S]. Cu toate acestea, studiul efectelor acestei concentrații este complicat datorită faptului că [S] se modifică pe parcursul unei reacții pe măsură ce substratul este transformat în produs. O abordare simplificatoare în experimentele cinetice este măsurarea **vitezei inițiale**, v_0 , când [S] este mult mai mare decât concentrația enzimei, [E]. Într-o reacție tipică, enzima poate fi prezentă în cantități nanomolare, pe când [S] poate fi cu cinci sau șase ordine de mărime mai mare. Dacă este monitorizat doar începutul reacției (de obicei primele 60 de secunde sau chiar mai puțin), modificările concentrației de substrat pot fi de doar

câteva procente și $[S]$ poate fi considerată constantă [14]. Astfel v_0 poate fi exprimată ca fiind funcție de $[S]$. Efectul modificării lui $[S]$ asupra v_0 este prezentată în Figura 1.8.

La concentrații relativ scăzute de substrat, v_0 crește aproape liniar odată cu creșterea $[S]$. La concentrații de substrat mai ridicate, creșterea lui v_0 este tot mai mică, până atinge un prag de saturație. Această porțiune constantă este aproape de atingerea **vitezei maxime**, V_{max} [6, 14].

Complexul enzimă-substrat este esențial pentru înțelegerea comportării cinetice. Tendința exprimată în Figura 1.8. l-a făcut pe Victor Henri să propună ipoteza conform căreia este necesară formarea complexului enzimă-substrat, ES. Această teorie a fost preluată mai departe de către Leonor Michaelis și Maud Menten. Ei au postulat că enzima se combină reversibil cu substratul, formând complexul amintit, după care acest complex este scindat cu eliberarea produsului de reacție [14].

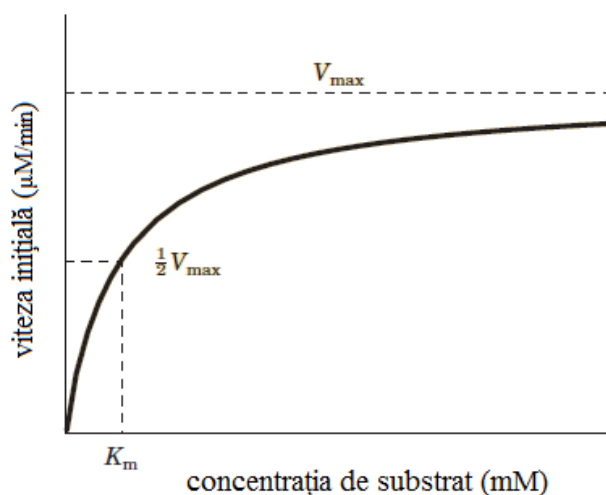


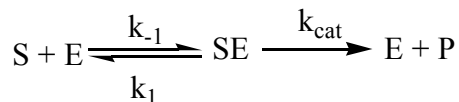
Figura 1.8. Efectul concentrației substratului asupra vitezei inițiale a unei reacții enzimaticе [14].

Michaelis și Menten au enunțat în 1913 ecuația fundamentală a cineticii enzimaticе:

$$v = \frac{V_m \cdot s}{K_m + s} \quad [6]$$

Un parametru important este **constanta Michaelis-Menten**, K_m , care exprimă afinitatea enzimei pentru substrat. K_m are dimensiuni de concentrație și reprezintă acea concentrație de substrat pentru care viteza de reacție este jumătate din cea maximă.

O reacție enzimatică urmează de obicei două etape: legarea substratului (S) de enzimă (E) și formarea complexului enzimă-substrat (ES), urmată de scindarea ireversibilă a acestui complex cu eliberarea enzimei libere (E) și a produsului (P):



În cazul modelului elaborat de Michaelis și Menten, se presupune că etapa legării substratului de enzimă este mai rapidă comparativ cu viteza scindării complexului. De aceea, reacția legării substratului este una de echilibru. Constanta de disociere a complexului ES (K_s) este o măsură a afinității enzimei pentru substrat

și corespunde concentrației de substrat la jumătatea vitezei maxime: $\frac{1}{2} V_{max}$:

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

Astfel, cu cât este mai mică valoarea lui K_s , cu atât afinitatea enzimei pentru substrat este mai mare.

Viteza reacției enzimatică este limitată de către viteza cu care are loc scindarea complexului ES și poate fi exprimată cu relația:

$$v = k_{cat}[ES],$$

unde k_{cat} reprezintă constanta catalitică a procesului [15].

Constanta catalitică reprezintă numărul de moli de substrat care pot fi transformați în produs, în unitatea de timp, de către un mol de enzimă. Acesta este un parametru important pentru aplicațiile practice, care mai este denumit *număr de cicluri catalitice (turnover number)* și se exprimă în moli substrat·moli enzimă⁻¹·timp⁻¹. Exprimă eficiența catalitică a enzimei [6].

Modelul Michaelis-Menten se bazează pe:

1. Etapa de legare a substratului și formarea complexului ES sunt rapide comparativ cu viteza de scindare. Aceasta conduce la aproximarea faptului că reacția de legare a substratului este una de echilibru.
2. Concentrația substratului rămâne aproape constantă în timpul reacției. Această observație se datorează faptului că se folosesc vitezele inițiale și $[S_0] \gg [E_T]$ [15].

Parametrii cinetici k_{cat} și K_m sunt folosiți în general pentru a studia comparativ diferite enzime, indiferent de mecanismele prin care ele acționează. Fiecare enzimă are anumite valori ale lui k_{cat} și K_m care reflectă mediul celular, modul în care catalizează o anumită reacție. Acești parametri permit evaluarea eficienței catalitice a enzimelor. Două enzime care catalizează reacții diferite pot avea aceeași constantă catalitică, dar vitezele reacțiilor necatalizate pot fi diferite și astfel îmbunătățirea vitezei prin prezența enzimei poate fi foarte diferită. Cea mai bună modalitate de a compara eficiența catalitică a două enzime diferite sau constanta catalitică a aceleiași enzime pentru două substraturi diferite este determinarea raportului k_{cat}/K_m pentru reacțiile studiate [13].

Grupul lui de Castro a studiat comportarea cinetică a lipazei din *Burkholderia cepacia* imobilizată prin adsorbție în reacția de sinteză a biodiesel-ului. În urma imobilizării s-a obținut în general o creștere a valorii lui K_m , probabil fie datorită modificărilor structurale ale enzimei, fie schimbărilor în ceea ce privește accesibilitatea substratului în centrul activ [16].

Vila-Real a demonstrat faptul că în cazul naringinazei imobilizată prin entrapare în matrici sol-gel s-a obținut o creștere a lui K_m atunci când un lichid ionic a fost folosit ca aditiv. Acest lucru reflectă modificări în ceea ce privește afinitatea enzimei pentru naringină, lucru obișnuit în cazul reacțiilor unde sunt implicate interacțiuni hidrofobe în formarea complexului enzimă-substrat [17].

1.2.7. Proprietățile enzimelor

Există o tendință globală de a promova biotehnologia albă (industrială). Aceasta necesită dezvoltarea de noi enzime, procese, produse și aplicații. Pentru orice aplicație industrială, enzimele trebuie să funcționeze suficient de bine în concordanță cu o serie de parametri specifici. Figura 1.8 ilustrează conceptul biocatalizatorului ideal. Fiecare enzimă este clasificată, de la slab (notă de la 1) la ridicat (nota 6), folosind un set specific de criterii, pentru a produce a amprentă multi-parametrică. Criteriile pe baza cărora s-a realizat încadrarea includ activitatea enzimatică, eficiență, specificitate și stabilitate [18].

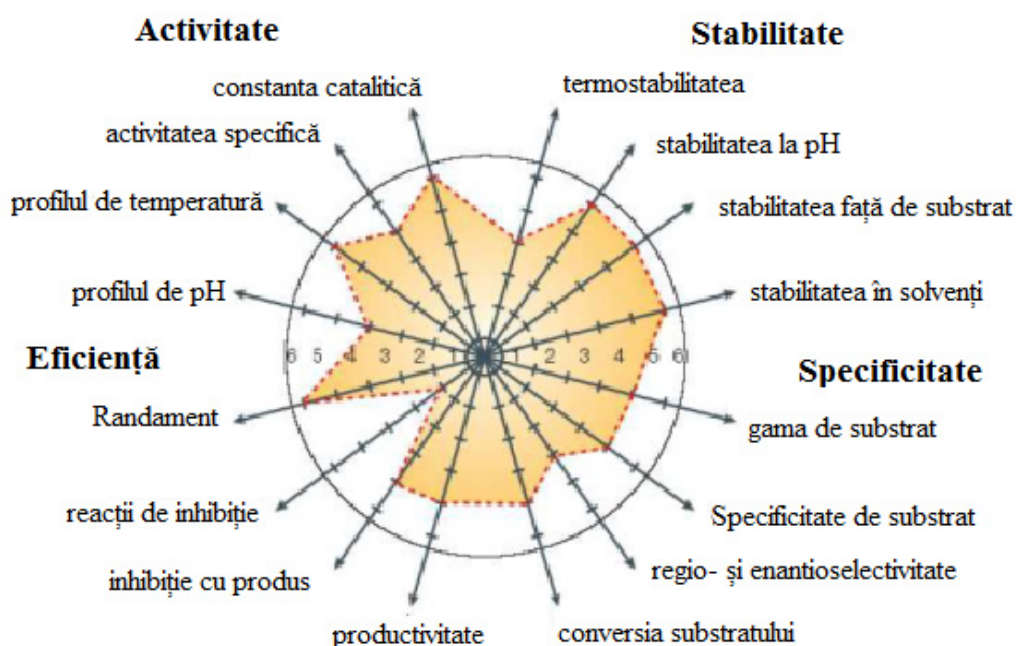


Figura 1.9. Analiza multi-parametrică în vederea alegerii biocatalizatorului ideal pentru un anumit proces [19].

1.2.7.1. Specificitate

Înalta specificitate a enzimelor este o caracteristică distinctă a acestei categorii de catalizatori care permite realizarea unei anumite secvențe metabolice, eficiență și înaltă organizare a reacțiilor biochimice [20].

În general catalizatorii determină creșterea vitezei unor reacții, posibile din punct de vedere termodinamic, prin scăderea energiei de activare, iar în comparație cu aceștia enzimele realizează o accelerare mult mai pronunțată a reacției catalizate. Explicația acestei comportări rezidă în scăderea pronunțată a energiei de activare a reacțiilor respective, datorită stabilizării stării de tranziție. Astfel, energia de activare a reacției de descompunere H_2O_2 este în reacția necatalizată 18 kcal/mol, în prezență de platină fin divizată 11,7 kcal/mol, iar în prezența enzimei catalază 5,5 kcal/mol [7].

Prin **specificitate** se înțelege capacitatea enzimelor de a cataliza un anumit tip de reacție și, în unele cazuri, doar transformarea unui singur substrat. Se disting două tipuri de specificități:

- A. Specificitate de reacție sau de acțiune
- B. Specificitate de substrat

A. Specificitatea de reacție este tipul cel mai evident de specificitate și caracterizează capacitatea enzimei de a cataliza un anumit tip de reacție: un proces redox (oxidoreductazele), o reacție de transfer (transferazele), o reacție de hidroliză (hidrolazele), etc. Pe baza ei enzimele pot fi împărțite în cele șase clase prezentate anterior. O excepție aparentă o prezintă enzimele proteolitice care prezintă în același timp o acțiune peptidazică, amidazică și esterazică – dar acestea catalizează reacții de hidroliză ale peptidelor și polipeptidelor, amidelor și esterilor, după același mecanism de acțiune și cu participarea aceluiași centru activ [6, 20].

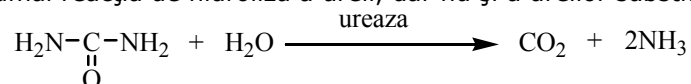
B. Specificitatea de substrat reprezintă capacitatea unei enzime de a cataliza transformarea unei singure substanțe chimice și de a forma un complex enzimă-substrat. Pentru formarea acestui complex este necesar ca enzima să „recunoască”:

- întreaga structură a substratului
- o grupare specifică
- un anumit tip de legătură chimică din structura acestuia care să se „potrivească” steric cu geometria centrului activ [20].

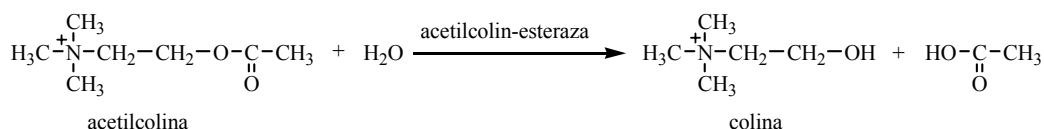
Unul dintre primele studii importante asupra specificității enzimelor a fost întreprins de Emil Fischer, care a arătat că enzimele capabile să hidrolizeze glicozidele pot distinge formele stereoizomere ale acestora. Această observație l-a condus, în 1894, la enunțarea principiului conform căruia molecula substratului se potrivește cu situsul activ al enzimei ca „lacătul cu cheia”, pe baza unei relații de complementaritate.

Deși enzimele sunt foarte specifice, comparativ cu catalizatorii sintetici, ele diferă în ceea ce privește gradul de specificitate [14]. Astfel specificitatea enzimelor poate fi de patru tipuri [6]:

B.1. Specificitate absolută de substrat enzima "recunoaște" structura unei singure substanțe chimice, care este de fapt unicul substrat al ei. Acest tip de specificitate este întâlnit la un număr mic de enzime. De exemplu: ureaza catalizează numai reacția de hidroliză a ureii, dar nu și a ureilor substituie.

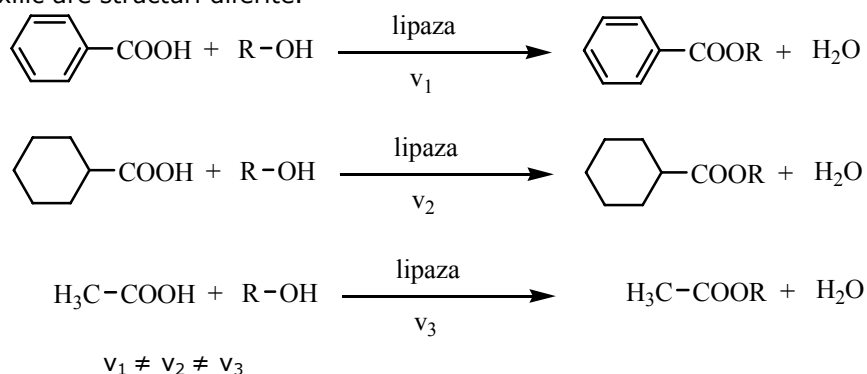


B.2. Specificitate absolută de grup, când enzima acționează asupra unui număr de substanțe înrudite structural care conțin un anumit tip de legătură și un atom sau o grupare de atomi pe care enzima "le recunoaște". Astfel, acetilcolin-esteraza catalizează reacția de hidroliză a acetilcolinei, dar și hidroliza unui număr mare de alți esteri acetici, deci ea recunoaște legătura esterică și gruparea acetil.

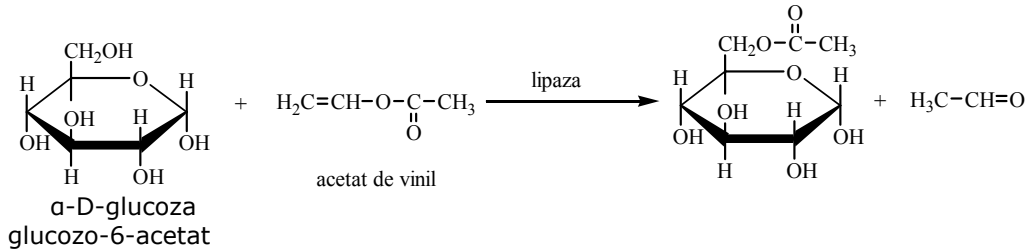


B.3. Specificitate relativă de grup, care se manifestă numai față de un anumit tip de legătură. Astfel, lipazele sunt specifice pentru hidroliza esterilor glicerinei cu acizii grași, însă ele sunt capabile să catalizeze și hidroliza a multor altor esteri alifatici și aromatici, enzima recunoscând practic numai legătura esterică. Acest tip de specificitate se mai numește și **slabă specificitate de substrat** și în cadrul ei, evident va exista o diferență între vitezele cu care sunt transformate diferite substraturi, în funcție de structura acestora. Această proprietate se numește **selectivitate** și ea poate fi de două tipuri:

B.3.1. chemoselectivitate constă în capacitatea enzimelor de a diferenția grupările funcționale ale substratului și transformarea cu viteze diferite a acestor substraturi. De exemplu, reacții de esterificare, catalizate de lipaze, în care acidul carboxilic are structuri diferite.

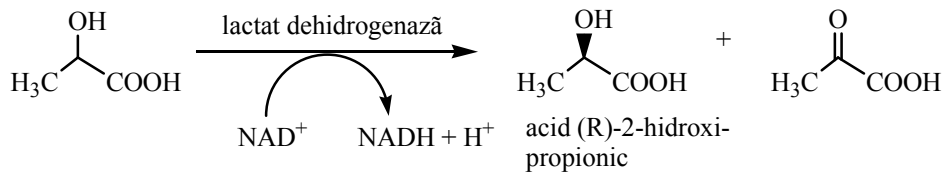


B.3.2. regioselectivitate se referă la preferința enzimei pentru o anumită grupă funcțională dintre mai multe identice existente în structura moleculei. Spre exemplu, acilarea regioselectivă a glucozei în poziția 6 (OH primar) cu acetat de vinil în prezența lipazei.

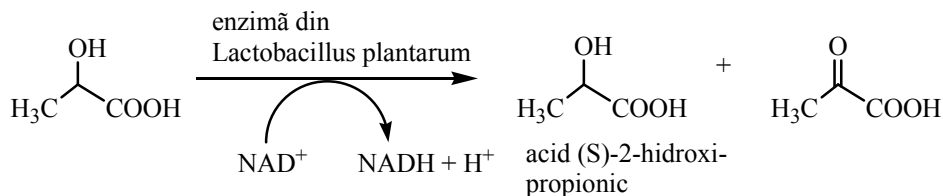


B.4. Specificitate stereochimică sau optică (enantiospecificitate), este cea mai importantă proprietate a enzimelor din punct de vedere al aplicațiilor biocatalitice și se bazează pe faptul că majoritatea reacțiilor care au loc în organismele vii sunt enantiospecifice [6]. Cu alte cuvinte, enzimele au capacitatea de a recunoaște substraturile care conțin centre de asimetrie și de a acționa numai asupra unuia dintre izomerii optici ai acestor compuși. Această proprietate este vitală, ținând cont de faptul că majoritatea metaboliților sunt substanțe optic active, sunt chirali și pot exista în două forme stereoizomere, dintre care numai una predomină în procesele metabolice [20, 21].

Astfel, lactat dehidrogenaza din mușchi și *Bacillus subtilis* catalizează oxidarea doar a acidului (S)-2-hidroxi propionic (acidul L-lactic) la acid piruvic:



În timp ce o altă enzimă izolată din *Lactobacillus plantarum* catalizează transformarea acidului (R)-2-hidroxi propionic (acidul D-lactic):



Trebuie menționat că această enantiospecificitate poate să se manifeste concomitent cu oricare dintre celelalte trei tipuri de specificitate de substrat [6, 20]. Un parametru foarte important în reacțiile enantioselective este puritatea optică a produsului obținut sau a substratului rămas nereacționat. Deoarece de multe ori este posibilă obținerea ambilor izomeri optici, însă unul dintre aceștia se găsește în exces, puritatea optică este exprimată ca **exces enantiomeric** (notat cu **e.e.**). Acest exces enantiomeric se calculează pe baza conversiilor relative în cei doi enantiomeri [6].

De exemplu, excesul enantiomeric pentru enantiomerul R al oricărui compus este definit ca :

$$\% \text{ e.e.}_R = \frac{R - S}{R + S} \times 100 \quad \text{pentru } R > S$$

unde:

R = concentrația enantiomerului (R);
S = concentrația enantiomerului (S).

Astfel, pentru un amestec racemic valoarea e.e. este zero, iar pentru un enantiomer pur este 1 (sau 100% e.e.) [22].

Deoarece de multe ori reacțiile enantioselective catalizate de enzime au loc prin rezoluții optice bazate pe viteza diferită cu care reacționează cei doi enantiomeri, a fost necesară definirea unui parametru care să reflecte în mod mai sintetic enantioselectivitatea unei reacții enzimatică. Acest parametru a fost numit **raport enantiomeric** (sau **coeficient enantiomeric**), se notează cu **E** și este definit ca raportul dintre constantele de specificitate ale celor doi enantiomeri [6, 22]:

$$E_{RS} = \frac{(k_{\text{cat}}/k_M)_R}{(k_{\text{cat}}/k_M)_S}$$

unde:

k_{cat} = constanta de viteză;
 k_M = constanta Michaelis-Menten.

Chen și colab. au definit această ecuație în funcție de excesul enantiomeric al produsului (e.e._p) sau al substratului rămas nereacționat (e.e._s) și a valorii conversiei înregistrate (c). Astfel, pentru o reacție enzimatică reversibilă, valoarea lui E poate fi exprimată prin relațiile:

$$E = \frac{\ln[1 - (1 + K)c(1 + \text{e.e.}_p)]}{\ln[1 - (1 + K)c(1 - \text{e.e.}_p)]}$$

$$E = \frac{\ln[1 - (1 + K)(c + \text{e.e.}_s\{1 - c\})]}{\ln[1 - (1 + K)(c - \text{e.e.}_s\{1 - c\})]}$$

unde:

K = constanta de echilibru.

Pentru o reacție ireversibilă sau dacă reacția reversibilă este neglijabilă (K=0) ecuațiile de mai sus sunt reduse la [22-24]:

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + \text{e.e.}_p)]}{\ln[1 - c(1 - \text{e.e.}_p)]}$$

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - \text{e.e.}_s)]}{\ln[(1 - c)(1 + \text{e.e.}_s)]}$$

Dacă $c = \frac{\text{e.e.}_s}{\text{e.e.}_s + \text{e.e.}_p}$, atunci E poate fi exprimat doar în termeni de e.e._p și e.e._s:

$$E = \frac{\ln \frac{1 - e.e_s}{1 + (e.e_s / e.e_p)}}{\ln \frac{1 + e.e_s}{1 + (e.e_s / e.e_p)}}$$

O reacție neselectivă are o valoare a lui E egală cu 1, în timp ce o valoare E de minim 20 reprezintă o bună enantioselectivitate a enzimei [22, 25].

1.2.7.2. Stabilitate

Pe parcursul evoluției, au fost selectate organisme pentru a trăi în diferite medii de pH (de la 1-11) și temperatură (de la 0-100°C). Prin urmare, enzimele din aceste organisme au evoluat și ele pentru a obține o mai bună activitate biologică la valorile de pH și temperatură a acestor medii.

În procesele enzimatică se dorește folosirea unor biocatalizatori o perioadă cât mai îndelungată în scopul reducerii costurilor. Folosirea optimă a enzimelor necesită cunoașterea factorilor care influențează stabilitatea lor și minimizarea acestora pe cât de mult posibil în condițiile de proces [26].

Stabilitatea unei enzime este de obicei înțeleasă drept stabilitatea termică. Acesta este caracterizată de temperatura la care proteina este în echilibru între starea nativă și cea depliată [27].

Structura nativă a enzimelor este termodinamic stabilă datorită formării spontane a structurilor terțiare și cuaternare, care sunt biologic active. Totuși această stabilitate poate fi redusă când interacțiunile care stabilizează structura nativă (legături hidrofobe, legături de hidrogen, interacțiuni de legare ion-ion cum ar fi $\text{NH}^+ \dots \text{COO}^-$) sunt slăbite prin creșterea temperaturii sau a valorilor de pH care duc la deplierea, pierderea funcțiilor și denaturarea enzimei (Figura 1.9.) Denaturarea este reversibilă atunci când nu au loc modificări ale legăturilor covalente în structura primară a enzimei.

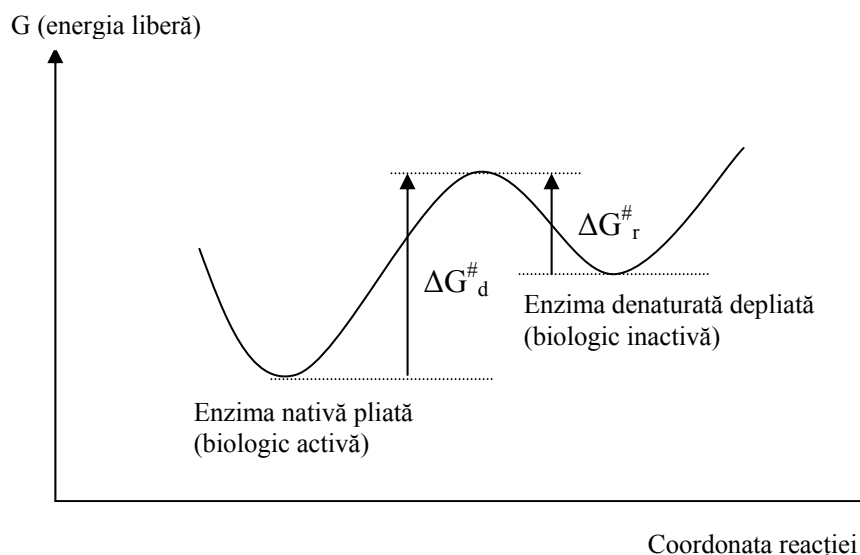


Figura 1.10. Diagrama energiei libere pentru denaturarea reversibilă a unei enzime cu energia pentru denaturare ($\Delta G^{\#}_d$) și reactivare ($\Delta G^{\#}_r$). Structura nativă a enzimei este formată instantaneu la temperatură normală, pe când la temperaturi mai mari sau la valori extreme de pH echilibrul este deplasat spre formarea enzimei depliate (denaturate). Enzima poate fi reactivată prin ușoară modificare a temperaturii sau a pH-ului la valorile normale. O schimbare bruscă a acestor valori "îngheață" starea denaturată a enzimei datorită vitezei mici de repliere. De asemenea reactivarea trebuie făcută la concentrații mici de enzimă pentru a evita formarea de agregate [26].

Stabilitatea unei enzime mai este influențată și atunci când moleculele de substrat și solvent organic sunt legate de aceasta. Substraturile și solvenții organici nemiscibili cu apa stabilizează enzimele, pe când solvenții miscibili cu apa produc efectul invers. De exemplu: în CO_2 supercritic stabilitatea enzimelor este redusă când conținutul de apă din gazul supercritic este crescut [28]. Enzimele pot fi stabilizate când interacțiunile destabilizatoare (de tip ion-ion) sunt micșorate prin prezența unor ioni dublu încărcăți (Ca^{2+} sau HPO_4^{2-}) sau la tării ionice ridicate [26].

Diferiți factori care pot cauza denaturarea enzimelor reversibil sau ireversibil (ce conduc la modificări covalente în structura primară), în timpul proceselor catalizate de enzime sunt prezentate în Tabelul 1.4. Autoproteoliza intramoleculară este un proces recent descoperit, în care hidroliza unei legături peptidice dintr-un lanț de polipeptidă este catalizată de reziduuri de amino-acizi din același lanț polipeptidic, situate lângă această legătură [29].

Timpul de înjumătățire a activității enzimelor, în condiții optime de proces, se întinde de la câteva zile (lipaze, β -glucozidaze) la >100 de zile (penicilinamidaza), deși motivul pentru acest interval mare de stabilitate rămâne neînțeles în totalitate. O posibilitate de a evita denaturarea cauzată de factorii exemplificați în Tabelul 1.4. și de reducere a costurilor enzimei ar fi optarea pentru enzime mai stabile în sistemele vii sau dezvoltarea și realizarea unor enzime mai stabile.

Tabelul 1.3. Factorii care influențează vitezele și randamentele în procesele enzimaticе, modul în care se produce denaturarea enzimei și soluții pentru minimizarea acestora [26].

Factor/ Scop	Denaturarea prin:	Reducerea denaturării prin:
Creșterea temperaturii/ viteze și randamente mai mari	Depliere (reversibil) Modificare chimică (ireversibil)	Folosirea temperaturilor $\geq 20^{\circ}\text{C}$ dar sub temperatura optimă; Folosirea unei enzime cu o temperatură optimă mai mare
Scăderea temperaturii/ randamente mai mari	Disocierea enzimelor oligomere (reversibil)	Reticularea enzimei oligomere
Diminuarea forțelor/ creșterea transferului de masă	Depliere (reversibil)	Reticularea sau imobilizarea enzimei
Creșterea sau scăderea pH-lui/ viteze și randamente mai mari	Depliere (reversibil) când pH-ul este mult mai mare	Reticularea, imobilizarea enzimei sau utilizarea enzimelor cu o mai bună stabilitate la pH
O_2 / creșterea vitezei reacțiilor catalizate de oxidaze H_2O_2 / agent de înlăbire în praf de curățat	Oxidarea grupării $-\text{SH}$ sau a metioninei (ireversibil)	Găsirea sau realizarea unor enzime mai stabile
Conținut mare de substrat/ creșterea randamentelor reduce costurile de purificare a produșilor	Modificare chimică (ireversibil) Glucoza poate reacționa cu grupările amino ale lizinei	Găsirea sau realizarea unor enzime mai stabile
Solvenți organici	Depliere (reversibil)	Imobilizarea sau reticularea enzimei
Peptidaze în preparatul enzimatic	Hidroliza legăturii peptidice (ireversibil)	Folosirea unei enzime mai pure sau imobilizarea enzimei
Autoproteoliza intramoleculară	Hidroliza legăturii peptidice (ireversibil)	Găsirea sau construcția unei enzime mai stabile
Ioni de metal ca și impurități în apă, compuși tampon	Inhibiția ireversibilă a grupării $-\text{SH}$	Folosirea de apă și soluție tampon cu un conținut scăzut de ioni de metal

1.2.8. Aplicații industriale ale enzimelor

Enzimele sunt folosite într-un domeniu variat în industrie. Ele sunt necesare doar în cantități mici pentru a sintetiza kilograme de materii chirale, folosite pentru producerea produselor farmaceutice cu activitate biologică ridicată. Versatilitatea acestora permite utilizarea lor în multe aplicații, inclusiv procese pentru degradarea polimerilor naturali cum ar fi amidonul, celuloza sau proteinele, sau pentru sinteza regioselectivă sau enantioselectivă a compușilor asimetrici. Cele mai noi dezvoltări în cadrul biotehnologiilor, ingineria proteinelor și evoluția direcționată, au revoluționat dezvoltarea enzimelor industriale [18, 19].

Tabelul 1.4. Enzime utilizate în diferite segmente industriale și aplicațiile lor [19]

Industria	Clasa de enzime	Aplicații
Detergenți (pentru rufe și vase)	Proteaze	Îndepărtarea petelor de proteine
	Amilaze	Îndepărtarea petelor de amidon
	Lipaze	Îndepărtarea petelor de lipide
	Celulaze	Curățare, clarifierea culorii, anti-redepunere (bumbac)
Amidon și combustibil	Manaze	Îndepărtarea petelor care reapar
	Amilaze	Lichefierea și zaharificarea amidonului
	Amiloglucozidaze	Zaharificare
	Pulalanaze	Zaharificare
	Glucozizomeraze	Conversia glucozei la fructoză
	Ciclodextrin-glicoziltransferaze	Producerea ciclodextrinei
Alimentație	Xilanaze	Reducerea vâscozității (biocombustibil și amidon)
	Proteaze	Proteaze
	Proteaze	Coagularea laptelui, lapte pentru copii, arome
	Lipaze	Aromatizarea brânzeturilor
	Lactaze	Îndepărtarea lactozei
	Pectin metil esteraze	Produse pe bază de fructe
	Pectinaze	Produse pe bază de fructe
	Transglutaminaze	Modificarea proprietăților vâsco-elastice
	Amilaze	Frăgezime și volum pentru pâine, ajustarea făinii
	Xilanaze	Condiționarea aluatului
Panificație	Lipaze	Stabilizarea și condiționarea aluatului (emulsificator <i>in-situ</i>)
	Fosfolipaze	Stabilizarea și condiționarea aluatului (emulsificator <i>in-situ</i>)
	Glucozoxidaze	Întărirea aluatului
	Lipoxigenaze	Întărirea aluatului, înălbirea pâinii
	Proteaze	Biscuiți, prăjiturele
Hrană pentru animale	Transglutaminaze	Întărirea aluatului
	Fitaze	Asimilarea fitaților - eliberarea fosforului
	Xilanaze	Asimilare
	β -glucanaze	Asimilare
Băuturi	Pectinaze	Depectinizare, mărunțire

	Amilaze β -glucanaze Acetolactat-decarboxilaze Lacaze	Tratarea sucului, bere hipocalorică Mărunțire Maturare (bere)
Textile	Celulaze Amilaze Pectat-liaze Catalaze Lacaze Peroxidaze	Limpezire (suc), aromă (bere) Finisarea denimului, înmuierea bumbacului Descleiere Curățare Oprirea înălbirii Înălbire Îndepărtarea vopselii în exces
Celuloză și hârtie	Lipaze Proteaze Amilaze Xilanaze Celulaze	Controlul gudronului și al contaminanților Îndepărtarea biofilmelor Îmbunătățirea curgerii Stimularea înălbirii Modificarea fibrelor
Grăsimi și uleiuri	Lipaze Fosfolipaze	Transesterificare Degumare
Sinteza organică	Lipaze Acilaze Nitrilaze	Rezoluția alcoolilor și amidelor chirale Sinteza penicilinei semisintetice Sinteza acizilor carboxilici enantiopuri
Pielărie	Proteaze Lipaze	
Îngrijire personală	Amiloglucozidaze Glocozoxidaze Peroxidaze	Acțiune antimicrobiană Înălbire, acțiune antimicrobiană Acțiune antimicrobiană

1.3. Lipaze. Noțiuni generale

Existența lipazelor a fost observată încă din 1901 în *Bacillus prodigiosus*, *B. pyocyaneus* și *B. fluorescens*, care reprezintă acum cele mai bine studiate bacterii producătoare de lipaze cu denumirile actuale de *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Pseudomonas fluorescens*. Enzimele care hidrolizează trigliceridele au fost studiate intens peste 300 de ani și abilitatea lipazelor de a cataliza hidroliza și sinteza esterilor a fost recunoscută cu aproximativ 70 de ani în urmă [30].

În 1856 Claude Bernard a descoperit pentru prima oară o lipază în suc pancreatic, ca fiind o enzimă care hidrolizează picăturile de ulei insolubile și le transformă în produși solubili. Lipazele au fost obținute în mod tradițional din pancreasul animalelor și sunt folosite ca ajutor digestiv pentru consum uman fie în amestec brut cu alte hidrolaze (pancreatină), fie ca produs purificat. Interesul inițial pentru lipazele microbiene a fost generat datorită unui deficit de pancreas și dificultății de colectare a materialului disponibil [30].

Enzimele au devenit foarte importante într-o gamă largă de sectoare industriale pentru a realiza reacții biocatalitice. Cel mai adesea se folosesc enzime de origine microbiană, obținute prin procese de fermentație. Noi tehnici, cum ar fi mutagenza direcționată și modificarea genetică, permit obținerea unor enzime foarte specifice procesului studiat, deschizând posibilitatea de realizare a unor noi aplicații. [2].

Enzimele au pătruns puternic și în industria chimică pentru a cataliza numeroase reacții. În acest caz specificitatea reacției enzimatică este foarte importantă și în comparație cu catalizatorii chimici convenționali aceasta este adesea foarte ridicată. Pe lângă un grad ridicat al specificității reacției, chiralitatea a contribuit puternic la aplicarea biocatalizatorilor în industria chimică. Utilizarea enzimelor (native sau imobilizate) pentru reacții organice foarte specifice se dezvoltă rapid. Majoritatea au loc într-o singură etapă, cu eficiență, specificitate și viteză de reacție mare. Acest domeniu științific este denumit adesea biocataliză, iar procesele care îl folosesc sunt numite bioconversii sau biotransformări. Aceste bioconversii au loc la temperaturi și presiuni moderate, astfel că nu sunt necesari intermediari periculoși și nici nu se generează deșeuri dăunătoare. Cu toate că în mod obișnuit aceste reacții se desfășoară în solvenți "ecologici" cum ar fi apa, etanolul, CO₂ supercritic, multe enzime sunt active și în solvenții chimici "convenționali": metanol, acetonă, solvenți clorurați, etc. [2].

Enzimele au fost concepute în mod natural pentru a fi active în condiții fiziologice. Cu toate acestea, biocataliza se referă la utilizarea enzimelor drept catalizatori de proces în condiții artificiale (in vitro), astfel că o provocare majoră în biocataliză este aceea de a transforma acești catalizatori fiziologici în catalizatori de proces capabili să acționeze în condițiile obișnuite de reacție ale proceselor industriale. Biocatalizatorii, la fel ca orice catalizatori, acționează prin reducerea barierei energetice a reacțiilor biochimice, fără a fi afectați de reacția pe care o accelerează. Cu toate acestea, enzimele prezintă proprietăți distincte față de catalizatorii chimici clasici, majoritatea fiind o consecință a structurii lor moleculare complexe.

Enzimele sunt catalizatori extrem de doriți atunci când specificitatea reacției este o problemă majoră (cum se întâmplă în cazul produselor farmaceutice sau a altor produse chimice fine), când catalizatorul trebuie să fie activ în condiții blânde (datorită instabilității substratului și/sau a produsului sau pentru a evita reacții secundare nedorite, cum se întâmplă în unele reacții de sinteză organică), atunci când restricțiile de mediu sunt stricte, sau atunci când "eticheta" de produs natural este o problemă (cum este în cazul aplicațiilor alimentare și cosmetice). Cu toate acestea, enzimele sunt structuri moleculare complexe, labile și costisitoare, ceea ce reprezintă cu siguranță un dezavantaj în fața catalizatorilor chimici.

În timp ce avantajele biocatalizei sunt de necontestat, majoritatea restricțiilor actuale pot fi și sunt rezolvate prin cercetare și dezvoltare în diferite domenii. În fapt, stabilizarea enzimelor în condițiile de proces este o problemă majoră în biocataliză și au fost dezvoltate mai multe strategii, inclusiv modificarea chimică [31, 32], imobilizarea în matrici solide [33-36], cristalizarea [37, 38], agregarea [39-42] și tehnicile moderne [43].

Enzimele microbiene sunt superioare celor din plante sau animale datorită varietății de activități catalitice disponibile, a randamentelor ridicate pe care le asigură, a ușurinței de manipulare genetică, disponibilității permanente datorită absenței fluctuațiilor sezoniere și creșterea rapidă a microorganismelor. De asemenea, enzimele microbiene sunt mai stabile decât corespondenții lor din plante sau animale și producția lor este mai convenabilă și mai sigură.

Doar aproximativ 2% din microorganisme au fost testate ca potențiale surse pentru enzime. Tulpinile bacteriene sunt în general mai folosite, deoarece posedă activități mai mari comparativ cu drojdiile, multe din ele au pH-ul optim neutru sau alcalin și sunt adesea termostabile [30].

Unele enzime importante industrial au fost izolate din plante. Hidroxinitril liazele (HNL) au fost purificate din diferite specii de plante. Eliberarea HNL din

glicozidele cianogenice se datorează scindării părții carbohidrat de către betaglucozidaze pentru obținerea alfa-hidroxinitrilului corespunzător, care disociază spontan la acid cianhidric și un compus carbonilic, sau prin acțiunea unei alfa-hidroxinitril liaze. HNL prezintă un mare potențial pentru a fi folosite ca biocatalizatori pentru sinteza alfa-hidroxinitrililor optic activi, care sunt compuși intermediari importanți în industria chimică fină și în cea farmaceutică. (R)- și (S)-cianohidrinele sunt acum ușor disponibile ca rezultat al accesibilității excelente, a stabilității relativ ridicate și a manipulării ușoare a hidroxinitril liazelor [30].

Lipazele, sau triacilglicerol acilhidrolazele (E.C. 3.1.1.3) sunt enzime omniprezente, de o importanță fiziologică semnificativă și cu potențial industrial, care pot cataliza hidroliza trigliceridelor cu lanțuri acil relativ lungi (>10 atomi de carbon) cu formare de diacilgliceride, monoacilgliceride, glicerină și acizi grași liberi la interfața dintre faza apoasă și cea organică. Este bine cunoscut faptul că reacția este reversibilă și că lipazele pot cataliza reacții de esterificare și transesterificare la un conținut redus de apă. Sinteza esterilor mediată de lipaze a fost continuu și atent studiată de numeroși cercetători în ultimii ani datorită faptului că o mare varietate de astfel de compuși sunt foarte valoroși. Compuși cum ar fi trigliceridele, fosfolipidele, galactolipidele, cerurile, esterii cu lanț scurt și steroizii au diverse funcții, cum ar fi surse de energie, constituenți celulari, emulgatori. Proprietățile structurale ale esterilor carboxilici sunt direct legate de lungimea lanțului hidrocarbonat. Astfel, esterii cu lanț scurt și mediu ai acizilor carboxilici au un rol important în industria alimentară ca și constituenți de aromă. Pe de altă parte, esterii metilici și etilici cu lanț lung în partea carboxilică furnizează materii grase care pot funcționa ca și combustibili pentru motoarele diesel, iar esterii cu lanț lung atât în partea hidroxilică cât și în cea alcoolică (denumiți ceruri) au aplicabilitate ca lubrifianti și aditivi în produsele cosmetice și farmaceutice [44].

Abilitatea de a cataliza hidroliza esterilor acizilor grași cu catenă lungă în formă de miceli, agregate mici sau particule de emulsie, diferențiază lipazele de alte esteraze care catalizează hidroliza esterilor solubili preferențial față de cei insolubili. Pe lângă substraturile lor naturale, lipazele catalizează hidroliza și sinteza enantio- și regioselectivă a unei mari varietăți de esteri naturali și sintetici. Lipazele pot acționa aleatoriu asupra moleculei de triacilglicerol, sau pot prezenta specificitate de poziție. Lipazele nespecifice care catalizează reacții la toate pozițiile din triacilgliceroli sunt de o valoare limitată. Pe de altă parte, lipazele regiospecifice, de exemplu lipazele 1,3-specifice, oferă cel mai mare potențial în aplicațiile industriale, cum ar fi obținerea lipidelor structurate cu proprietăți funcționale unice. Lipazele regiospecifice au un mare potențial în industria chimică, farmaceutică, medicală, cosmetică și în pielărie. A existat un interes crescut în utilizarea enzimelor, în special a lipazelor, ca și catalizatori chirali pentru reacții hidrolitice sau sintetice. Potențiale noi utilizări includ procesarea organică a compușilor de puritate optică utilizați ca adjuvanți pentru digestie și pentru sinteza de arome și odoranți. De asemenea, enantioselectivitatea lipazelor poate fi exploatată pentru biosinteza unei mari varietăți de compuși chirali. De exemplu, Patel și colaboratorii au folosit lipaze pentru a sintetiza intermediari farmaceutici chirali pentru tratarea cancerului, precum și alți agenți chemoterapeutici. Lipazele s-au dovedit a fi foarte utile și pentru modificarea sau obținerea grăsimilor. De exemplu, conținutul în acid λ -linoleic a uleiului din planta limba mielului (*Borago officinalis*) poate fi îmbogățit folosind o reacție catalizată de lipaze, pe când un echivalent al untului de cacao poate fi sintetizat prin interesterificarea fracțiunii mijlocii a uleiului de palmier catalizată de lipaze. Lipazele folosite în industria alimentară au fost utilizate în sinteza derivaților de aminoacizi. Potențialele aplicații industriale ca cele descrise

anterior au crescut cerințele pentru acest tip de biocatalizator, inclusiv pentru lipazele obținute din microorganisme [44].

Pe lângă selectivitatea ridicată și gama variată de substraturi, un alt avantaj important îl constituie faptul că acestea acționează eficient asupra substraturilor insolubile în apă. Lipazele prezintă această proprietate, deoarece substraturile lor naturale, trigliceridele, sunt insolubile în apă. Lipazele acționează la interfața apă-strat organic și catalizează hidroliza la această interfață. Această legare nu doar plasează lipaza aproape de substrat, dar duce și la creșterea puterii catalitice, fenomen numit **activare la interfață**. Majoritatea lipazelor sunt catalizatori slabi în absența unei interfețe cum ar fi o picătură organică sau un miceliu. Această activare la interfață este probabil cauzată de o modificare conformațională din molecula lipazei [25].

Producătorii de brânzeturi folosesc hidroliza laptelui catalizată de lipaze pentru a îmbunătăți aromele, pentru a accelera maturarea brânzeturilor și pentru a fabrica produse derivate din acestea. Producătorii de brânzeturi tradiționale adaugă extracte din glanda pregastrică de la viței pentru a conferi arome caracteristice. De exemplu, extractele din glanda pregastrică de la un vițel conferă o aromă untoasă și ușor piperată, pe când un extract de la miel conferă o aromă caracteristică puternică. Și microorganismele responsabile de maturarea brânzeturilor secretă lipaze. De exemplu, lipaza din *Penicillium roquefortii* eliberează acizi grași cu lanț scurt și mediu care conferă aromă atât direct cât și acționând ca precursori pentru δ -lactone și pentru metilcetone. Producătorii moderni de brânză pot substitui extractele din glanda pregastrică și microorganismele cu lipaze comerciale (de exemplu lipazele din *Aspergillus niger* sau *Rhizomucor miehei*). De asemenea, adăugarea lipazelor în laptele de vacă poate da aroma specifică laptelui de capră sau de oaie. Adăugarea lipazelor în brânză urmată de incubarea la temperaturi ridicate duce la obținerea unei arome concentrate de brânză, ce poate fi folosită la aromatizarea sosurilor și a altor produse alimentare [25].

Unii detergenți conțin lipaze microbiene (de exemplu lipaza din *Humicola lanuginosa*) pentru a ajuta la îndepărtarea petelor de grăsime, dar avantajul se acumulează doar după spălări multiple. Un singur ciclu de spălare este mult prea scurt pentru a avea loc hidroliza semnificativă, dar lipaza rămâne atașată de grăsime după uscare, iar următorul ciclu de spălare îndepărtează aceste grăsimi. De asemenea lipazele pot să prevină redepunerea grăsimilor pe materialele textile. Recent, Novozymes au introdus un nou preparat (LipoPrime™) optimizat prin inginerie de proteine, care s-a dovedit a fi stabil în timpul procesului de spălare în prezența proteazelor, la tărie ionică ridicată, în prezența înălbitorilor, a apei clorinate și într-un domeniu variat de duritate a apei. Mai mult, enzima este activă în domeniul de temperatură 10-50°C, ceea ce respectă condițiile de spălare din multe țări [25].

Utilizarea lipazelor pentru biotransformări este o piață mult mai redusă, astfel că se folosesc adesea lipaze care au fost dezvoltate inițial pentru alte întrebuintări. Două excepții sunt lipaza din *Rhizomucor miehei*, pe care Novozymes a dezvoltat-o special pentru modificarea lipidelor și lipaza B din *Candida antarctica*, pe care Novozymes o produce pentru aplicații în sinteza organică [25].

1.3.1. Surse de lipaze

Lipazele (E.C. 3.1.1.3) sunt enzime care fac parte din clasa hidrolazelor, având un rol important în metabolismul grăsimilor. Ele hidrolizează grăsimi și uleiuri cu formare de acizi grași liberi, gliceride parțiale și glicerină [6].

Deoarece lipazele sunt necesare pentru funcționarea organismelor vii, ele sunt omniprezente și pot fi găsite în diverse surse, cum ar fi plante, animale și microorganisme. Ele se găsesc din abundență în bacterii, fungi și drojdii [44]. Dintre acestea, importanță majoră prezintă cele de origine microbiană și lipazele pancreatice [6].

Enzimele lipolitice sunt prezente în regnul vegetal, dar cunoștințele despre lipazele din plante sunt încă limitate comparativ cu cele din mamifere și microorganisme. Multe dintre lipazele de origine vegetală studiate până acum s-au dovedit a fi atașate de membrana celulară și au fost examinate ca atare. Lipazele din porumb, rapiță și semințe de ricin au fost solubilizate și purificate [44].

În cazul mamiferelor pot fi diferențiate trei grupuri de enzime lipolitice: lipazele eliberate în tractul digestiv de către organele specializate, lipazele țesutului și lipazele din lapte. Mai multe țesuturi și organe ale mamiferelor, cum ar fi inima, creierul, mușchii, arterele, rinichii, splina, plămânii, ficatul, țesutul adipos și serul, conțin lipaze [44].

Lipazele extracelulare de origine microbiană sunt de obicei mai stabile termic decât cele animale și vegetale. În particular, este de așteptat ca lipazele din termofile să joace un rol important în procesele industriale, deoarece ele sunt termostabile și rezistente la denaturarea chimică. În plus, majoritatea lipazelor disponibile sunt derivate din surse mezofile și prezintă activitate optimă la 35-40°C. Recent, microorganisme ca *Geobacillus* sp. T1, *Bacillus* sp. RSJ-1, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus* sp. tulpina A30-1, *Bacillus* sp. tulpina 398, *Bacillus* sp., *Pseudomonas cepacia* și *Pseudomonas* sp. au fost raportate ca producătoare de lipaze termostabile [44].

În Tabelul 1.5 sunt prezentate cele mai utilizate lipaze în cadrul biotransformărilor [25].

Tabelul 1.5. Lipaze disponibile comercial [25]:

Abreviere	Origine	Alte denumiri	Sursă și denumire comercială
PPL	Pancreas porcine		Amano, Fuka, Sigma
CRL	<i>Candida rugosa</i>	<i>Candida cylindracea</i>	Amano (lipaza AY), Meito Sangyo (lipaza MY, lipaza OF-360)
HLL	<i>Humicola lanuginosa</i>	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Novozymes (TL IM, SP 524, Lipolase®)
PcamL	<i>Penicillium camembertii</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>	Amano (lipaza G)
RJL	<i>Rhizomucor javanicus</i>	<i>Mucor javanicus</i>	Amano (lipaza M)
RML	<i>Rhizomucor miehei</i>	<i>Mucor miehei</i>	Amano (MAP), Novozymes (RM IM, Lipozyme®), Fluka

ROL	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>R. javanicus</i> , <i>R. delemar</i> , <i>R. niveus</i>	Amano (lipaza F), Amano (lipaza D), Amano (lipaza N), Fluka, Sigma, Seikagaku Kogyo Co. (Japonia)
CAL-A	<i>Candida antarctica</i> A		Novozymes (SP 526)
CAL-B	<i>Candida antarctica</i> B		Novozymes (SP 525 sau Novozym435)
ANL	<i>Aspergillus niger</i>		Sigma Amano (lipaza A, AP), Novozymes (Palatase®)
CLL	<i>Candida lipolytica</i>		Amano (lipaza L)
ProqL	<i>Penicillium roquefortii</i>		Amano (lipaza R)
PCL	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	Amano (P, P-30, PS, LPL-80, LPL- 200S), Fluka, Sigma
PCL-AH	<i>Pseudomonas cepacia</i>		Amano (lipaza AH)
PFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Amano (lipaza AK), Amano (lipaza YS)
PfragiL	<i>Pseudomonas fragi</i>		Lipaza B, Wako Pure Chemical (Osaka)
CVL	<i>Chromobacterium viscosum</i>	<i>Pseudomonas glumae</i>	Sigma, Genzyme, Asahi Chemical Amano (K-10)
	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Alcaligenes</i> sp.		Meito Sangyo (lipaza QL)

Denumirea lipazelor după sursa microbiană poate fi adesea confuză. De aceea, o clasificare mai exactă ține cont de secvența proteică, care este similară cu structura tridimensională a lipazelor [25].

Tabelul 1.6. Clasificare unor lipaze comerciale în funcție de similaritățile din secvența proteică [25]:

Clasificare	Caracteristici	Exemple
Lipaze de origine mamiferă	50 kDa	PPL
Lipaze fungice		
familia <i>Candida rugosa</i>	60-65 kDa	CRL, GCL, CE
familia <i>Rhizomucor</i>	30-35 kDa	CAL-B, RML, ROL, HLL
Lipaze bacteriene		
familia <i>Pseudomonas</i>	30-35 kDa	PCL, PFL, CVL
familia <i>Staphylococcus</i>	40-45 kDa	BTL2

Lipazele diferă în ceea ce privește originea și proprietățile lor, ele pot cataliza atât reacții de hidroliză cât și de sinteză a unei game variate de esteri

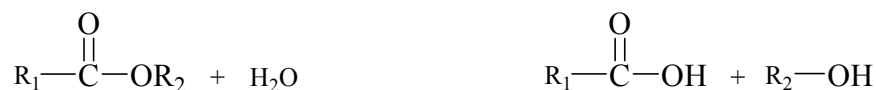
carboxilici. Indiferent de natura lor, ele prezintă activitate specifică ridicată pentru substraturile de tip gliceridic [30].

1.3.2. Reacții catalizate de lipaze

Lipazele (triacilglicerol acilhidrolaze; EC 3.1.1.3) reprezintă una dintre cele mai importante clase de enzime hidrolitice, care pot cataliza atât hidroliza cât și sinteza esterilor. Ele pot avea sau nu avea specificitate de poziție pentru legăturile esterice primare. Hidroliza trigliceridelor catalizată de lipaze poate duce la obținerea di- și monogliceridelor, alături de glicerină și acizi grași liberi. La conținut redus de apă sunt favorizate reacțiile de esterificare și transesterificare. Lipazele pot cataliza de asemenea într-o mare varietate de solvenți organici un număr de reacții utile, cum ar fi esterificări, transesterificări, acilări regioselective ale glicolilor și mentolilor și sinteze de peptide și alte substanțe. În tabelul de mai jos sunt prezentate principalele reacții catalizate de lipaze [44].

Tabelul 1.7. Reacții catalizate de lipaze [44]

Hidroliză



Sinteza esterilor



Transesterificare

Alcooliză



Interesterificare



Acidoliză



Reacția catalizată în mod natural de lipaze este hidroliza trigliceridelor. Aceste procese au loc în sisteme emulsionate. Acizii grași sunt des folosiți în industrie, dar se găsesc doar în cantități mici în medii naturale. Au fost raportate studii privind hidroliza uleiurilor de măsline, de palmier, a grăsimii din lapte și a unor substraturi cu lanț scurt pentru a obține acizi grași. Esterificarea este procesul invers hidrolizei, unde echilibrul între reacția directă și cea inversă este controlat prin conținutul de apă al amestecului de reacție. La un conținut scăzut de apă în sistem lipazele acționează eficient și catalizează reacțiile inverse, inclusiv esterificări între acizii grași și un alcool. În aceste sisteme de reacție se poate adăuga și un solvent organic care să solubilizeze componentele reacției de esterificare. Pentru a deplasa echilibrul de reacție în sensul sintezei esterului, apa trebuie eliminată din sistem. Esterificarea catalizată de lipaze pare a fi o alternativă favorabilă pentru sintezele chimice clasice. Mai mult, sinteza esterilor poate avea loc la temperatură și presiune ambiantă și pH neutru, în reactoare operate fie în șarje fie în sistem continuu. Produsele obținute astfel sunt mult mai pure decât cele obținute prin metode chimice, deoarece catalizatorii chimici clasici au tendința de a fi nespecifici și astfel generează mai mulți produși secundari. Prin urmare, utilizarea lipazelor pentru a cataliza reacții de esterificare elimină necesitatea unor procese complexe de separare și astfel costurile totale ale procesului vor fi reduse. Cu toate acestea, dezavantajele utilizării în particular a lipazelor și în mod general a biocatalizatorilor comparativ cu catalizatorii chimici clasici sunt stabilitatea relativ scăzută a enzimelor în stare nativă și costul lor ridicat [44].

Aplicații ale lipazelor

Lipazele formează un grup important de enzime valoroase pentru biotehnologie, mai ales datorită versatilității proprietăților și ușurinței de a fi produse industrial. Enzimele au o importanță comercială datorită specificității de substrat variate, a posibilității de a acționa în condiții blânde, stabilității în solvenți organici și cantităților mai reduse de deșeuri rezultate în urma folosirii lor. Caracteristica remarcabilă a lipazelor este afinitatea lor pentru interfața apă-ulei. În cazul hidrolizei enzimatice a trigliceridelor, este cunoscut faptul că lipazele, pe lângă regio- și/sau stereoselectivitate, sunt selective în ceea ce privește lungimea lanțurilor și pozițiile dublelor legături pe grupările acil.

Lipazele, în special cele de origine microbiană, au un mare potențial în aplicații comerciale, cum ar fi obținerea de aditivi alimentari (pentru modificarea aromei), substanțe chimice fine (sinteza esterilor), în detergenți (hidroliza grăsimilor), la tratarea apelor reziduale (descompunerea și îndepărtarea substanțelor uleioase), în produse cosmetice (îndepărtarea lipidelor), produse farmaceutice (digestia uleiului și a grăsimilor din alimente), în pielărie (îndepărtarea lipidelor din pieile animalelor) și produse medicale (determinarea trigliceridelor din pâine). Lipazele pot fi folosite pentru a accelera degradarea reziduurilor grase și poliuretanilor [44].

Detergenți

Cea mai importantă aplicație comercială a lipazelor hidrolitice este utilizarea lor în detergenții de rufe, cu aproape 32% din totalul vânzării de lipaze. Termostabilitatea și abilitatea de a rămâne active în mediul alcalin sunt necesare pentru ca lipazele să poată fi folosite în această industrie. Lipazele au aplicații

promițătoare ca aditivi în detergenții industriali și cei de uz casnic datorită proprietății de a hidroliza grăsimile. Pentru detergenți, lipazele sunt selectate pentru a îndeplini următoarele cerințe:

- Specificitate de substrat scăzută, de exemplu capacitatea de a hidroliza grăsimi de compoziții variate
- Abilitatea de a rezista în condiții de spălare relativ dure (pH 10-11, 30-60°C)
- Capacitatea de a rezista surfactanților și enzimelor proteolitice, care sunt ingrediente importante în mulți detergenți [44].

Novo Nordisk a introdus în 1994 prima lipază recombinată comercială „Lipolase”, care provine din fungul *Thermomyces lanuginosus*, exprimată în *Aspergillus oryzae*. În anul următor au fost introduse două lipaze bacteriene- „Lumafast” din *Pseudomonas mendocina* și „Lipomax” din *P. alcaligenes*- de către Genencor International. Gerritse și colaboratorii au raportat o lipază alcalină produsă de *P. alcaligenes* M-1, care era foarte potrivită pentru a îndepărta petele grase [44].

Industria alimentară

Lipazele prezintă caracteristici unice, cum ar fi specificitate de substrat, stereospecificitate, regioselectivitate și posibilitatea de a cataliza reacții heterogene la interfețele formate din apă și sisteme solubile sau insolubile. Esterii obținuți au aplicații în industria alimentară ca și constituenți de gust și aromă. Poziția acidului gras în structura gliceridei, lungimea lanțului acidului gras și gradul său de nesaturare sunt importante pentru proprietățile fizice și senzoriale ale unei trigliceride cu valori nutriționale și senzoriale dorite. În industria lactatelor și a produselor de cofetărie, lipazele sunt folosite pentru a hidroliza grăsimea din lapte cu obținerea de produse lactate, în special brânzeturi cu arome specifice ca rezultat a acizilor grași cu diferite lungimi ale lanțului hidrocarbonat. În plus, lipazele sunt folosite și pentru dezvoltarea de arome specifice în produse de panificație și în băuturi [44].

Formulele pentru sugari reprezintă o bună alternativă a alăptării și tind să imite laptele matern cât mai exact. Grăsimea reprezintă principala sursă de energie în laptele matern și furnizează lipidele necesare construcției membranelor celulare. Grăsimea prezentă în majoritatea formulărilor provine din surse vegetale și de obicei are un acid gras nesaturat în structura trigliceridei. Modificarea trigliceridelor cu ajutorul lipazelor (pentru a crește proporția de acid palmitic) duce la obținerea unei grăsimi cu o capacitate de absorbție îmbunătățită. Betapol™ (Loders Crocklaan) a fost primul produs comercial obținut prin tratarea tripalmitinei cu acizi grași nesaturați prin cataliză cu o lipază 1,3-specifică.

O altă posibilitate de utilizare a lipazelor o constituie obținerea grăsimilor cu conținut caloric redus. În prezent, consumatorii sunt mult mai informați în legătura cu calitatea nutrițională a alimentelor, conținutul energetic și cu efectul pe termen lung al alimentației asupra sănătății. Cu toate că grăsimile au un conținut caloric ridicat, gustul lor bun și finețea texturii le face greu de eliminat din dietă. În prezent sunt disponibile grăsimile cu conținut caloric redus. Akoh și Yee au produs o lipidă slab calorică prin interesterificarea tristearinei (C18:0) fie cu tricaprină (C10:0), fie cu tricaprilină (C8:0) prin biocataliză cu o lipază imobilizată. Grupul lui Kanjilal a realizat interesterificarea uleiului de floarea-soarelui prin cataliză cu lipaze și au încorporat acid behenic. Uleiul rezultat, Bohenin, produs de Fuji Oil, este o trigliceridă comercială cu conținut de acid behenic și oleic și are un valoare calorică

de 5,36 cal/g. Acest produs comercial are un gust similar cu uleiul de floarea soarelui [45].

Industria farmaceutică

Biocataliza oferă o serie de avantaje comparativ cu sinteza chimică, astfel că se justifică cererea crescută de enzime. Abilitatea lipazelor de a cataliza transformarea unui amestec racemic la un singur enantiomer este exploatată intens în industria farmaceutică, deoarece un singur enantiomer al unui medicament posedă activitate terapeutică, pe când celălalt este inactiv sau chiar toxic. O serie de compuși cu acțiune antiinflamatoare (ibuprofen, naproxen), antitumorală (Taxol[®], spergualin) și antihipertensivă (captopril) pot fi sintetizați cu ajutorul lipazelor [45].

O altă aplicație interesantă și foarte importantă constă în obținerea unor substanțe cu activitate biologică îmbunătățită prin modificarea unor compuși naturali care deja posedă proprietăți terapeutice. Un astfel de exemplu îl constituie obținerea unor esteri ai acidului betulinic prin biocataliză cu lipaze. Pentru aceasta a fost utilizată lipaza din *Candida antarctica* B nativă și imobilizată (preparatul comercial Novozym 435) [46, 47, 48].

Industria celulozei și a hârtiei

Lipazele sunt folosite împreună cu celuloze și ligninaze în timpul procesului de fabricare a hârtiei. Tratarea celulozei cu lipaze conduce la o îmbunătățire considerabilă a productivității și la o calitate ridicată, cu necesitate mai redusă de curățare a cilindrilor de uscare. Lipazele sunt folosite pentru a îndepărta smoala (componente hidrofobe ale lemnului) din celuloză în timpul procesului de fabricare a hârtiei. Nippon Paper Industries din Japonia a dezvoltat o metodă care folosește o lipază fungică din *Candida rugosa* pentru a hidroliza până la 90% din trigliceride [44].

Biodiesel

Biodieselul (esteri metilici/etilici ai acizilor grași), rezultă prin transesterificarea grăsimilor și uleiurilor. Principalul avantaj al acestui combustibil îl constituie biodegradabilitatea și faptul că provoacă mult mai puține emisii poluante comparativ cu cei clasici [49].

Transesterificarea folosind lipaze a devenit atractivă pentru producerea biodieselului, deoarece glicerina obținută ca produs secundar poate fi recuperată ușor și purificarea esterilor metilici este simplă. Costul de producție este redus semnificativ prin utilizarea celulelor întregi ca biocatalizatori imobilizați în particule de suport din biomasă, deoarece astfel nu este necesar procesul de purificare [44].

Obținerea biodieselului se poate realiza prin diferite moduri: prin cataliză omogenă acidă sau bazică, prin cataliză solidă sau cu ajutorul catalizatorilor de natură enzimatică. Aceasta din urmă este o variantă intens studiată deoarece sunt eliminate problemele generate de recuperarea și tratarea produșilor secundari [49].

Rafinarea petrolului

Fosfolipaza A₂ (secretată de *Pyrococcus horikoshii*) a fost folosită pentru rafinarea petrolului. Enzima a reacționat optim la 95°C și pH 7,0. Fosfolipaza A₂ este un degumant mai bun pentru rafinările de petrol, deoarece reduce problemele referitoare la tratarea apelor reziduale și costurile de funcționare. Este de așteptat ca lipazele termofile să joace un rol tot mai important în procesele industriale deoarece ele sunt stabile termic și sunt rezistente la denaturarea chimică [44].

Alte aplicații

Esterii cu lanț carboxilic lung și compuși alcoolici (ceruri), produși ai reacțiilor catalizate de lipaze, sunt folosiți ca lubrifianți și aditivi în industria produselor cosmetice. Lipazele sunt înzestrate cu o specificitate de substrat ce depășește orice alte enzime cunoscute. Prin urmare, poate fi prevăzută în viitor o creștere rapidă a utilizării industriale a lipazelor. În prezent, ele au fost folosite la hidroliza lipidelor cu obținerea de acizi grași și glicerol pentru producerea săpunului. Pe parcursul procesării pieilor brute și prelucrate, îndepărtarea grăsimilor reziduale și a reziduurilor din proteine din piele și păr este realizată prin procese enzimatică în locul celor chimice. Pe lângă aceasta, lipazele sunt utilizate în nămolul activ și alte deșeurii din procesele aerobe pentru a îndepărta straturile subțiri de grăsime de la suprafața rezervoarelor aerate, pentru a permite transportul de oxigen. Lipazele sunt folosite de asemenea și pentru sinteza esterilor glicozidici, care sunt greu de obținut prin metode chimice tradiționale. Acești compuși au proprietăți de surfactant și pot fi o alternativă atractivă la diferite produse existente, cu utilizări de la cosmetice până la detergenți de uz casnic, degresarea industrială a metalelor, electronicilor și pielii. Aceste chimicale „verzi” sunt mai sigure pentru utilizator și sunt mai acceptabile pentru mediul înconjurător datorită biodegradării rapide și toxicității scăzute. Lipazele sunt folosite de asemenea și pentru obținerea compușilor farmaceutici, a cosmeticelor, agrochimicalelor și substanțelor pentru diagnostic medical. Lipazele catalizează reacții enantioselective de sinteză a produselor farmaceutice, deoarece chiralitatea determină efectele inhibitorii ale agenților antitumorali și antibacterieni. În plus, sunt folosite pentru a obține (S)-inandofan pur, un nou ierbicid folosit împotriva buruienilor din câmpurile de orez. Alte aplicații includ eliminarea impurităților non-celulozice din bumbacul brut înaintea procesării ulterioare cu vopsele și îndepărtarea grăsimii subcutanate în industria pielăriei.

În viitor, cererea pentru lipaze va fi tot mai mare. Capacitatea lipazelor de a funcționa la un conținut redus de apă va extinde în continuare potențialul lor pentru aplicațiile practice [44].

1.4. Imobilizarea enzimelor

1.4.1. Necesitatea imobilizării

Enzimele sunt biocatalizatori excelenți care acționează în condiții de reacție blânde (temperatură, presiune, pH) și care posedă specificitate mare de substrat și de reacție, caracteristici biotehnologice importante, care au ca rezultat obținerea produsului dorit fără contaminarea cu produși secundari [50]. Din aceste motive, acestea se utilizează în multe procese biotehnologice, printre care: industria alimentară, în medicină și în industria farmaceutică, în aplicații analitice, în industria cosmetică, în industria textilă și în multe alte noi aplicații [51].

Pentru a ușura aplicarea enzimelor în procesele biotehnologice, au fost implementate o serie de metode de reducere a costurilor, tehnicile de imobilizare fiind una dintre acestea. Mai mult, aplicarea enzimelor are și alte limitări, cum ar fi stabilitatea scăzută, sensibilitatea la condițiile de proces sau tendința de inhibare de către concentrațiile crescute ale componentelor reacției. Îmbunătățirea acestor caracteristici este o provocare pentru cercetarea biotehnologică modernă și unele dintre aceste probleme și-au găsit rezolvarea tocmai în procesele de imobilizare specifice [51].

O moleculă sau o celulă este numită imobilizată dacă mobilitatea sa în spațiul de reacție este restricționată în mod artificial. De-a lungul anilor au fost dezvoltate multe protocoale de imobilizare [51]. Imobilizarea enzimelor permite în primul rând reutilizarea sau utilizarea în sistem continuu a biocatalizatorilor și de asemenea simplifică foarte mult manipularea acestora și controlul procesului de reacție. Separarea enzimei din amestecul de reacție este mult mai ușoară și este minimizată contaminarea cu proteină a produsului final. Împreună cu biologia moleculară și cu ingineria proteinelor, imobilizarea reprezintă o metodă alternativă pentru a îmbunătăți caracteristicile naturale ale enzimelor: stabilitatea, activitatea, specificitatea sau selectivitatea. Cu toate acestea, sunt posibile diferite combinații ale abordărilor menționate mai sus, de exemplu imobilizarea enzimelor modificate corespunzător, sau modificarea (fizică sau chimică) a enzimelor imobilizate anterior. De asemenea prin proiectarea precisă a proceselor de imobilizare pot fi evitate inhibarea nedorită a enzimei de către componentele reacției prin agregare, adsorbție, disociere, sau prin autoliză sau proteoliză [51].

Principalul scop al imobilizării enzimelor îl constituie reutilizarea industrială a acestora în cicluri de reacție succesive. În ciuda proprietăților catalitice excelente, enzimele prezintă și o serie de alte caracteristici care nu sunt foarte potrivite pentru utilizarea lor în industria chimică: stabilitate scăzută, inhibare cauzată de concentrații crescute de substrat și produs, activitate și selectivitate scăzute pentru substraturi sintetice în condiții neconvenționale, etc. Posibilitatea de a minimiza aceste calități nefavorabile prin protocoale de imobilizare cât mai simple este un obiectiv important. Există o multitudine de metode de imobilizare, dar foarte puține sunt simple și/sau capabile să îmbunătățească proprietățile enzimelor. Este nevoie în continuare de noi strategii pentru imobilizare pentru a obține o implementare masivă a enzimelor ca și catalizatori ai unor procese chimice complexe [52].

Datorită proprietăților funcționale excelente (activitate, selectivitate și specificitate), enzimele sunt capabile să catalizeze cele mai complexe procese chimice în condiții experimentale benigne. Enzimele sunt capabile să catalizeze în condiții foarte blânde modificări foarte rapide a unei grupe funcționale unice (dintre câteva grupări similare) existentă într-un singur substrat, în prezența unor molecule

similare. Din acest motiv ele pot fi catalizatori industriali excelenți într-un număr mare de domenii din industria chimică, de exemplu sinteză fină, chimie alimentară și analiză [52].

Atât din motive tehnice cât și economice, majoritatea proceselor chimice catalizate de enzime necesită reutilizarea sau utilizarea continuă a biocatalizatorului pe o durată extinsă de timp. Din acest punct de vedere, imobilizarea poate fi definită ca orice procedeu capabil să permită reutilizarea sau folosirea continuă a enzimei. Din această perspectivă industrială, simplitatea și costul sunt caracteristicile cele mai importante ale tehnicilor de imobilizare. Pe de altă parte, o reutilizare industrială pe termen lung a enzimelor imobilizate necesită biocatalizatori foarte stabili, care au proprietăți funcționale potrivite pentru o reacție dată (activitate sau selectivitate) [52].

Au existat trei etape în dezvoltarea biocatalizatorilor imobilizați. Într-o primă etapă, la începutul secolului 19, microorganismele imobilizate erau folosite industrial într-un mod empiric. Este cazul atât producției microbiene de oțet (lăsând să treacă soluții cu conținut de alcool peste scoarța de lemn pe care cresc bacterii) cât și dezvoltarea unor filtre pentru purificarea apelor reziduale [52].

Istoria modernă a imobilizării de enzime datează de la sfârșitul anilor 1940, dar mare parte din munca de la început a fost ignorată de către biochimisti din cauză că a fost publicată în reviste cu alt specific. Baza tehnologiilor actuale a fost dezvoltată în anii 1960, când a fost înregistrată o creștere explozivă a publicațiilor.

În a doua etapă au fost utilizate doar enzime imobilizate, dar în anii 1970 au fost dezvoltate sisteme mai complexe, inclusiv reacții catalizate de două enzime cu regenerarea co-factorului și celule vii. Ca exemplu se poate menționa obținerea L-aminoacizilor din α -cetoacizi prin aminare reductivă stereoselectivă cu L-aminoacid dehidrogenază [52].

Componentele majore ale unei enzime imobilizate sunt enzima, matricea și modul de legare a enzimei de matrice [52].

Tabelul 1.8. Factorii care influențează performanța enzimelor imobilizate

Factori	Implicații ale imobilizării
Partiție hidrofobă	Creșterea vitezei de reacție în cazul substraturilor hidrofobe
Micromediul suportului	Natura hidrofobă stabilizează enzimele
Legarea multipunct a suportului	Îmbunătățirea stabilității termice a enzimelor
Gruparea distanțatoare dintre enzimă și suport (spacer)	Previne inactivarea enzimelor
Constrângeri de difuzie	Activitatea enzimatică scade și stabilitatea crește
Prezența substraturilor sau a inhibitorilor	Retenție crescută a activității
Post-tratamente fizice	Îmbunătățirea performanțelor enzimelor
Moduri de legare diferite	Pot fi afectate activitatea și stabilitatea
Structura fizică a suportului (ex: mărimea porilor)	De multe ori retenția activității a fost dependentă de mărimea porilor
Natura fizică a suportului	Suporturile cu pori mari diminuează limitările de difuzie, ducând la o retenție crescută a activității

1.4.2. Alegerea suportului

Caracteristicile matricii sunt de importanță majoră în determinarea performanțelor sistemului de enzimă imobilizată. Proprietățile ideale ale suportului includ rezistență fizică la compresie, hidrofilicitate, biocompatibilitate, rezistență la atac microbian, disponibilitate și preț scăzut [52].

Suporturile pot fi clasificate ca anorganice și organice, în concordanță cu structura lor chimică. Suporturile organice pot fi clasificate la rândul lor în polimeri naturali și sintetici [52].

Caracteristicile fizice ale matricii (diametrul particulelor, comportamentul la gonflare, tăria mecanică și comportamentul la compresie) sunt de importanță majoră pentru performanțele sistemelor imobilizate și vor determina tipul de reactor folosit în condițiile tehnice. În particular, parametrii porilor și mărimea particulelor determină suprafața totală și astfel pot afecta critic capacitatea de legare a enzimelor [52].

Materiale folosite la obținerea suporturilor pentru imobilizare

Polimeri naturali

Alginatul

Alginatul derivat din pereții celulari ai algelor maro sunt săruri cu calciul, magneziul și sodiul ale acidului alginic și au fost utilizate intens la imobilizare sub formă de mărgelile de xantan-alginat, geluri de alginat-poliacrilamidă și mărgelile de alginat de calciu, având ca efect creșterea activității enzimatică și a reutilizării. Înrețelarea alginatului cu ioni bivalenți (Ca^{2+}) și cu glutaraldehidă îmbunătățește stabilitatea enzimelor [53, 54]. Enzimele pot fi imobilizate prin entrapare sau prin legare la suprafața gelului după activarea acestuia cu carbodiimidă ($\text{HN}=\text{C}=\text{NH}$) sau hidrazină ($\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$). Alginații sunt stabili în domeniul de pH 5-10. Acizii concentrați și temperaturile înalte provoacă însă decarboxilarea lor. De asemenea se pot degrada oxidativ [6].

Chitosanul și chitina

Polimerii naturali, cum ar fi chitina și chitosanul, au fost folosiți ca suporturi de imobilizare [53, 55-57]. Resturile proteice sau carbohidrat ale enzimelor sunt folosite pentru legarea de chitosan [58]. Chitosanul a fost folosit în combinație cu alginatul în cazul în care enzimele acoperite cu chitosan au prezentat mai puține scurgeri comparativ cu alginatul datorită interacțiunilor fizice și ionice dintre enzimă și suport [59]. În mod similar, un compozit umed de chitosan și argilă s-a dovedit a fi mai de încredere pentru entraparea enzimelor, deoarece are grupe hidroxil și amino care se leagă ușor de enzime, împreună cu o hidrofilicitate bună și porozitate ridicată. Chitosanul sub formă de bile poate entrapa cantități duble de enzimă [60].

Colagenul

Fiind un polimer natural, colagenul a fost folosit pentru imobilizarea tanazei utilizând glutaraldehida ca agent de înrețelare [61]. Fibrele Fe^{3+} -colagen s-au dovedit a fi matrici excelente pentru imobilizarea catalazei prin reținerea semnificativă a activității chiar și după 26 cicluri de reutilizare [53]. Este proteina cea mai abundentă la vertebratele superioare. Printre avantajele utilizării sale se numără hidrofilicitatea, care facilitează accesul enzimei la locurile de legare. Legarea enzimelor de suporturile de colagen se poate face prin adsorbție fizică, complexare chimică, entrapare și legare covalentă. Colagenul poate fi reticulat la nevoie, rezultând suporturi cu rezistență mecanică mai mare și porozitate controlată [6].

Caragenanul

Caragenanul, o polizaharidă linară sulfonată, a fost folosit în mod constant pentru imobilizarea unei varietăți de enzime, (cum ar fi lipazele) în scopul îmbunătățirii stabilității [62]. Acest suport este pseudoplastic în natură, ceea ce îl ajută să se subțieze sub acțiunea unor forțe de forfecare și să-și recupereze vâscozitatea odată ce forțele încetează. Jegannathan și colaboratorii au obținut o eficiență a încapsulării de 42,6% prin metoda de co-extrudare folosind același suport pentru producerea biodieselului [63]. Caragenanul s-a raportat a fi un suport ieftin și durabil, cu o mai bună capacitate de entrapare a galactozidazei [64, 65].

Gelatina

Gelatina este un material hidrocoloid, cu conținut ridicat de aminoacizi care poate absorbi până la de 10 ori greutatea sa în apă. Perioada sa de valabilitate indefinită a atras atenția pentru folosirea la imobilizarea enzimelor. A fost folosită în amestec cu poliacrilamida, unde înrețelarea cu acetat cromic (III) s-a dovedit a fi mai eficientă decât cea cu sulfat de crom (III) și cu sulfat de potasiu și crom (III) [66]. Alginatul de calciu formează cu gelatina un bun șablon pentru depunerea fosfatului de calciu pentru imobilizarea enzimelor, iar gelatina în combinație cu filme de poliesteri a dus la o eficiență a încărcării de 75% comparativ cu studii anterioare care au arătat obținerea unei eficiențe de 50% [67, 68].

Celuloza

Cel mai abundent polimer natural a fost intens folosit pentru imobilizarea lacazei fungice, a penicilin G acilazei, glucamilazei, α -amilazei, tirozinazei, lipazei și β -galactozidazei [69-75]. Suporturile celulozice modificate cu dietilaminoetil (DEAE) au o durată de depozitare mai lungă [69]. Nanoparticulele de magnetită acoperite cu celuloză au fost folosite pentru degradarea amidonului, unde legarea α -amilazei de nanoparticule de magnetită acoperite cu dialdehid-celuloză a avut ca efect formarea unui nou sistem de degradare a amidonului [72]. Imobilizarea cu filme de celuloză-lichide ionice activate cu glutaraldehidă au dus la o mai bună formabilitate și flexibilitate [75].

Amidonul

Alcătuit din amilază liniară și unități ramificate de amilopectină, amidonul a fost folosit la imobilizarea enzimelor. Suporturi hibride alginat de calciu-amidon au fost utilizate la imobilizarea la suprafață și la entraparea peroxidazei din dovlecelul amar. Enzima entrapată a fost mai stabilă în prezența agenților denaturanți, cum ar fi urea, datorită resturilor carbohidrat interne, pe când enzima imobilizată la suprafață a prezentat o activitate superioară [76].

Pectina

Această heteropolizaharidă structurală, împreună cu 0,2-0,7% glicerol, acționează ca plastifiant pentru a reduce friabilitatea suportului și a fost utilizată pentru imobilizarea papainei și pentru dezvoltarea unor noi materiale pentru tratarea rănilor pielii. Suporturile de tip pectină-chitină și pectină-alginat de calciu au îmbunătățit stabilitatea termică, rezistența la denaturare și proprietățile catalitice ale enzimelor entrapate datorită formării unor complecși polielectrolitici foarte stabili între enzimă și suportul acoperit cu pectină [77, 78].

Sepharoza

Sepharoza-4B activată cu CNBr a fost folosită la imobilizarea amilazei și glucoamilazei datorită porozității și ușurinței de adsorbție a macromoleculilor. Modificările ulterioare ale matricei, cum ar fi Sepharoza alchilată cu legare multipunct între grupele hidrofobe ale enzimei și resturile alchil ale suportului, joacă un rol important în reținerea proprietăților catalitice la valori extreme ale pH-ului, concentrații ridicate de săruri și temperaturi înalte [79].

Polimeri sintetici

Rășinile/polimerii schimbători de ioni sunt suporturi insolubile, cu suprafață poroasă pentru prinderea enzimei. Amberlite și DEAE celuloza, matrici regenerabile cu suprafață specifică mare, au fost folosite la imobilizarea α -amilazei [80]. În timpul imobilizării peroxidazei din ridiche, glutaraldehida și polietilenglicolul acționează ca aditivi și previn atacul radicalilor liberi [81]. Unii polimeri sintetici folosiți ca suporturi pentru enzime sunt: policlorura de vinil care previne inactivarea termică a ciclodextrin glucoziltransferazei; microparticule de poliuretan derivate de la alcoolul polivinilic și hexametil diizocianat la raport de 1:3, care au ca efect încărcare cu enzimă și eficiență ridicate; nylonul activat cu glutaraldehidă este folosit la imobilizarea lipazelor și polietilen glicolul activat în UV, cu porozitate ridicată, este folosit la tratarea apelor reziduale [82-87].

Materiale anorganice ca suporturi

Zeoliții

Zeoliții, sau sitele moleculare, sunt solide microporoase cristaline cu structuri bine definite și proprietăți selective de formă și sunt intens folosite la adsorbția moleculară. Zeoliții microporoși s-au dovedit a fi suporturi mai bune pentru imobilizarea α -chimotripsinei decât cei microporoși dealuminizați datorită

prezenței mai multor grupe hidroxil care formează legături de hidrogen puternice cu enzima [88].

Ceramica

Imobilizarea lipazei din *Candida antarctica* pe membrane ceramice a arătat că acest suport inert poate fi exploatat pentru efectuarea unor reacții hidrolitice și sintetice prin limitarea feedback-ului de inhibare [89]. Spumele ceramice cu conținut de macro (77 nm) și micropori (45 μm) s-au dovedit a fi eficiente în scăderea vitezei de difuzie și în creșterea suprafeței specifice [90].

Celite

Celita este pământ de diatomee foarte poros, un material cu bioafinitate, și a fost folosită pentru imobilizarea lipazei, polifenol oxidazei și a β-galatozidazei, deoarece este un suport ieftin cu polaritate scăzută și suprafață de adeziune mare [91-93]. Oferă rezistență împotriva valorilor ridicate de pH și temperatură, împotriva ureei, a detergenților și solvenților organici [91]. Celita acționează ca aditiv în matricile sol-gel folosite la imobilizarea ω-transaminazelor. A fost preferată datorită inerției sale chimice și a structurii poroase interconectate [94].

Silicea

Enzimele cum ar fi lignin preoxidaza și peroxidaza din hrean imobilizate pe silice activată au fost folosite eficient pentru îndepărtarea cloroligninei din efluentul rezultat la prelucrarea eucaliptului [95]. α-amilaza imobilizată pe nanoparticule de silice îmbunătățește performanțele de curățare ale detergenților. Acestea au fost folosite datorită nano-structurii lor cu suprafață mare, aranjament ordonat și stabilitate ridicată la forțe chimice și mecanice [96]. Modificarea suprafeței silicee prin aminarea grupelor hidroxil și siloxan reactive și aditia de grupe metil sau polivinil alcool întărește legăturile dintre enzimă și suport [97-99].

Sticla

Sticla a fost utilizată ca suport pentru imobilizarea α-amilazei [100]. O altă enzimă, nitrit reductaza, a fost imobilizată pe mărgelile de sticlă cu pori controlați, care a servit ca biosenzor pentru monitorizare continuă [101]. Ureaza imobilizată pe electrozi de pH din sticlă a format un biosenzor stabil pentru monitorizarea a până la 52 μg/mL uree în probele de sânge [102].

1.4.3. Imobilizarea prin adsorbție

Enzimele pot fi imobilizate folosind diferite tehnici. În continuare vor fi prezentate imobilizarea prin adsorbție și entraparea în matrici sol-gel, tehnici utilizate la obținerea biocatalizatorilor studiați în capitolul *Contribuții originale*.

Adsorbția se realizează mai ales prin interacțiuni hidrofobe, unde fie suportul este înmuiat în enzimă pentru adsorbție fizică, fie enzima este uscată pe suprafețele unor electrozi. Enzimele adsorbite sunt protejate de agregare, proteoliză și interacțiuni cu interfețe hidrofobe [103]. S-au folosit suporturi ecologice, cum ar fi: fibre de nucă de cocos cu o bună capacitate de reținere a apei și proprietăți de

schimbător de cationi; celuloză microcristalină cu capacități de legare ireversibilă; caolin cu retenție ridicată a enzimei prin acetilare chimică; materiale micro/mezoporoase cu grupări tiol funcționalizate, arie a suprafeței mare ideală pentru reacții de oxidare și reducere [74, 104-108]. Sitele moleculare silanizate au fost folosite de asemenea cu succes ca suporturi pentru adsorbția enzimelor datorită silanolilor pe pereții porilor care facilitează imobilizarea enzimelor prin legături de hidrogen [109]. S-a constatat că diferite modificări chimice ale suporturilor folosite în mod curent ar putea ajuta la o imobilizare mai bună. Au fost determinate profilele de activitate a apei pentru lipazele adsorbite pe granule hidrofobe pe bază de polipropilenă/ accurel EP-100 [110]. Este important că dimensiuni mai mici ale particulelor de Accurel au dus la creșterea vitezei de reacție și a raportului enantiomeric în reacțiile biocatalitice [111].

Pentru un control al procesului mai bun și pentru o creștere a eficienței, lipaza din *Yarrowia lipolytica* a fost imobilizată pe suport de tip octil-agaroză prin adsorbție fizică, având ca efect randamente mai mari și stabilitate mai bună comparativ cu lipaza nativă. Aceasta se datorează hidrofobicității suportului care crește afinitatea dintre enzimă și acesta [112]. Lipaza din *Candida rugosa* adsorbită pe poli (3-hidroxibutirat-co-hidroxivalerat) biodegradabil a prezentat activitate reziduală de 94% după 4 ore la 50°C și a fost reutilizată de 12 ori [113]. Au fost preferate aceste suporturi pentru că sunt mai puțin dure și cristaline decât polihidroxibutiratul. 1,4-butandiol diglicidil eterul activat a constituit un suport potrivit pentru urează, ducând la creșterea stabilității la pH și la retenția activității catalitice (50%) în condiții uscate [114].

1.4.4. Imobilizarea prin entrapare

Entraparea reprezintă închiderea enzimei prin legături covalente sau necovalente în interiorul unor geluri sau fibre. S-a obținut încapsulare eficientă folosind suporturi hibride alginat-gelatină-calcium care au prevenit pierderea enzimei și au asigurat stabilitate mecanică ridicată [67]. Entrapările în suporturi nanostructurate au revoluționat domeniul imobilizării enzimelor cu aplicațiile lor variate în domeniul chimiei fine, a biomedicinii, biosenzorilor și biocombustibililor [115-118]. S-a raportat prevenirea friabilității, precum și îmbunătățirea eficienței imobilizării și activității enzimatică a lipazei din *Candida rugosa* imobilizată în chitosan. Acest suport s-a dovedit a fi netoxic, biocompatibil și poate fi supus modificării chimice cu afinitate ridicată față de proteină datorită naturii sale hidrofile [59]. Entraparea în silice mezoporoasă este apreciată datorită suprafeței specifice mari, a distribuției uniforme a porilor, modificării ușoare a dimensiunii porilor și capacității de adsorbție ridicate [119]. Entraparea simultană a lipazei și a unor nanoparticule de magnetită cu silice biomimetică a avut ca efect creșterea activității în diferiți aditivi silanici [120]. Matricile sol-gel cu polimeri calixarene supramoleculare au fost utilizate la entraparea lipazei din *Candida rugosa* ținând cont de capacitatea lor de legare selectivă [121]. Lipazele entrapate în caragenan s-au dovedit a fi termostabile și cu rezistență ridicată în solvenți organici [53, 62, 63].

Imobilizarea enzimelor prin procesul sol-gel implică respectarea mai multor parametri simultan. În primul rând, metoda trebuie să poată fi utilizată în soluții apoase, deoarece astfel este menținută funcția biologică a biocatalizatorilor. În al doilea rând, reacția de polimerizare trebuie să fie compatibilă cu domeniile de pH și tărie ionică necesare funcției proteinei ($4 < \text{pH} < 10$, tărie ionică cuprinsă între 0,01 și 1,00M). În al treilea rând, acest proces trebuie să aibă loc la temperaturi cât mai apropiate de temperatura camerei astfel încât proteinele să se găsească în

conformație activă. În al patrulea rând, materialul trebuie să aibă o dimensiune a porilor suficient de mică pentru a preveni pierderea biomoleculei, dar suficient de mare pentru a permite accesul cu ușurință al analiților mici în matrice. În al cincilea rând, proprietățile materialului ar trebui să poată fi modificate pentru a permite ajustarea mediului intern astfel încât să fie maximizată activitatea biomoleculilor entrapate. În al șaselea rând, trebuie să fie posibilă obținerea unui material final care să fie transparent din punct de vedere optic sau să prezinte conductivitate electrică pentru a permite măsurători spectroscopice sau electrochimice. În final, procesul trebuie să fie simplu și reproductibil, aplicabil pentru o varietate de formate, inclusiv sticle, filme subțiri, coloane, fibre, pudre și matrici [122].

Stabilitatea conformațională a proteinelor entrapate

Proteinele entrapate se găsesc în mod normal în porii cu dimensiuni similare, astfel este important să se stabilească dacă proteinele entrapate își mențin conformația activă în timpul și după imobilizare și dacă sunt capabile să sufere transformări conformaționale odată entrapate [122].

Mișcările conformaționale ale proteinelor entrapate au fost examinate cu ajutorul măsurătorilor de absorbantă, fluorescență [123], rezonanță Raman [124] și de relaxare dipolară [125]. Studiile conformaționale a diferitor proteine entrapate (monelină, parvalbumină, oncomodulină, albumină serică umană și albumină serică bovină) [126-130] au indicat faptul că astfel de proteine tind să rețină o conformație activă imediat după imobilizare, cu toate că unele proteine ca mioglobina, pot suferi modificări substanțiale ale conformației în timpul imobilizării [126]. Această observație este foarte importantă deoarece în timpul entrapării este prezent etanol în concentrație de până la 35% (v/v), compus care poate cauza denaturarea unor proteine [131]. Maturarea matricii sol-gel poate induce modificări structurale semnificative în proteinele entrapate, așa au arătat Bright și colab. pentru albumina serică umană și bovină [123]. Măsurătorile de fluorescență pentru proteinele etichetate cu acrilodan au demonstrat deplierea parțială a fracțiunii biomoleculei entrapate pe măsura maturării. Aceste modificări structurale au fost rezultatul schimbărilor din compoziția solventului intern (datorită pierderii apei) și interacțiunilor dintre proteină și silice, care conduc la transformări nedorite în conformația proteinei [122].

Un alt aspect intens studiat al proteinelor entrapate este stabilitatea conformațională în prezența agenților denaturanți. Studiile de denaturare au indicat faptul că entraparea proteinelor duce adesea la nevoia de temperaturi mai mari sau nivele de denaturanți mai ridicate pentru a realiza deplierea biomoleculilor [127, 128, 132]. De asemenea, entraparea poate stabiliza proteinele împotriva altor forțe denaturante. De exemplu, în cazul catalazei, matricea de silice stabilizează enzima imobilizată împotriva unor concentrații mai ridicate de metanol [133]. Oxidarea peroxidazei din hrean sau a mioglobinei de către peroxid poate fi minimizată prin imobilizarea într-o matrice de silice [134]. Îmbunătățirea stabilității proteinelor entrapate poate fi legată de un proces de „izolare moleculară”, în care proteina este restricționată în posibilitatea sa de a suferi modificări conformaționale, și astfel necesită o energie mai ridicată înainte de depliere [128, 135]. Cu toate acestea, studii recente sugerează că stabilitatea termică ridicată poate fi trecătoare [136], și că maturarea continuă a matricii poate avea ca efect denaturarea lentă a proteinei și pierderea integrității conformaționale. Aceste studii au indicat de asemenea că deplierea proteinelor entrapate este ireversibilă în majoritatea cazurilor, mai ales datorită adsorbției proteinei depliate la interfața solvent-silice [122].

Accesibilitatea proteinelor entrapate

Dezvoltarea unor dispozitive bioanalitice sensibile, rapide și robuste utilizând proteine imobilizate necesită ca analiții externi să poată ajunge în interiorul matricii sol-gel pentru a se lega de biomolecula entrapată. În unele cazuri, o parte din proteină este entrapată în pori care sunt complet accesibili analitului, o parte în pori care sunt parțial accesibili, pe când cantitatea rămasă este „sechestrată” în pori care sunt complet inaccesibili. Această accesibilitate a analitului la proteina entrapată este determinată mai ales de mărimea porilor și de electrostatica materialului, care poate fi modificată prin diferite metode, cum ar fi schimbarea precursorilor, a condițiilor de sinteză, a raportului molar silani:solvent, a condițiilor de maturare etc [122].

Funcționarea proteinelor entrapate

Probabil că cea mai importantă problemă în ceea ce privește proteinele entrapate este dacă și în ce măsură ele rămân funcționale. Funcționarea unei biomolecule entrapate depinde de o serie de factori, inclusiv amplasarea proteinei (în legătură cu accesibilitatea proteinei), structura acesteia (activă vs. depliată) și încărcarea și polaritatea mediului local, care poate afecta proprietățile de legare ale enzimei (constanta catalitică, eficiența catalitică sau constanta Michaelis-Menten). Concentrația enzimei entrapate are de asemenea un efect intens asupra funcționării proteinei, deoarece s-a observat că o creștere a concentrației unor enzime imobilizate poate avea ca efect o scădere pronunțată a activității specifice, așa cum este în cazul colinesterazei, care formează agregate la concentrații ridicate [137]. Mai mult, este important să se țină cont de faptul că însăși matricea de silice poate cataliza unele reacții și trebuie ținut cont de acest lucru la măsurarea activității biocatalizatorilor imobilizați [138].

Funcționarea proteinelor entrapate, a transportului anticorpilor și a proteinelor reglatoare a fost demonstrată folosind o varietate de metode, inclusiv măsurarea activității enzimatică prin tehnici electrochimice și spectrofotometrice, măsurarea modificărilor de absorbantă care însoțesc legarea liganzilor de proteinele hemului (mioglobina, citocromul c) sau utilizarea metodelor de fluorescență. În general, enzimele entrapate în matrici de sol-gel prezintă cinetică de tip Michaelis-Menten la fel ca în cazul enzimei în soluție. Cu toate acestea, valorile constantei Michaelis-Menten sunt mai ridicate și valorile constantei catalitice scad în urma imobilizării, ceea ce indică o legare mai slabă și o cinetică a reacției mai lentă. Aceasta se datorește unor factori cum ar fi vâscozitatea ridicată și faptul că matricile cu alcoxilani derivați sunt încărcate negativ la pH fiziologic, ceea ce poate avea ca efect o cinetică complexă atunci când sunt implicați analiți cu sarcină parțială [139].

1.4.5. Entraparea în sol-gel

Sinteza biomoleculelor imobilizate cu ajutorul tehnicii de tip sol-gel necesită respectarea simultană a mai multor parametri. În primul rând, metoda trebuie să fie aplicabilă soluțiilor apoase, deoarece acestea sunt necesare în general pentru menținerea funcției biologice a biomoleculelor. În al doilea rând, reacția de polimerizare trebuie să fie compatibilă cu domeniile de pH și tărie ionică necesare funcționării proteinelor (pH între 4-10, tărie ionică între 0,01-1,00 M). De asemenea, procesul trebuie să se desfășoare aproximativ la temperatura camerei, pentru a fi posibilă menținerea proteinelor în conformația lor nativă. Pori rezultați trebuie să prezinte dimensiuni suficient de reduse pentru a preveni pierderea biomoleculor din structură, dar suficient de mari pentru a permite accesul în matrice a unor compuși mai mici. Nu în ultimul rând, sinteza materialului trebuie să fie ușoară, reproductibilă și cu aplicabilitate pentru diferite forme (sticle, filme subțiri, coloane, fibre, pudre etc.) [122].

Obținerea biocatalizatorilor entrapați în matrici de tip sol-gel începe cu hidroliza completă a precursorilor, cu formarea unui sol apos. Acești precursori pot fi: tetraalcoxilani, mono-, di- sau trialchilsilani, sau pot conține grupe funcționale cum ar fi alchenil, aril, amino, carboxil, tiol. Reacția hidrolitică poate fi catalizată fie de acizi, fie de baze și poate fi urmată de transesterificare cu aditivi, de exemplu glicerol, pentru a forma poli(gliceril silicați), care sunt mai biocompatibili decât alcoxilani tipici [140].

După hidroliză, solul poate fi utilizat imediat sau poate fi depozitat pentru câteva săptămâni pentru a permite dezvoltarea continuă a particulelor de sol. De-a lungul acestei perioade, apar alte reacții de hidroliză și condensare, rezultând o varietate de polisilicați liniari, ramificați și coloidal. În continuare, precursorul hidrolizat este amestecat cu o soluție tampon apoasă care conține biomolecula împreună cu catalizatorul, aditivi pentru controlul uscării, polimeri, agenți de modelare sau specii redox care pot fi necesare pentru modificarea proprietăților materialului finit. Schimbarea pH-ului, împreună cu prezența unor săruri și a catalizatorilor, favorizează reacția de polimerizare la scară mare care poate avea loc în câteva minute sau chiar ore, având ca efect gelifierea și astfel, entraparea biomoleculei. Gelurile inițiale sunt moi, au un conținut ridicat de apă (50-80%) și pori mari (diametru de până la 200 nm). Următoarea etapă constă în uscarea rețelei umede de silice pentru o perioadă de până la câteva săptămâni, timp în care au loc reacții de condensare care au ca efect întărirea matricii. În timpul acestei etape, alcoolul și apa rezultate în timpul hidrolizei inițiale și a reacțiilor de condensare sunt îndepărtate, ceea ce duce la micșorarea matricii cu 10-30%, diametrul porilor scade cu aproximativ 25% și proporția relativă a grupelor siloxan și silanol crește, ducând astfel la întărirea materialului [141]. În final, materialul maturat este uscat parțial, ceea ce duce la eliminarea majorității apei interstițiale, o întrețelare avansată a matricii, micșorare a porilor (2-20 nm) și la o micșorare globală a materialului de până la 85% din volumul său inițial [122].

Această tehnică de imobilizare presupune utilizarea diferitor tipuri de precursori. În prezent, cei mai folosiți sunt alcoxizii ($\text{Si}(\text{OR})_4$) sau alcoxilani de tipul $\text{XSi}(\text{OR})_3$ sau $\text{XX}'\text{Si}(\text{OR})_2$, unde X și X' sunt grupări organice legate direct de atomul de siliciu printr-o legătură organo-metalică de tipul Si-C. Principalul avantaj al acestor precursori este acela că pot fi alese diferite grupări organice funcționale astfel încât să se obțină o varietate de geluri hibride, specifice pentru fiecare aplicație în parte. În cazul alcoxizilor, R este adesea fie o grupare metil, astfel că precursorul este denumit tetrametoxisilan (TMOS) fie etil, caz în care precursorul se

numește tetraetoxisilan (TEOS). Acest tip de precursori a fost folosit pentru prima oară de grupul lui Glad în anii 1980 pentru a entrapa glucozoxidaza, peroxidaza din hrean, tripsina și fosfataza alcalină [142].

În următorii ani acest domeniu s-a extins foarte mult, apărând o serie de publicații referitoare la imobilizarea prin entrapare în sol-gel a diferitor tipuri de enzime. În anii 1990, grupul condus de Reetz a studiat entraparea lipazelor din diferite surse, cum ar fi: *Candida antarctica*, *Aspergillus niger*, *Rizophus arrhizus* și *Pseudomonas cepacia*, folosind diferiți silani precursori și un catalizator bazic (NaF). De asemenea, acest grup a studiat și posibilitatea utilizării unor substanțe cu rol de aditiv (PVA) [143]. Acești aditivi (poliolii, hidroxiacizii, polietilenglicolul sau surfactanții) au rolul de a îmbunătăți stabilitatea și activitatea preparatelor enzimatiche.

Grupul de cercetare condus de Kato a raportat imobilizarea prin entrapare în sol-gel a lipazei din *Candida antarctica*. Matricea a fost obținută cu viniltriethoxisilan în cataliză bazică (NaF) și în prezența unui aditiv (PVA). Preparatul enzimatic obținut a prezentat valori ridicate ale activității hidrolitice în soluție apoasă și o termostabilitate excelentă. Mai mult, enantioselectivitatea lipazelor a fost îmbunătățită în urma imobilizării [144].

În 2004 grupul lui Soares a realizat imobilizarea prin entrapare în sol-gel a lipazei din *Candida rugosa* folosind ca precursori tetraetoxisilan (TEOS), metiltrimetoxisilan (MeTMOS) și polidimetilsilan (PDMS), cu sau fără aditivi. Structura materialelor rezultate a depins în mare măsură de proprietățile fizice și structurale ale suportului și ale lipazei. Conformația lipazei entrapate în interiorul gelului poate fi îmbunătățită substanțial prin alegerea grupărilor funcționale ale silanului și prin introducerea aditivilor [145].

Grupul lui Hara a raportat imobilizarea prin entrapare în matrici sol-gel a lipazei din *Burkholderia cepacia* folosind silanii precursori metiltrimetoxisilan (MeTMOS) și TMOS. S-a obținut un biocatalizator cu o stabilitate remarcabilă, care a fost reutilizat cu succes în mai multe cicluri de reacție [146].

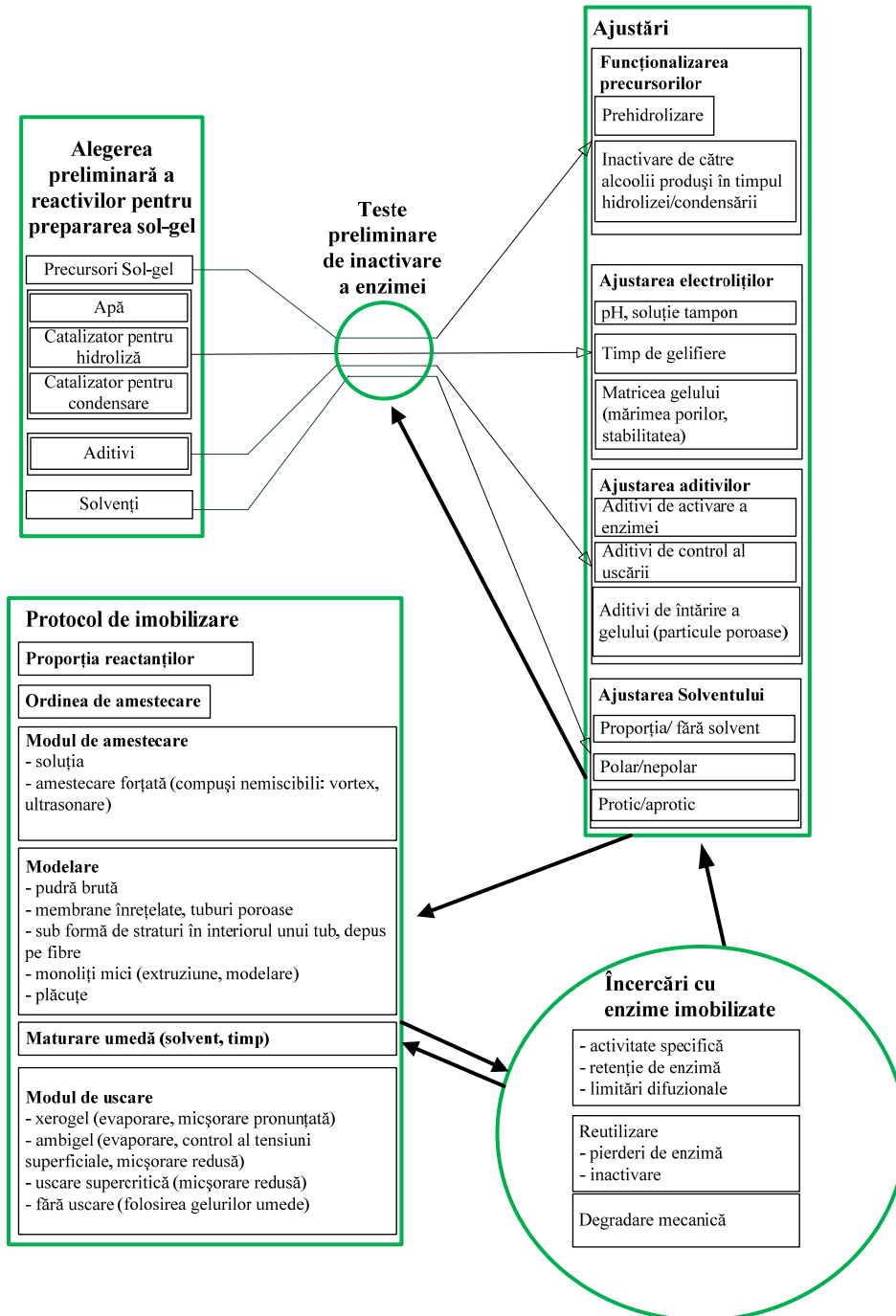


Figura 1.11. Schema generală de aplicare a procesului sol-gel [142]

1.4.6. Lichide ionice – aditivi la imobilizarea prin entrapare în matrici de sol-gel a lipazelor

Matricile de tip sol-gel sunt foarte folosite pentru imobilizarea biomoleculilor datorită porozității, transparenței, stabilității chimice și a preparării ușoare și datorită faptului că enzimele astfel imobilizate prezintă de obicei activitate și stabilitate mai ridicate decât enzimele native [147-149]. Cu toate acestea, o limitare importantă a acestei tehnici este aceea că enzimele sunt inactivate de micșorarea gelului în timpul proceselor de condensare și uscare și de alcoolul eliberat în timpul hidrolizei silanilor precursori [150]. Astfel de impedimente au fost depășite prin folosirea aditivilor. Lichidele ionice pot fi utilizate cu succes ca agenți protectori la entraparea biomoleculilor în matrici de tip sol-gel [148, 151, 152].

Primul exemplu de enzime imobilizate într-o matrice sol-gel pe bază de lichid ionic a fost raportat de grupul lui Liu [148], care a folosit peroxiaza din hrean (HRP) ca biomoleculă model și lichidul ionic [Bmim][BF₄] ca aditiv. S-a demonstrat că HRP imobilizată în matricea sol-gel pe bază de lichid ionic a prezentat activitate îmbunătățită și stabilitate termică excelentă comparativ cu enzima imobilizată prin metoda sol-gel convențională (fără lichid ionic). Mai târziu, Koo și colaboratorii [152] au folosit diferite lichide ionice ca aditivi la imobilizarea prin entrapare în sol-gel a lipazelor și au observat îmbunătățirea activității și stabilității. Motivul pentru această îmbunătățire a proprietăților enzimelor imobilizate este acela că lichidele ionice pot acționa ca substanțe modelatoare în timpul gelifierii și se comportă ca stabilizatori pentru a proteja enzima de inactivare. Această strategie pentru enzimele co-imobilizate cu lichide ionice este foarte utilă pentru reacțiile în solvenți organici [147].

1.4.7. Evaluarea comparativă a metodelor de imobilizare

Cu toate că unele metode de imobilizare au putut fi aplicate în cazul unui număr mare de enzime, nu există o metodă ideală și universal valabilă. Cauzele sunt diferențele mari dintre compozițiile în aminoacizi și alte caracteristici chimice ale enzimelor, cât și cele dintre proprietățile substraturilor și produșilor de reacție. Astfel, fiecare metodă are limitele ei și pentru fiecare caz în parte trebuie găsită metoda potrivită de imobilizare care să fie simplă, ieftină și să ducă la un randament de imobilizare și retenție a activității enzimatică cât mai mari. Este de asemenea important ca stabilitatea operațională a biocatalizatorului să fie cât mai ridicată. În aceste condiții, de multe ori imobilizarea cea mai eficientă se realizează prin combinarea diferitelor metode, de exemplu adsorbția urmată de entrapare în matrici sol-gel [6].

1.5. Reacții biocatalitice în medii neconvenționale

Cataliza enzimatică în mediu neapós extinde semnificativ biocataliza convențională. Apa este un solvent nepotrivit pentru majoritatea aplicațiilor din chimia industrială, deoarece mulți compuși chimici organici de interes comercial sunt puțin solubili și uneori chiar instabili în soluții apoase. Mai mult, îndepărtarea apei este dificilă și costisitoare datorită temperaturii de fierbere ridicate și a căldurii de vaporizare mari. Reacțiile secundare ca hidroliza, racemizarea, polimerizarea și descompunerea însoțesc adesea astfel de procese. Aceste limitări ale utilizării enzimelor în mediu apos au necesitat dezvoltarea unor proceduri enzimatică în

solvenți organici. Biotransformările în acești solvenți oferă următoarele avantaje [153, 154]:

- randament global mai ridicat și recuperarea produsului este facilitată de folosirea solvenților organici cu temperatură de fierbere scăzută
- substraturile nepolare sunt convertite cu o viteză de reacție mai mare, datorită solubilității lor crescute [154]
- contaminarea microbiană este neglijabilă în cazul folosirii celulelor în biotransformări
- inactivarea și/sau inhibarea cu substrat sau produs este minimizată
- reacții secundare cum ar fi hidroliza sunt în mare parte eliminate
- imobilizarea enzimelor nu este absolut necesară; enzima poate fi recuperată printr-o simplă filtrare
- denaturarea enzimelor este minimizată în solvenți organici (cu excepția etanolului)
- echilibrul termodinamic este deplasat în favoarea sintezei.

Cu toate acestea, utilizarea enzimelor în solvenți organici are și unele dezavantaje:

- activitatea catalitică poate fi mai redusă (datorită sistemului eterogen) cu câteva ordine de mărime față de cea în soluție apoasă
- multe reacții enzimatică sunt predispușe la inhibarea cu substrat sau produs, care inactivează enzimele la concentrații ridicate de substrat sau produs, ducând la o scădere a vitezei de reacție și a enantioselectivității [153].

Tabelul 1.9. Avantaje ale utilizării solvenților organici pentru biotransformări [2]

Substraturile nu trebuie să fie foarte solubile în apă

Modificarea solubilității duce la modificarea echilibrului de reacție și a cineticii – de exemplu, enzime hidrolitice disponibile comercial care catalizează reacții sintetice

Se poate modifica specificitatea enzimelor prin schimbarea mediului de reacție

Se poate îmbunătăți stabilitatea enzimelor

Reducerea numărului de reacții secundare

Etapele biocatalitice pot fi integrate mai ușor în cadrul proceselor chimice

Stereoselectivitatea este cea mai importantă proprietate a enzimelor. Cu toate că acestea prezintă selectivitate ridicată atunci când acționează asupra substraturilor lor naturale, ele pot avea o selectivitate insuficientă în diferite reacții sintetice de importanță practică. Pentru optimizarea acestui parametru au fost încercate o serie de strategii, inclusiv modificarea enzimelor, a substratului, compoziția ionică sau tăria ionică, pH-ul, metoda de sinteză. În cele din urmă, dintre toate aceste metode, alegerea mediului de reacție este metoda cea mai ușor de realizat în practică.

Primele raportări în ceea ce privește influența solventului asupra enantioselectivității enzimelor arată faptul că se pot observa modificări importante ale acestui parametru în funcție de natura mediului de reacție. Valoarea raportului enantiomeric (E) a fost de 20 de ori mai mare atunci când transesterificarea fenil-etanolului cu butirat de vinil catalizată de subtilizina Carlsberg s-a desfășurat în dioxan (față de situația în care mediul de reacție a fost acetonitrilul) [155].

Reacțiile în mediu apos trebuie evitate și pentru prevenirea descompunerii unor compuși, cum ar fi cei metalo-organici, sau pentru a simplifica prelucrarea compușilor hidrofilii, care sunt greu de recuperat din apă [25].

Preparatele enzimatiche solide pot fi utilizate într-o gamă largă de solvenți, ceea ce oferă multe posibilități pentru optimizarea alegerii solventului ținându-se cont de activitate, stabilitate și alți factori importanți. În sistemele care folosesc enzime solubilizate în mediu organic alegerea solventului este însă de multe ori limitată. Enzimele modificate covalent cu polietilenglicol prezintă o bună solubilitate în special în hidrocarburi aromatice și în hidrocarburi clorurate, în timp ce pentru majoritatea enzimelor în microemulsii solvenții uzuali sunt hidrocarburi [6].

1.5.1. Reacții catalizate de lipaze în solvenți organici

Lipazele, cele mai folosite enzime în biocataliză, continuă să fie utilizate drept catalizatori enantioselectivi pentru sinteză. Au fost folosite intens în trei tipuri principale de transformări asimetrice, și anume: rezoluția cinetică a acizilor carboxilici sau alcoolilor racemici, diferențierea grupelor enantiotopice ale *mezo* acizilor dicarboxilici sau ale *mezo* diolilor și diferențierea grupelor enantiotopice ale acizilor dicarboxilici și derivaților diolilor prochirali [141, 142].

Lipazele sunt capabile să funcționeze în medii foarte diferite. Pot acționa atât în sisteme bifazice, cât și monofazice (în prezența solvenților hidrofilii sau hidrofobi), unde conținutul de apă poate varia semnificativ între mediul apos și cel anhidru [43].

O înțelegere avansată a acestor enzime permite cercetătorilor să le folosească predictibil în cazul unor structuri mai complexe. Convențional, reacțiile catalizate de lipaze au fost realizate în emulsii, unde reacțiile au loc la interfața picăturilor de ulei. După descoperirea lui Klivanov [143] că lipazele pot cataliza cu succes reacții în condiții aproape anhidre într-un mediu organic, gama de reacții chimice posibile s-a extins mult dincolo de reacțiile de hidroliză [141, 142]. Astfel, lipazele pot fi folosite pentru sintetizarea esterilor pornind de la acizi carboxilici și alcooli. Pentru a deplasa echilibrul spre formarea esterului, apa trebuie îndepărtată folosind sitele moleculare sau vidul. Reacțiile de transesterificare (reacții cu transfer de grupe acil) pot fi efectuate similar într-un mediu lipsit de apă și pot fi clasificate în reacții de alcooliză, acidoliză și interesterificări. Dintre acestea, esterificarea directă și alcooliza cu alcooli racemici a fost folosită frecvent pentru accesul la alcooli enantiopuri prin cataliză cu lipaze. Așa cum s-a raportat, condițiile care favorizează reacțiile rapide și ireversibile sunt necesare pentru realizarea unei enantioselectivități ridicate în cadrul proceselor de rezoluție cinetică. Purity optice a produsului rezultat și a substratului nereacționat este diminuată pe măsură ce reacția inversă avansează, datorită naturii reversibile a esterificării și interesterificării în rezoluțiile cinetice biocatalitice. Au fost folosite mai multe strategii pentru a depăși aceste probleme prin suprimarea reversibilității sau prin asigurarea ireversibilității proceselor, cu toate că viteza de reacție redusă va rămâne un obstacol în astfel de cazuri. Utilizarea esterilor enolici, cum ar fi esterii vinilici sau izopropenilici, este cea mai comună în procesele de transesterificare. Alcoolul vinilic format ca produs secundar suferă tautomerizare cu transformare în compusul carbonilic corespunzător, în acest mod reacția devenind ireversibilă. În acest fel, transesterificările sunt mult mai rapide comparativ cu reacțiile care utilizează acizi carboxilici liberi sau esteri simpli (acetat de etil) [140].

Introducerea unei lipaze în mediu de solvent organic duce la modificarea semnificativă a mediului său înconjurător. Modificarea mediului de reacție are efecte

asupra substratului, enzimei sau asupra complexului enzimă-substrat. Evoluția cercetărilor în domeniul biocatalizei în medii neapoase a dus la observarea unor efecte majore ale solvenților asupra (enantio)selectivității enzimelor [156].

Grupul lui Klibanov a raportat comportarea catalitică a lipazelor în mediu de solvent organic. Au studiat dependența activității enzimatică a trei lipaze de conținutul de apă și de natura solventului. Eficiența catalitică în mediu organic a enzimelor este similară cu cea obținută în mediu apos, iar cinetica poate fi descrisă prin modelul Michaelis-Menten [157].

Biocatalizatorii sunt de obicei activi în solvenți nepolari. Cei mai potriviți solvenți pentru reacțiile catalizate de lipaze sunt n-hexanul, acetatul de vinil, toluenul. Influența solventului asupra selectivității și specificității enzimei este foarte importantă. Unul dintre principalele avantaje ale utilizării solvenților organici este posibilitatea de modificare a acestor proprietăți. Alegerea mediului de reacție s-a dovedit a fi o tehnică foarte eficientă pentru îmbunătățirea enantioselectivității enzimelor. Grupul condus de Wang a studiat efectul solvenților organici asupra acestui parametru în cazul lipazei termofile QLM din specia *Alcaligenes*. Această lipază a fost folosită ca biocatalizator în reacțiile de rezoluție cinetică a 2-octanolului și 2-pentanolului. Dimensiunea moleculelor de solvent s-a dovedit a fi un factor important care este în directă legătură cu modificările raportului enantiomeric E, și astfel alegerea unui solvent cu dimensiune a moleculelor mai mică s-a dovedit a fi benefică [158].

Unele dintre cele mai importante proprietăți ale lipazelor sunt enantioselectivitatea și enantiospecificitatea. Există un număr mare de produse agrochimice și farmaceutice care sunt molecule chirale și doar unul dintre enantiomeri prezintă activitate. De aceea există un mare interes pentru sinteza acestor compuși cu ajutorul lipazelor. Lipazele sunt folosite cu succes ca biocatalizatori în câteva procese comerciale:

- Sinteza ierbicidelor de tip fenoxipropionat prin esterificarea specifică a S-izomerilor cu butanol prin biocataliză cu lipaza din pancreas de porc.
- Producția 2(R),2(S)-metil metoxifenil glicidatului, un intermediar important pentru obținerea medicamentului cardiovascular Diltiazem.
- Sinteza S-ibuprofenului (medicament antiinflamator) prin rezoluția cinetică a esterului racemic [43].

1.5.2. Biotransformări în lichide ionice

Lichidele ionice sunt săruri organice lichide la temperatura camerei. Ele sunt constituite dintr-un cation organic, cel mai adesea săruri de dialchilimidazoliu și tetraalchilamoniu, și un anion poliatomic anorganic (tetrafloroborat, hexaflorofosfat). Principalul avantaj al lichidelor ionice îl constituie presiunea lor de vapori apropiată de zero și buna stabilitate termică și chimică, fiind considerate solvenți ecologici comparativ cu solvenții organici volatili. În plus, toate proprietățile fizico-chimice ale lichidelor ionice, inclusiv hidrofobicitatea, densitatea, vâscozitatea, punctul de topire, polaritatea și miscibilitatea pot fi modificate prin selecția combinațiilor optime de cationi și anioni, iar lichidul ionic optim trebuie să fie proiectat pentru fiecare sistem de reacție enzimatică. Într-adevăr, această proprietate este un factor cheie pentru realizarea cu succes a unor reacții, deoarece selecția adecvată a cationului și a anionului ar putea crește solubilitatea substratului, crește selectivitatea, activitatea și/sau stabilitatea enzimei [159].

Lichidele ionice au proprietăți foarte bune ca mediu de reacție în reacțiile chimice: sunt nevolatile, neinflamabile, au toxicitate scăzută și o bună solubilitate

pentru multe substanțe organice și anorganice. Este bine știut faptul că reacțiile enzimatică au loc în soluții tampon apoase la valori adecvate ale pH-ului și că enzima se inactivează rapid într-o soluție concentrată de sare. Utilizarea lichidelor ionice pentru înlocuirea solvenților organici tradiționali în reacții chimice și în biotransformări este de dată relativ recentă. Reacțiile catalizate de lipaze în mediu de lichid ionic au fost descrise încă din anul 2000 și mai multe tipuri de reacții enzimatică au fost raportate recent [160]. Stabilitatea lichidelor ionice în condițiile de reacție este un aspect foarte important, având în vedere faptul că majoritatea protocoalelor de reacție implică reciclarea lichidului ionic [161].

Atunci când un solvent organic sau un lichid ionic este folosit ca mediu de reacție, controlul conținutului de apă este de o importanță majoră, deoarece o cantitate minimă este necesară pentru menținerea activității enzimatică. Există o serie de aspecte de care trebuie ținut cont atunci când lichidele ionice sunt folosite în biocataliză:

- În unele cazuri impuritățile conținute de lichidul ionic au ca efect modificări majore ale pH-ului, ceea ce poate duce la inactivarea enzimei. Uneori acest lucru poate fi evitat prin folosirea unor concentrații mai mari de soluții tampon, sau prin purificarea lichidului ionic.
- Reacțiile enzimatică au loc adesea în soluție apoasă; adăugarea unor cantități mai mari de lichid ionic poate avea ca efect precipitarea unor componente din amestec.
- Este necesară prezența unei cantități minime de apă pentru a menține activitatea catalitică a enzimei. Cu toate acestea, apa prezentă în sistemul de reacție poate cauza hidroliza unor lichide ionice.
- Unele enzime au nevoie de ioni metalici (cobalt, magneziu, zinc, fier etc.) pentru a avea activitate; dacă aceștia sunt complexați de lichidul ionic poate apărea inactivarea enzimei.
- Ionii sau impuritățile din lichidul ionic se pot comporta ca inhibitori enzimatici reversibili sau ireversibili.
- În cazul investigațiilor cinetice și a măsurătorilor de activitate pot apărea interferențe ale lichidului ionic [162].

Cull și colaboratorii au raportat transformarea benzamidei în benzonitril, mediată de microorganisme într-un amestec format din hexafluorofosfat de 1-butil-3-metilimidazoliu și apă (1:4) [163]. Russel și colaboratorii au raportat că amidarea catalizată de termolizina a CBz-asparaginei cu metil esterul L-fenilalaninei a avut loc într-un amestec de BmimPF₆ și soluție tampon apoasă [164]. Aceste exemple au demonstrat că lichidele ionice nu prezintă acțiune inhibitoare împotriva enzimelor deoarece [Bmim]PF₆ este insolubil în apă și reacțiile enzimatică au avut loc în stratul apos. Primul exemplu de reacție enzimatică în sistem de lichid ionic pur a fost raportat de către grupul lui Sheldon în anul 2000 [165]. Autorii au demonstrat cu succes două tipuri de reacții catalizate de lipaza din *Candida antarctica* B în mediu de lichid ionic: amidarea acidului octanoic cu amoniac și formarea peracidului octanoic în reacția cu acid octanoic și apă oxigenată [165].

Itoh și Kragl au raportat independent prima reacție enantioselectivă catalizată de lipaze în februarie-martie 2001. Deoarece lipaza era prinsă în lichidul ionic și a rămas acolo după extracția produsului, a fost demonstrată posibilitatea de a reutiliza enzima în mediu de [Bmim]PF₆ [166].

Operațiile bifazice lichid-lichid fără prezența unui solvent volatil adițional reprezintă cazul ideal al utilizării multifazice a lichidelor ionice. Din păcate, această situație a fost realizată doar în câteva cazuri speciale. Mulți produși de sinteză

organică sunt polari ei înșiși (alcoolii, aminele, cetonele) și nu formează în mod spontan o a doua fază la suprafața lichidului ionic. În aceste situații, mulți autori au propus utilizarea unui solvent organic volatil pentru a realiza extracția produsului din stratul de lichid ionic. Această abordare însă nu mai este în concordanță cu caracterul ecologic al procesului. În aceste condiții, grupul lui Reetz a sugerat utilizarea dioxidului de carbon supercritic pentru izolarea produșilor de reacție ai transesterificării în mediu de lichid ionic. Este important de menționat faptul că nu poate fi identificat în toate cazurile un solvent de extracție potrivit. În astfel de situații, cristalizarea produsului sau tehnologiile cu membrane constituie posibile variante alternative [161].

Având în vedere faptul că hidrolazele sunt cele mai utilizate enzime în procesele industriale, s-a studiat intens posibilitatea efectuării biotransformărilor catalizate de lipaze în mediu de lichid ionic. Mai mult, primele raportări ale activității enzimelor în lichide ionice se referă la proteaze sau lipaze. S-a constatat faptul că anionii care exercită sarcina negativă pe mai mulți atomi (bis(trifluorometan)sulfonimidă (Tf_2N^-), hexafluorofosfat (PF_6^-), tetrafluoroborat (BF_4^-)) au un efect stabilizator mai bun decât cei care au un singur atom încărcat negativ. Lichidele ionice cu anioni de tipul halogenură sau acetat denaturează de obicei biomoleculele, probabil datorită legăturilor de hidrogen puternice dintre halogen și enzimă, care duc la deplierea și mai apoi agregarea și precipitarea ireversibilă a acestora [167].

În ceea ce privește procesele organice, s-au studiat mai ales rezoluția cinetică a alcoolilor sau aminelor secundare prin acilarea, sulfoxidarea, reducerea compușilor carbonilici și adiția apei prin procedeul Merkovnikov.

Lichidul ionic potrivit pentru cataliza enzimatică ar trebui să conțină anioni cu o bazicitate slabă a legăturilor de hidrogen pentru a evita interferența cu legăturile de hidrogen din structura enzimei. Din acest motiv este de dorit prezența anionilor amintiți mai sus și nu a celor de tip halogenură, nitrat, trifluoroacetat sau acetat, care prezintă a bazicitate puternică a legăturii de hidrogen. Acești anioni compatibili cu biomoleculele au o nucleofilicitate scăzută și în consecință o tendință scăzută de a modifica conformația enzimelor [168].

În condiții anhidre s-a observat că majoritatea lichidelor ionice miscibile cu apa au inactivat enzimele ($[\text{Bmim}]\text{Cl}$, $[\text{Bmim}]\text{NO}_3$), cu câteva excepții: $[\text{Bmim}]\text{BF}_4$. În 2009, grupul lui De Diego a studiat comportarea catalitică a lipazelor în mediu de lichid ionic cu conținut de apă redus. Pentru aceasta, ei au folosit opt lichide ionice miscibile sau imiscibile cu apa, cu cation de tip 1,3-dialchilimidazoliu ca mediu de reacție pentru mai multe lipaze native și imobilizate (lipazele din *Candida antarctica* A CALA, *Candida antarctica* B CALB, *Thermomyces lanuginosus* TLL și *Rhizomucor miehei* RML). Reacția studiată a fost sinteza propil butiratului și s-a urmărit influența mai multor parametri de reacție, cum ar fi: temperatura, conținutul de apă, lungimea lanțului alchil a substraturilor, precum și termostabilitatea enzimelor. A fost demonstrat faptul că activitatea catalitică este dependentă atât de caracteristicile lichidului ionic cât și de natura enzimei. Mai mult, atunci când au fost folosite lipaze imobilizate pe suport solid, la alegerea lichidului ionic a fost necesar să se țină cont și de natura suportului [169].

Un alt avantaj al utilizării lichidelor ionice ca mediu de reacție îl constituie îmbunătățirea enantioselectivității. Lipazele din *Candida antarctica* B și *Burkholderia cepacia*, enzime cu enantioselectivitate ridicată în cazul acetilării alcoolilor secundari cu acetat de vinil în mediu de solvent organic, au înregistrat o îmbunătățire a acestui parametru atunci când mediul de reacție a fost un lichid ionic. Enantioselectivitatea lipazei din *Burkholderia cepacia* în rezoluția cinetică a

1-feniletanolului a fost de până la 10 ori mai mare în lichide ionice de tipul tetrafluoroborat sau hexafluorofosfat de 1-alkil-3-metilimidazoliu. În alte cazuri, enantioselectivitatea este scăzută în solvenți organici, astfel că orice îmbunătățire a acestui parametru în mediu de lichid ionic constituie un avantaj major. Lipaza din *Candida rugosa* are o enantioselectivitate moderată în rezoluția cinetică a acizilor 2-amil propionici, o clasă de medicamente antiinflamatoare nesteroidiene. Enantioselectivitatea pentru hidroliza esterului metilic al ibuprofenului sau a esterului metilic al naproxenului a crescut de la 7,2, respectiv 33 în mediu apă-izooctan, la 24, respectiv >200 atunci când reacțiile au avut loc în mediu de lichid ionic [167].

Lozano și colaboratorii au raportat efectul de stabilizare al lichidelor ionice pentru reacțiile catalizate de lipaze. Autorii au observat că prezența unui substrat potrivit a fost esențială pentru stabilizarea enzimei într-un mediu de lichid ionic. Timpul de înjumătățire al lipazei din *Candida antarctica* nativă a fost de numai 3,4 ore în mediu de [Emim]PF₆, pe când în prezența substratului această perioadă s-a prelungit remarcabil la 7500 ore [170].

Este cunoscut faptul că tratarea cu polietilenglicol cauzează stabilizarea enzimelor. Goto și colaboratorii au obținut lipaze acoperite cu PEG și au demonstrat faptul că transesterificarea cinamatului de vinil cu butanol a avut loc cu rezultate bune folosind lipaza din *Burkholderia cepacia* (PS) tratată cu PEG în mediu de [Omim]PF₆ [171, 172]. Grupul lui Russel a investigat detaliile tratării cu PEG asupra activității lipazei în mai multe tipuri de lichide ionice și au raportat faptul că această activitate a fost dependentă de partea anionică a lichidelor ionice. Valori ridicate ale activității au fost obținute pentru sărurile de imidazoliu cu anion PF₆, pe când în cazul anionilor NO₃, OAc, CH₃SO₃, OTf sau TFA valorile au fost foarte scăzute. Autorii au presupus că datorită naturii puternic nucleofile a acestora, anionii nitrat sau acetat pot interacționa puternic cu unele părți proteice ale enzimei și pot cauza inactivarea acesteia [164].

Grupul lui Sheldon a studiat relația dintre activitate și tipurile de lichide ionice. Lipaza din *Candida antarctica* B, cu toate că a fost solubilă, nu a prezentat activitate catalitică în unele lichide ionice, cum ar fi etilsulfat de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim]EtSO₄), lactat de 1-butil-3-metilimidazoliu ([Bmim]Lactat), nitrat de etilamoniu ([EtNH₃]NO₃) sau azotat de 1-butil-3-metilimidazoliu ([Bmim]NO₃). Pe de altă parte, s-au obținut valori ridicate ale activității în [Bmim]PF₆ sau [Bmim]BF₄, cu toate că enzima a fost insolubilă în aceste lichide ionice. O observație interesantă a fost inactivarea enzimei în [Emim]EtSO₄, cu toate că în mediu de metilsulfat de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim]MeSO₄) enzima a fost activă. Autorii au presupus pe baza rezultatelor analizelor FT-IR ale proteinei că această inactivare ar putea fi cauzată de schimbările conformaționale datorate interacțiunii dintre partea anionică a lichidului ionic și proteinele din lipază [165].

Utilizarea unui amestec de lichid ionic și solvent organic ca mediu de reacție a dus la obținerea unor rezultate bune. Lundell a raportat că s-a obținut o creștere a enantioselectivității atunci când acilarea catalizată de lipaze a avut loc într-un amestec de bis(trifluorometilsulfonil)imidă de 1-etil-3-metilimidazoliu ([Emim]TFSI) și MTBE (1:1), față de cazul în care reacția a avut loc în [Emim]TFSI pur [173].

Enzimele suspendate în lichide ionice rămân stabile și active din punct de vedere catalitic, chiar dacă nu sunt stabile sau active în solvenții organici polari. Astfel, acești solvenți permit realizarea unor reacții care implică transformarea unor substraturi polare prin cataliză cu enzime în mediu neapros. Aceste tipuri de reacții

sunt foarte importante deoarece unii compuși naturali (peptide, zaharuri, nucleotide și intermediari biochimici) sunt materii prime în industria farmaceutică [174].

Pe lângă rezoluția cinetică au mai fost studiate și alte procese biocatalitice în mediu de lichid ionic. Astfel, alcool dehidrogenaza din *Lactobacillus brevis* a fost folosită ca biocatalizator în sistem bifazic (soluție tampon și $[C_4C_{1im}]Tf_2N$) pentru reducerea 2-octanonei. În această situație enzima a prezentat activitate și enantioselectivitate ridicate [168].

1.6. Metode specifice pentru caracterizarea biocatalizatorilor imobilizați

1.6.1. Investigarea structurii cu ajutorul microscopiei electronice de scanare (SEM)

Prin microscopie electronică de scanare (SEM) se pot obține informații utile despre structura microscopică a suprafeței (morfologia) probelor analizate. În același timp, analiza spectrofotometrică a semnalului de fluorescență emis prin acțiunea razelor X permite identificarea calitativă a elementelor prezente în probă, deoarece acest semnal este dependent de numărul atomic al elementului respectiv. Imaginile SEM oferă informații utile despre microstructura, porozitatea și textura materialului respectiv.

Structura suprafeței particulelor preparatelor obținute de Yang și colaboratorii utilizând diferiți silani precursori a fost determinată prin microscopie electronică de scanare SEM. Imaginile au arătat că gelurile preparate cu MeTMOS/TMOS și VTMO/TMOS conțin particule sferice tipice, indicând faptul că suprafața specifică a gelurilor de MeTMOS calculată cu metoda de adsorbție-desorbție de azot a fost în primul rând rezultatul suprafeței exterioare a particulelor sferice. Acestea au avut volume și diametre ale porilor foarte mici ($0,043 \text{ cm}^3/\text{g}$ respectiv $2,78 \text{ nm}$), confirmând cele raportate de Soares [145], ceea ce duce la o creștere a rezistenței la transferul de masă pentru substraturi. S-a ajuns la ipoteza că lanțul alchil influențează formarea matricii gelului. Gelurile obținute cu VTMO/TMOS au fost amorfe și gelul de OctMO/TMOS a devenit un agregat poros (Figura 1.10. A-D). În comparație cu cele fără bioimprimare cu acid lauric, gelurile care au fost bioimprimare au avut pori cu diametre mai mari, iar particulele gelurilor preparate cu OctMO/TMOS au devenit amorfe.

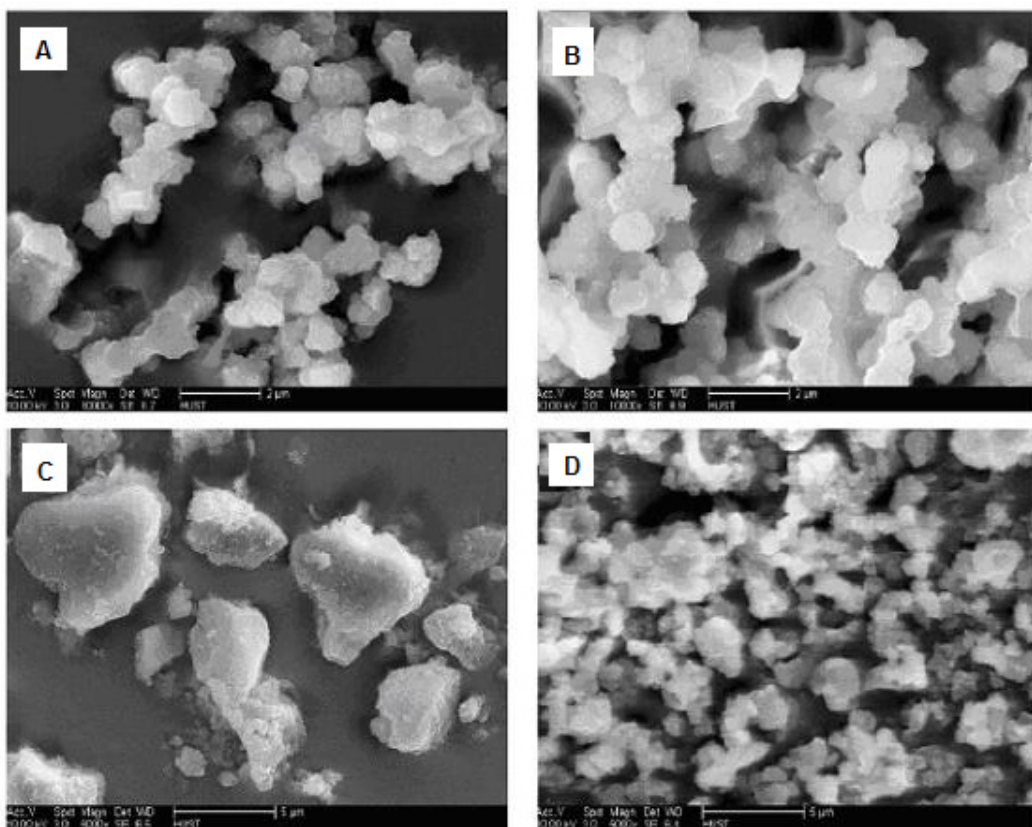


Figura 1.12. Imaginile SEM ale preparatelor enzimice entrapate în sol-gel obținute cu silanii precursori : (A) VTMOs/TMOs neimprimat; (B) VTMOs/TMOs bioimprimat; (C) OctMOs/TMOs neimprimat; (D) OctMOs/TMOs bioimprimat [175].

Precursorii silanici bioimprimați și substituiți cu diferite grupări alchil au avut efecte distincte asupra activității de esterificare a lipazelor imobilizate. Activitatea specifică a preparatului cu OctMOs/TMOs și bioimprimat a crescut de 14,4 ori, iar activitatea totală a crescut de 6,8 ori față de un gel cu MeTMOs/TMOs fără bioimprimare. Creșterea activității lipazei ar putea fi cauzată atât de activarea la interfață de către substratul hidrofobic și de silanul alchil substituit, cât și de modificările din structura și textura matricilor gelurilor. Lipazele încapsulate în geluri OctMOs/TMOs bioimprimare ar putea fi biocatalizatori utili pentru reacții în medii neapoase [175].

1.6.2. Măsurători ale ariei suprafeței specifice - metoda Brunauer-Emmett-Teller (BET)

Pentru a investiga efectele imobilizării enzimelor în sol-gel asupra structurii xerogelurilor obținute, se pot realiza cu ajutorul metodei de adsorbție-desorbție cu azot (metoda BET) măsurători ale suprafeței specifice, a volumul și a diametrului porilor.

Într-un studiu recent realizat de Yang și colaboratorii, s-a arătat că precursorii silanici folosiți la entraparea în sol-gel a lipazei din *Burkholderia cepacia* au avut o influență semnificativă asupra proprietăților matricilor gelurilor. Făcând o comparație între preparatele obținute cu MeTMOS și cele obținute cu OctMOS, s-a observat că diametrul mediu al porilor atât al gelurilor imprimate cât și a celor neimprimate cu acid lauric a crescut treptat, iar la o comparația între VTMOs și OctMOS s-a remarcat că suprafața specifică și volumul porilor au fost și ele considerabil îmbunătățite [175].

Tabelul 1.10. Caracteristicile structurale ale preparatelor enzimatiche imobilizate cu diferiți silani precursori [175]

Tratamentul folosit	Silani precursori	S_{BET} [m^2/g]	V_{pori} [cm^3/g]	D_{pori} [nm]
-	MeTMOS/TMOS	61,46	0,043	2,78
	VTMOS/TMOS	1,16	0,003	11,65
	VTEOS/TMOS	5,52	0,018	13,04
	OctMOS/TMOS	54,52	0,213	15,6
	MeTMOS/TMOS	38,15	0,029	3,04
bioimprimare	VTMOS/TMOS	1,02	0,004	14,42
	VTEOS/TMOS	13,03	0,030	16,17
	OctMOS/TMOS	42,03	0,211	20,10

După bioimprimare nu s-a remarcat nici o schimbare în ceea ce privește volumul porilor. Diametrul porilor gelurilor bioimprimate s-a dovedit a fi considerabil mai mare comparativ cu a celor neimprimate, aceasta fiind corelată și cu o creștere a activității lipazei. Probabil porii mai mari facilitează pătrunderea substratului în interiorul matricii gelului și de aceea are loc creșterea vitezei de reacție. S-a observat că gelul preparat cu OctMOS/TMOS prezintă pori distribuiți egal pe toată suprafața preparatului, cu diametre între 8-20 nm, ceea ce indică faptul că matricea acestui gel a fost cea mai bună dintre cele testate. Deși preparatul obținut cu MeTMOS/TMOS a avut o suprafață specifică mare, activitatea lipazei a fost foarte mică, lucru care aparent contrazice presupunerea generală că o suprafață specifică mai mare mărește probabilitatea ca substratul să intre în contact cu enzima și prin aceasta să crească viteza de reacție. Cu toate acestea, chiar dacă suprafața specifică a particulelor de MeTMOS a fost foarte mare, valoarea medie a diametrului porilor a fost cea mai mică. Acest lucru a fost în contrast cu măsurătorile făcute pentru preparatul obținut cu OctMOS, care a avut un diametru mai mare al porilor [175].

2. CONTRIBUȚII ORIGINALE

Biocataliza este un domeniu de mare actualitate pentru cercetătorii din întreaga lume datorită avantajelor clare pe care le prezintă față de cataliza chimică clasică. Printre acestea se numără biodegradabilitatea, selectivitatea, precum și numărul redus de etape în cazul reacțiilor catalizate de enzime. Cu toate acestea, enzimele sunt relativ instabile și au un preț ridicat, fapt care le face greu de aplicat la scară industrială.

Cererea mare de compuși enantiopuri în multe domenii, dar mai ales în industria farmaceutică, a condus la nevoia de obținere a celui mai eficient catalizator pentru fiecare proces în parte. În astfel de situații, enzimele s-au dovedit a fi catalizatorii ideali și din acest motiv a devenit necesară dezvoltarea tehnicilor de imobilizare.

Imobilizarea enzimelor reprezintă o tehnică importantă cu ajutorul căreia se pot minimiza dezavantajele prezentate mai sus. În urma imobilizării rezultă preparate enzimatiche cu selectivitate și specificitate ridicate, care pot fi separate cu ușurință din mediul de reacție în vederea reutilizării. Din varietatea de metode de imobilizare existente, am ales entraparea în matrici sol-gel datorită simplității și reproductibilității excelente. În cazul acestei tehnici, enzima este prinsă în interiorul unei matrici și astfel este protejată împotriva denaturării cauzate de factori fizici sau chimici sau de enzime proteolitice.

Dezvoltarea unor tehnologii care folosesc biocataliza cu lipaze pentru sinteza unor compuși noi reprezintă una dintre cele mai importante provocări din domeniul chimiei organice. Sinteza și utilizarea enantiomerilor cu puritate ridicată este necesară pentru diferite industrii (farmaceutică, alimentară și cosmetică).

Entraparea enzimelor cu ajutorul tehnicilor de tip sol-gel este una dintre cele mai simple și reproductibile metode. Acest tip de imobilizare este avantajos deoarece nu este afectat de contaminarea microbiană. Biocatalizatorii imobilizați prin entrapare în sol-gel prezintă o structură nano- sau microporoasă, ceea ce le conferă o serie de proprietăți valoroase, cum ar fi suprafață specifică mare și porozitate ridicată. O serie de studii au indicat faptul că varierea silanilor precursori (de exemplu utilizarea unor silani cu hidrofilicitate diferită) permite modificarea performanțelor catalitice cum ar fi: activitatea, stabilitatea sau selectivitatea. De obicei este necesară prezența unor aditivi de imobilizare (polietilenglicol, polivinilalcool și mai nou, lichide ionice) cu scopul de a îmbunătăți activitatea enzimatică.

Principalele obiective urmărite în cadrul acestei teze de doctorat au fost obținerea de catalizatori stabili și eficienți cu aplicabilitate în sinteza compușilor optici activi și imobilizarea unor lipaze microbiene în matrici de sol-gel sau prin entrapare combinată cu adsorbție folosind sisteme terțiare de silani precursori. De asemenea, s-a dorit optimizarea unei noi metode de imobilizare prin entrapare în sol-gel, respectiv prin entrapare combinată cu adsorbție, în prezență de lichide ionice ca aditivi. În urma imobilizării s-a urmărit creșterea stabilității termice, operaționale și a numărului posibil de reutilizări a biocatalizatorilor obținuți prin entrapare în sol-gel folosind lichide ionice ca aditivi. Lipazele imobilizate prin tehnici sol-gel au fost caracterizate din punct de vedere morfologic folosind microscopia electronică de

scanare (SEM), metoda BET de determinare a suprafeței specifice și microscopia cu fluorescență.

2.1 Imobilizarea prin entrapare în matrici de sol-gel a unor lipaze de origine microbiană

2.1.1. Influență raportului enzimă/suport asupra eficienței catalitice

Numeroase studii experimentale s-au axat pe obținerea unor biocatalizatori robuști, cu eficiență catalitică ridicată, care să poată fi utilizați cu succes în industrie. Rezoluția cinetică a amestecurilor racemice reprezintă una dintre cele mai importante aplicații ale biocatalizei, deoarece enantiomerii rezultați sunt compuși de pornire în industria farmaceutică. Pentru aplicații practice, este importantă cunoașterea încărcării optime cu enzimă a matricii sol-gel, în scopul eficientizării procedurii.

Proprietățile fizice ale matricii sol-gel sunt foarte importante, deoarece sunt responsabile pentru proprietățile finale ale enzimelor entrapate. Parametrii porilor și dimensiunea particulelor determină aria suprafeței specifice și astfel afectează capacitatea de imobilizare. Suporturile neporoase prezintă puține limitări difuzionale, dar prezintă o capacitate de încărcare mai redusă. Din acest motiv, sunt preferate în general suporturile poroase datorită suprafeței specifice mai mari, deoarece este posibilă obținerea unei mai bune încărcări cu enzimă. Încărcarea cu proteină este un parametru esențial al imobilizării, deoarece prețul enzimei reprezintă adesea principalul factor care împiedică utilizarea procesului la scală mare. În mod evident, încărcări mai mari cu enzimă ar trebui să rezulte în valori mai ridicate ale activității, dar nu toată enzima va rămâne activă, de exemplu moleculele entrapate în interiorul porilor mici nu sunt disponibile pentru substrat. Un alt posibil dezavantaj ar putea fi denaturarea fizică sau chimică a enzimei în timpul procesului de imobilizare. Astfel, valorile ridicate ale încărcării cu proteină trebuie corelate cu activitatea reziduală mare a enzimei imobilizate.

În cadrul acestui studiu, au fost testate diferite încărcări cu lipază B din *Candida antarctica* pentru imobilizarea prin entrapare în sol-gel folosind ca silani precursori PhTMOS, MeTMOS și TMOS în raport molar de 1,6:0,4:1 și lichidul ionic [Omim]BF₄ ca aditiv (Metoda 1). Încărcarea cu proteină a fost calculată ca diferență între conținutul de proteine al lipazei native (supusă imobilizării) și conținutul de proteină rămasă în soluțiile de spălare după entrapare, raportată la cantitatea de preparat sol-gel uscat. În această situație, randamentul de imobilizare a proteinei a fost de aproximativ 80%, indiferent de cantitatea de proteină supusă imobilizării. O parte din enzimă a rămas în soluția care a fost eliminată în timpul etapei de spălare, după gelifiere. De aceea, încărcarea cu proteină a crescut cu cantitatea de enzimă supusă entrapării, dar nu toată enzima încapsulată a rămas activă la finalul procesului.

Performanțele catalitice ale preparatelor enzimatic obținute au fost testate în reacțiile de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului și 2-octanolului. Rezultatele obținute după 6 ore de reacție sunt prezentate în Tabelele 2.1 și 2.2.

Tabelul 2.1. Influența cantității de enzimă supusă imobilizării prin entrapare în sol-gel în cazul acilării 2-hexanolului după 6 ore de reacție, în *n*-hexan.

Încărcare cu enzimă (mg proteină/g biocatalizator)	Conv. (%)	A_{tr} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	11	1,824	100	99	224
11,28	40	1,253	633	99	397
15,90	34	1,305	469	99	331
17,44	49	1,335	582	98	357
18,90	44	1,420	450	98	232
23,48	45	1,422	408	97	160

Tabelul 2.2. Influența cantității de enzimă supusă imobilizării prin entrapare în sol-gel în cazul acilării 2-octanolului în *n*-hexan după 6 ore de reacție.

Încărcare cu enzimă (mg proteină/g biocatalizator)	Conv. (%)	A_{tr} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	10	1,661	100	81	10
11,28	39	1,305	723	95	73
15,90	39	1,312	601	95	90
17,44	44	1,410	657	96	112
18,90	43	1,394	485	95	84
23,48	45	1,357	458	95	92

Pe baza datelor din Tabelele 2.1 și 2.2 s-a reprezentat grafic influența încărcării cu enzimă a matricii sol-gel asupra activității și enantioselectivității preparatelor entrapate (Figurile 2.1 și 2.2).

Cunoașterea valorii optime a încărcării matricii cu proteină este esențială. Prin dublarea încărcării cu enzimă s-a obținut o creștere cu doar 13% a activității. Astfel, chiar dacă se imobilizează mai multă lipază, aceasta nu mai poate să-și exercite activitatea catalitică, deci nu se justifică creșterea încărcării cu enzimă a matricii peste o anumită valoare.

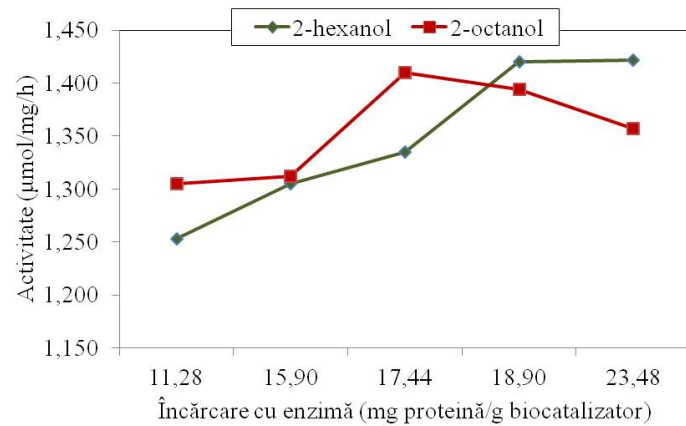


Figura 2.1. Influența încărcării cu enzimă asupra activității catalitice a lipazei CaLB imobilizată prin entrapare în sol-gel în reacțiile de acilare a 2-hexanolului și 2-octanolului în *n*-hexan la 40°C.

Pentru toți biocatalizatorii testați în reacția de acilare a 2-hexanolului s-au obținut valori excelente ale activității de transesterificare, valori care au crescut odată cu creșterea concentrației de proteină în matricea sol-gel. În cazul în care substratul testat a fost 2-octanolul, cele mai bune valori ale activității s-au obținut pentru o încărcare de 17,44 mg proteină raportat la un gram de preparat enzimatic. Activitatea de transesterificare crește odată cu încărcarea cu enzimă, până la o valoare optimă. Supraîncărcarea matricii cu proteină a avut un efect negativ asupra activității enzimatice. A fost demonstrat faptul că activitatea unei lipaze imobilizate nu se corelează întotdeauna cu încărcarea cu enzimă a biocatalizatorului, așa cum se poate observa și în cazul acestui studiu. Adăugarea unei cantități mai mari de enzimă nu se justifică. Pe parcursul imobilizării, proteina enzimatică prezintă doar o parte din activitatea așteptată, iar aceasta se poate datora inactivării, împiedicării sterice sau limitărilor de transfer masic. Pe de altă parte, proteina neimobilizată poate fi parțial inactivă și din acest motiv randamentul de imobilizare trebuie analizat cu atenție (Figura 2.1).

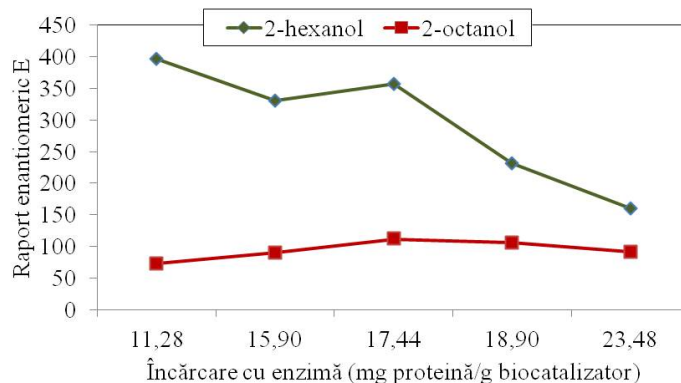


Figura 2.2. Influența cantității de enzimă asupra enantioselectivității lipazei CaLB imobilizată prin entrapare în sol-gel în reacțiile de acilare a 2-hexanolului și 2-octanolului în *n*-hexan, la 40°C.

Enantioselectivitatea biocatalizatorilor este un parametru important care ține cont atât de conversie cât și de excesul enantiomeric al produsului de reacție. Din Figura 2.2 se observă că în reacția de acilare a 2-hexanolului raportul enantiomeric a fost mai mare în cazul în care cantități mici de enzimă au fost supuse imobilizării, dar în această situație s-au înregistrat valori mai scăzute ale activității.

În urma imobilizării, enantioselectivitatea biocatalizatorilor în reacția de acilare a 2-octanolului a fost excelentă comparativ cu lipaza nativă, obținându-se valori ridicate pentru o încărcare de 17,44 și 23,48 mg proteină la unitatea de preparat enzimatic. În această situație, valorile lui E au fost mai scăzute, probabil datorită lungimii mai mari a lanțului alchil al substratului. Ca și în cazul 2-hexanolului, având în vedere atât activitatea enzimatică, raportul enantiomeric (E) cât și costul biocatalizatorului, se poate spune că valoarea optimă a încărcării cu enzimă este 17,44 mg. Biocatalizatorii care au fost testați în studiile ulterioare au fost obținuți la o încărcare a matricii sol-gel cu 17,44 mg proteină/g preparat enzimatic [177].

2.1.2. Optimizarea raportului molar al silanilor precursori

Lipazele din trei specii microbiene, *Burkholderia cepacia* (Amano PS), *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) și *Candida antarctica* (CaLB - Lecta) au fost imobilizate prin entrapare în matrici sol-gel obținute cu sisteme ternare de silani precursori în prezența unui lichid ionic ca aditiv (Metoda 1). S-a studiat și în acest caz reacția de acilare a 2-octanolului cu acetat de vinil folosind ca mediu de reacție *n*-hexan sau acetonă. Enantioselectivitatea în cazul acestei reacții se bazează pe discriminare cinetică, toate lipazele studiate fiind (*R*)-selective, ceea ce înseamnă că (*R*)-acetatul de 2-octil este enantiomerul care se formează cu viteză mai mare, în conformitate cu regula empirică a lui Kazlauskas [178, 179].

Pe baza analizelor cromatografice după 24 de ore de reacție s-au calculat pentru fiecare preparat activitatea de transesterificare, randamentul de regăsire a activității enzimatică, excesul enantiomeric al (*R*)-esterului (e.e.) și raportul enantiomeric (E).

Rezultate anterioare au demonstrat că eficiența catalitică a lipazei din *Pseudomonas fluorescens* în reacția de acilare a alcoolilor secundari poate fi îmbunătățită prin prezența grupelor alchil hidrofobe din matricea sol-gel și utilizarea lichidelor ionice ca tipar structural [180, 181]. Recent, a fost raportată eficiența catalitică mai ridicată a lipazei din *Pseudomonas fluorescens* imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție atunci când s-au utilizat sisteme ternare de silani precursori conținând alchiltrietoxisilani, feniltrietoxisilan (PhTEOS) sau octiltrietoxisilan (OcTEOS) și tetraetoxisilan (TEOS) comparativ cu sistemele binare corespunzătoare [182]. În cadrul acestei teze am folosit la protocoalele de imobilizare sisteme binare și ternare de feniltrimetoxisilan (PhTMOS), metiltrimetoxisilan (MeTMOS) și tetrametoxisilan (TMOS), precum și lichidele ionice [Emim]BF₄ sau [Omim]BF₄ ca aditivi. Cantitatea totală de silani fost aceeași pentru toate imobilizările (6 mmoli).

Rezultatele obținute prin testarea biocatalizatorilor în reacția de acilare a 2-octanolului în mediu de *n*-hexan sau acetonă sunt prezentate în Tabelele 2.3-2.8.

Așa cum se poate observa, eficiența imobilizării a fost excelentă pentru lipazele din *Burkholderia cepacia* și *Candida antarctica*, având în vedere că valorile randamentelor de regăsire a activității au fost de aproximativ 10 ori mai mari decât în cazul lipazei native. Chiar și în cazul lipazei Amano AK din *Pseudomonas fluorescens*, situație în care s-au înregistrat valori mai scăzute ale randamentului de regăsire a activității, acesta a fost de aproximativ 90% comparativ cu lipaza neimobilizată.

Tabelul 2.3. Eficiența catalitică și enantioselectivitatea lipazei Amano AK imobilizată prin entrapare în sol-gel în cazul acilării 2-octanolului în mediu de *n*-hexan.

Silani precursori (raport molar)	Aditiv	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	-	47	1,910	100	53	5
PhTMOS:MeTMOS:TMOS 1:1:1	PEG	51	0,436	82	55	6
	[Omim]BF ₄	45	0,372	74	53	5
	[Emim]BF ₄	21	0,179	40	56	4
PhTMOS:MeTMOS:TMOS 1,6:0,4:1	PEG	41	0,332	87	56	5
	[Omim]BF ₄	41	0,343	81	56	5
	[Emim]BF ₄	43	0,349	83	57	5
PhTMOS:MeTMOS:TMOS 0,4:1,6:1	PEG	45	0,367	62	51	5
	[Omim]BF ₄	21	0,176	30	53	4
	[Emim]BF ₄	23	0,191	38	53	4

Tabelul 2.4. Eficiența catalitică și enantioselectivitatea lipazei CaLB imobilizată prin entrapare în sol-gel în cazul acilării 2-octanolului în mediu de *n*-hexan.

Silani precursori (raport molar)	Aditiv	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	-	17	0,705	100	89	21
PhTMOS:MeTMOS:TMOS 1:1:1	PEG	51	0,422	301	95	201
	[Omim]BF ₄	51	0,415	230	95	201
	[Emim]BF ₄	51	0,434	266	93	114
PhTMOS:MeTMOS:TMOS 1,6:0,4:1	PEG	53	0,435	239	88	86
	[Omim]BF ₄	51	0,410	260	95	201
	[Emim]BF ₄	51	0,426	277	95	201
PhTMOS:MeTMOS:TMOS 0,4:1,6:1	PEG	51	0,420	206	93	114
	[Omim]BF ₄	51	0,416	222	95	201
	[Emim]BF ₄	51	0,428	253	95	201

Tabelul 2.5. Eficiența catalitică și enantioselectivitatea lipazei Amano PS imobilizată prin entrapare în sol-gel în cazul acilării 2-octanolului în mediu de *n*-hexan.

Silani precursori (raport molar)	Aditiv	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	-	23	0,953	100	74	8
PhTMOS:MeTMOS:	PEG	61	0,493	941	63	20
TMOS	[Omim]BF ₄	61	0,493	989	62	19
1:1:1	[Emim]BF ₄	12	0,105	180	68	6
PhTMOS:MeTMOS:	PEG	65	0,525	952	53	14
TMOS	[Omim]BF ₄	53	0,433	1061	73	16
1,6:0,4:1	[Emim]BF ₄	20	0,165	315	73	8
PhTMOS:MeTMOS:	PEG	53	0,432	761	72	15
TMOS	[Omim]BF ₄	67	0,538	1051	49	15
0,4:1,6:1	[Emim]BF ₄	11	0,091	139	66	5

Tabelul 2.6. Eficiența catalitică și enantioselectivitatea lipazei Amano AK imobilizată prin entrapare în sol-gel în cazul acilării 2-octanolului în mediu de acetona.

Silani precursori (raport molar)	Aditiv	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	-	41	1,721	100	73	11
PhTMOS:MeTMOS:	PEG	38	0,321	67	78	13
TMOS	[Omim]BF ₄	31	0,255	56	76	10
1:1:1						
PhTMOS:MeTMOS:	PEG	30	0,250	72	78	11
TMOS	[Omim]BF ₄	25	0,207	54	76	9
1,6:0,4:1						
PhTMOS:MeTMOS:	PEG	36	0,298	56	76	11
TMOS	[Omim]BF ₄	11	0,088	17	70	6
0,4:1,6:1						

Tabelul 2.7. Eficiența catalitică și enantioselectivitatea lipazei CaLB imobilizată prin entrapare în sol-gel în cazul acilării 2-octanolului în mediu de acetonă.

Silani precursori (raport molar)	Aditiv	Conv. (%)	A_{tr} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	-	7	0,289	100	75	7
PhTMOS:MeTMOS:TMOS	PEG	44	0,378	658	95	88
1:1:1	[Omim]BF ₄	51	0,427	577	95	201
PhTMOS:MeTMOS:TMOS	PEG	53	0,479	643	88	86
1,6:0,4:1	[Omim]BF ₄	51	0,429	664	95	201
PhTMOS:MeTMOS:TMOS	PEG	51	0,419	501	94	146
0,4:1,6:1	[Omim]BF ₄	51	0,419	545	95	201

Tabelul 2.8. Eficiența catalitică și enantioselectivitatea lipazei Amano PS imobilizată prin entrapare în sol-gel în cazul acilării 2-octanolului în mediu de acetonă.

Silani precursori (raport molar)	Aditiv	Conv. (%)	A_{tr} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	-	10	0,406	100	72	10
PhTMOS:MeTMOS:TMOS	PEG	40	0,331	1483	82	17
1:1:1	[Omim]BF ₄	50	0,422	1987	80	22
PhTMOS:MeTMOS:TMOS	PEG	56	0,470	2000	74	23
1,6:0,4:1	[Omim]BF ₄	36	0,298	1714	83	17
PhTMOS:MeTMOS:TMOS	PEG	31	0,264	1091	82	14
0,4:1,6:1	[Omim]BF ₄	50	0,420	1927	79	20

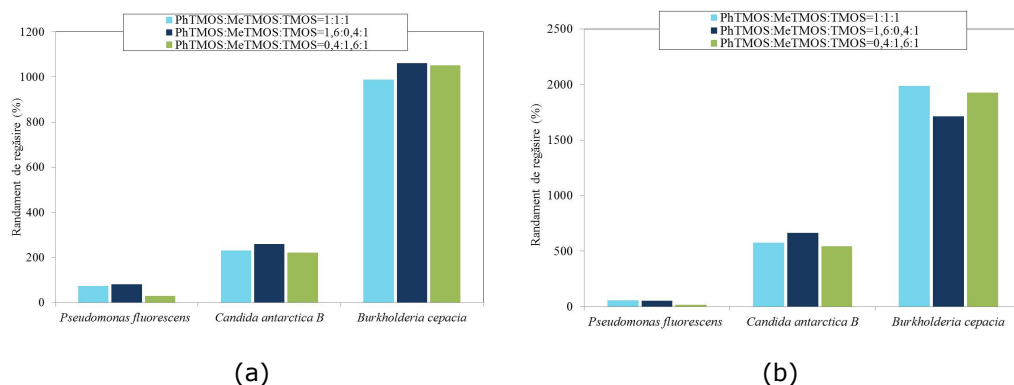


Figura 2.3. Dependența eficienței imobilizării ($[\text{Omim}]\text{BF}_4$ aditiv) de tipul biocatalizatorului, de raportul molar al silanilor precursori și de mediul de reacție utilizat la acilarea 2-octanolului: (a) *n*-hexan sau (b) acetonă.

Figurile 2.3a și 2.3b arată că după imobilizare activitatea totală a fost mai mare la lipaza din *Burkholderia cepacia*, de 10 ori mai mare decât a celorlalte lipaze imobilizate. Lipaza din *Candida antarctica* a prezentat valori ridicate ale randamentului de regăsire a activității, iar cea din *Pseudomonas fluorescens* a dat valorile cele mai mici. Folosind un raport molar al precursorilor silanici de 1,6:0,4:1 s-au obținut cele mai bune valori ale activității totale. Atunci când s-a folosit acetona ca mediu de reacție, valorile randamentului de regăsire au fost mai mari decât în cazul utilizării hexanului.

Biocatalizatorii rezultați la imobilizarea prin entrapare în sol-gel a lipazei din *Burkholderia cepacia* au prezentat cele mai ridicate valori ale activității. Este evident faptul că este necesară alegerea foarte atentă a compoziției matricii sol-gel astfel încât să se maximizeze eficiența catalitică a enzimelor entrapate. Atunci când la imobilizare s-au folosit sisteme ternare de silani precursori, cea mai ridicată valoare a activității s-a observat pentru concentrații mai reduse ale grupării fenil în amestecul de silani, dar aceasta a fost asociată cu enantioselectivități ușor mai reduse. Cea mai ridicată enantioselectivitate s-a obținut atunci când la imobilizare s-a folosit un raport molar de 1:1:1 al silanilor precursori și lichidul ionic $[\text{Omim}]\text{BF}_4$ ca aditiv. Valoarea raportului enantiomeric E a fost de peste 2 ori mai mare decât în cazul lipazei native. De aceea, considerăm că raportul molar optim al silanilor precursori la care se obține cea mai ridicată eficiență catalitică a lipazelor entrapate este cel de 1:1:1. Prezența unui lanț alchil mai hidrofob (octil vs. etil) în partea cationică a lichidului ionic a dus la obținerea unei lipaze imobilizate cu activitate și enantioselectivitate superioare, indiferent de raportul molar al silanilor precursori [183].

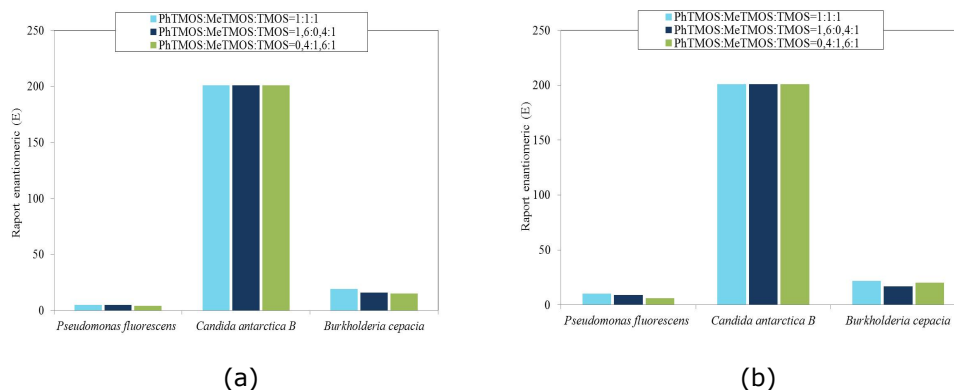


Figura 2.4. Dependența enantioselectivității lipazelor native sau imobilizate prin entrapare în sol-gel ([Omim]BF₄ aditiv) de raportul molar al silanilor precursori și de mediul de reacție utilizat la acilarea 2-octanolului: (a) *n*-hexan sau (b) acetonă.

În Figurile 2.4.a și 2.4.b sunt prezentate valorile enantioselectivității pentru aceleași preparate. Se poate observa că la acilarea 2-octanolului cu preparatele obținute cu lipaza din *Candida antarctica B* s-au obținut valori ridicate ale enantioselectivității comparativ cu enzima nativă. În cazul lipazei din *Pseudomonas fluorescens* raportul enantiomeric E a avut valori puțin mai mari în acetonă decât în hexan, în timp ce la celelalte lipaze valorile lui E au fost apropiate indiferent de mediul de reacție utilizat.

2.1.3. Sisteme binare și ternare de silani precursori cu grupări vinil

Pentru a obține enzime imobilizate cu proprietățile dorite, de exemplu cu reținerea activității, stabilității și selectivității, este adesea necesar să se selectați precursorii potriviți și de asemenea să se optimizeze raportul lor molar. În cadrul acestui studiu s-a realizat imobilizarea lipazei din *Candida antarctica* 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 și interacțiunea cu enzima.

S-a realizat imobilizarea lipazei CalB prin entrapare în sol-gel (Metoda 1) folosind sisteme binare și ternare de silani precursori, la o încărcare cu enzimă a matricii de 17,44 mg proteină la un gram de xerogel. Studiul performanțelor catalitice ale preparatelor enzimatic obținute a fost efectuat pe reacția model de transesterificare a alcoolilor alifatici secundari (2-hexanol sau 2-octanol), folosind acetatul de vinil ca agent de acilare. Reacțiile au fost realizate în mediu de *n*-hexan la 40°C, iar rezultatele obținute la analiza probelor după 6 ore de reacție sunt prezentate în Tabelele 2.9. și 2.10.

Tabelul 2.9. Acilarea 2-hexanolului catalizată de lipaza CaLB imobilizată prin entrapare în sol-gel cu [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare.

Silani precursori	Conv. (%)	A _{trans} (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	e.e. (%)
Lipaza nativă (control)	11	1,824	99
VTMOS:TMOS=1:1	27	0,934	99
VTMOS:TMOS=2:1	40	1,280	97
PhTMOS:VTMOS:TMOS=1:1:1	37	1,211	99
PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1	39	1,289	99
PhTMOS:VTMOS:TMOS=0,4:1,6:1	41	1,304	98

Pe baza rezultatelor prezentate în Tabelul 2.9 s-au reprezentat grafic dependența eficienței catalitice și a enantioselectivității de raportul molar al silanilor precursori (figurile 2.5 și 2.6).

În cazul folosirii unui sistem binar de silani precursori s-a obținut o valoare mai ridicată a activității catalitice atunci când concentrația de grupări vinil în amestecul de silani a fost mai mare (raport molar 2:1).

Atunci când la imobilizare s-a folosit un sistem ternar de silani precursori s-au obținut valorile cele mai ridicate ale activității enzimatică. Cea mai bună valoare a activității (1,304 μmol·h⁻¹·mg⁻¹) s-a obținut cu preparatul realizat la un raport molar al silanilor PhTMOS:VTMOS:TMOS de 0,4:1,6:1.

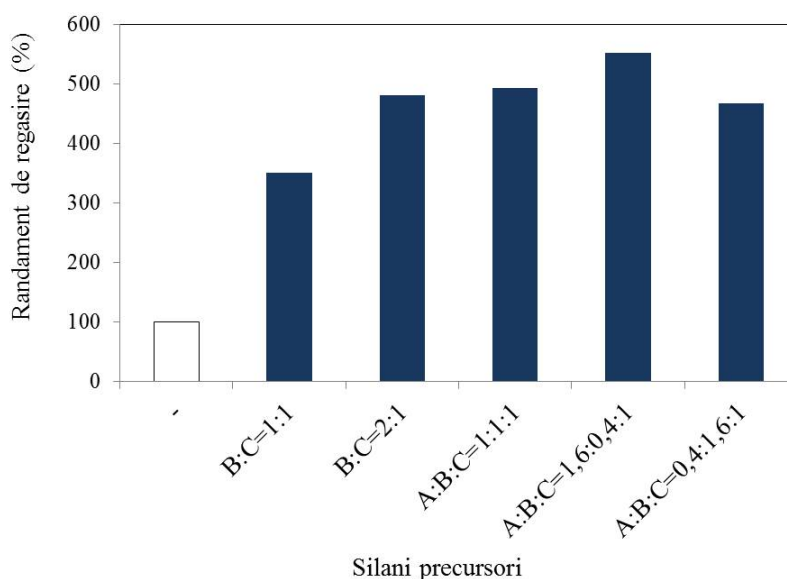


Figura 2.5. Influența silanilor precursori asupra eficienței catalitice a biocatalizatorilor imobilizați prin entrapare în sol-gel în reacția de acilare a 2-hexanolului în *n*-hexan la 40°C (A=PhTMOS, B=VTMOS, C=TMOS).

Randamentul de regăsire a activității este o exprimare mai complexă a activității enzimice, deoarece acesta se formulează ca raport al activității enzimei imobilizate față de cea a enzimei native. Așa cum se poate observa din Figura 2.5, eficiența catalitică a fost mai ridicată la folosirea unui sistem ternar de silani precursori, la un raport molar de 1,6:0,4:1, ceea ce înseamnă că o concentrație mai mică a grupării vinil nehidrolizabile în matricea gelului este benefică.

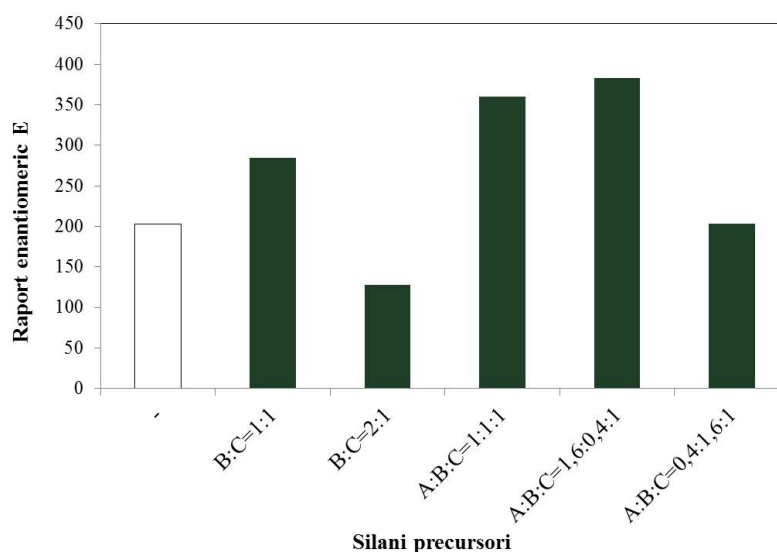


Figura 2.6. Influența silanilor precursori asupra enantioselectivității biocatalizatorilor imobilizați prin entrapare în sol-gel în reacția de acilare a 2-hexanolului în *n*-hexan la 40°C (A=PhTMOS, B=VTMOS, C=TMOS).

Enantioselectivitatea biocatalizatorilor este un parametru foarte important pentru aplicațiile practice, ce ține cont atât de randamentul în ester cât și de excesul enantiomeric al produsului. Din Figura 2.6 se poate observa că la imobilizarea prin entrapare în sol-gel cu sistem binar de silani precursori, enantioselectivitatea cea mai bună s-a obținut atunci când silanii precursori VTMOS și TMOS au fost în raport molar de 1:1.

Dacă la imobilizare s-a folosit sistemul ternar de silani precursori, s-au obținut valori și mai ridicate ale raportului enantiomeric E, de peste 350. Și în acest caz, preparatul enzimatic cu cele mai bune performanțe a fost cel obținut cu un raport de 1,6:0,4:1 al silanilor precursori PhTMOS, VTMOS și TMOS.

Aceleași preparate au fost testate pentru activitate și în reacția de acilare a 2-octanolului în mediu de *n*-hexan la 40°C. Rezultatele obținute la analiza probelor după 6 ore de reacție sunt prezentate în Tabelul 2.10.

Tabelul 2.10. Acilarea 2-octanolului în *n*-hexan catalizată de lipaza CaLB imobilizată prin entrapare în sol-gel cu [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare

Silani precursori	Conv. (%)	A _{trans} (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	e.e. (%)
Lipaza nativă (control)	10	1,660	81
VTMOS:TMOS=1:1	20	0,704	91
VTMOS:TMOS=2:1	42	1,452	95
PhTMOS:VTMOS:TMOS=1:1:1	36	1,218	95
PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1	39	1,320	95
PhTMOS:VTMOS:TMOS=0,4:1,6:1	44	1,461	96

Pe baza rezultatelor prezentate în Tabelul 2.10 s-au reprezentat grafic dependența eficienței catalitice și a enantioselectivității de raportul molar al silanilor precursori (Figurile 2.7 și 2.8).

Din Tabelul 2.10 se observă că la fel ca și în cazul 2-hexanolului, activitatea catalitică este mai mare la folosirea unui raport molar de 2:1 al silanilor precursori.

Atunci când la imobilizare s-a folosit un sistem ternar de silani precursori, valorile cele mai ridicate ale activității s-au obținut la un raport molar de 0,4:1,6:1 al silanilor precursori.

Atât în cazul sistemelor binare cât și al celor ternare, s-a observat că o concentrație mai mare a radicalului vinil din precursorul silanic a avut un efect favorabil.

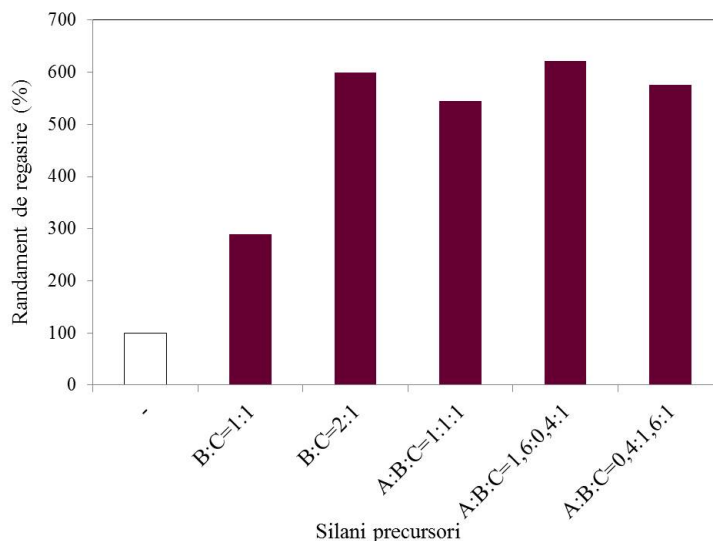


Figura 2.7. Influența silanilor precursori asupra eficienței catalitice a biocatalizatorilor imobilizați prin entrapare în sol-gel în reacția de acilare a 2-octanolului în *n*-hexan la 40°C (A=PhTMOS, B=VTMOS, C=TMOS).

În ceea ce privește eficiența catalitică, se poate observa că s-au obținut valori excelente în cazul tuturor biocatalizatorilor testați, acestea fiind de 3 până la 6 ori mai mari decât în cazul lipazei native (Figura 2.7.).

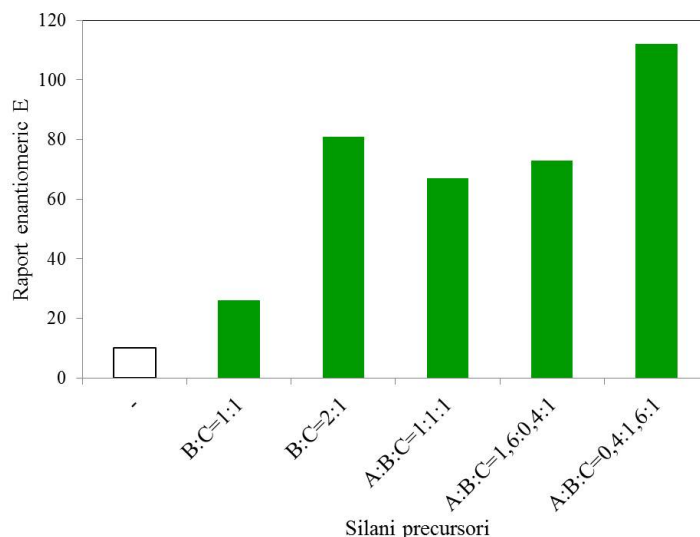


Figura 2.8. Influența silanilor precursori asupra enantioselectivității biocatalizatorilor imobilizați prin entrapare în sol-gel în reacția de acilare a 2-octanolului în *n*-hexan la 40°C.

În urma imobilizării s-au obținut valori excelente ale raportului enantiomeric comparativ cu lipaza nativă (Figura 2.8). În ceea ce privește preparatele enzimaticе obținute cu sistem binar de silani, cele mai bune valori ale enantioselectivității s-au obținut la raportul molar de 2:1 al VTMOС:ТМОС, pe când în cazul celor obținute cu sistem ternar de precursori, valoarea cea mai mare a raportului enantiomeric (E) a fost dată de preparatul obținut cu silanii precursori PhТМОС:VTМОС:ТМОС la un raport molar de 0,4:1,6:1 [184].

2.1.4. Influența lichidelor ionice folosite ca aditivi de imobilizare

Lichidele ionice sunt compuși considerați de mare viitor în calitate de solvenți ecologici, care datorită nevolatilității lor și stabilității termice ridicate vor putea înlocui solvenții organici volatili utilizați la ora actuală în majoritatea proceselor.

Lichidele ionice cu cation de tip 1,3-dialchilimidazoliu sunt cele mai folosite pentru aplicații biocatalitice. Proprietățile lor fizice acoperă un domeniu larg de valori, dar proprietățile catalitice sunt influențate în general de polaritate, hidrofobicitate și de miscibilitatea cu solvenul.

În mod surprinzător, lichidele ionice s-au dovedit a fi de asemenea aditivi de imobilizare eficienți în cadrul procesului de entrapare. De obicei ele conțin un cation organic mai voluminos și un anion anorganic de dimensiuni reduse și sunt

disponibile într-o gamă foarte variată. Identificarea rolului exact al lichidelor ionice la obținerea materialelor de tip sol-gel și efectul prezenței lor în timpul imobilizării este foarte dificil de făcut [183].

A fost studiată influența cantității de lichid ionic folosit ca aditiv la imobilizarea prin entrapare în sol-gel a lipazei Amano AK din *Pseudomonas fluorescens* în cazul reacției de acilare a 2-hexanolului cu acetat de vinil la 40°C în mediu de *n*-hexan.

Lichidul ionic [Omim]BF₄ a fost folosit în rapoarte molare cuprinse între 0,064 și 0,322 față de silanii precursori (Tabelul 2.11). Acest lichid ionic nu este miscibil cu apa, dar este miscibil cu silanii folosiți ca precursori (OctMOS și TMOS). Creșterea cantității relative de lichid ionic în amestecul de imobilizare permite maximizarea efectului pozitiv ca șablon în timpul procesului sol-gel.

Cele mai ridicate valori ale activității de transesterificare au fost obținute la un raport molar de 0,2 între lichidul ionic și silanii precursori. Enantioselectivitatea biocatalizatorilor obținuți nu a fost influențată semnificativ de cantitatea de lichid ionic, dar a fost ușor îmbunătățită comparativ cu lipaza nativă [181].

Tabelul 2.11. Influența cantității de aditiv ([Omim]BF₄) asupra eficienței catalitice și enantioselectivității lipazei din *Pseudomonas fluorescens* entrapată în sol-gel în cazul acilării enantioselective a 2-hexanolului. Silanii precursori au fost OctMOS și TMOS la un raport molar de 1:1.

Report molar lichid ionic/silani precursori	Conversie (%)	Activitate (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	29	1,217	78	11
0,064	50	0,411	75	16
0,129	59	0,494	63	13
0,193	67	0,591	49	15
0,257	63	0,548	57	14
0,322	47	0,419	75	14

Pentru a studia influența structurii lichidului ionic utilizat ca aditiv, s-a realizat imobilizarea lipazei din *Candida antarctica* B prin entrapare în matrici sol-gel folosind două metode de imobilizare. În cazul primei metode se utilizează un catalizator nucleofil (NaF), iar silanii precursori (6 mmoli) se adaugă peste soluția de lipază. În cea de-a doua variantă, se prepară un sol prepolimer folosind 3 mmoli de silani precursori, iar soluția de lipază se aduagă la sfârșit, împreună cu un catalizator acid (HCl). Matricea sol-gel a fost obținută folosind un sistem ternar de silani precursori, cu PhTMOS, MeTMOS și TMOS în raport molar de 1,6:0,4:1, iar substraturile studiate au fost alcoolii secundari 2-hexanol și 2-octanol.

Tabelul 2.12. Influența lichidelor ionice utilizate ca aditivi la imobilizarea lipazei din *Candida antarctica* B (Metoda 1) asupra eficienței catalitice în cazul acilării enantioselective a 2-hexanolului.

Aditiv	Conv. (%)	A _{trans} (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	η _{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	20	0,852	100	93	35
[Emim]BF ₄	47	0,395	274	97	160
[Hmim]BF ₄	49	0,407	289	96	163
[Omim]BF ₄	51	0,434	219	96	380
[Bmim]PF ₆	49	0,414	311	96	163
[Emim]COOCH ₃	50	0,422	328	94	115
[Emim]COOCF ₃	50	0,431	349	94	115
[Bmim]Tf ₂ N	50	0,447	353	96	194

În cazul acilării 2-hexanolului, s-au obținut valori excelente ale activității și enantioselectivității, indiferent de lichidul ionic utilizat ca aditiv la imobilizare. Lichidul ionic care a dus la obținerea celei mai ridicate valori a raportului enantiomeric E a fost [Omim]BF₄ (E=380) (Tabelul 2.12).

Tabelul 2.13. Influența lichidelor ionice utilizate ca aditivi la imobilizarea lipazei din *Candida antarctica* B (Metoda 1) asupra eficienței catalitice în cazul acilării enantioselective a 2-octanolului în n-hexan, după 24 de ore.

Aditiv	Conv. (%)	A _{trans} (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	η _{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	20	0,842	100	89	21
[Emim]BF ₄	42	0,350	246	95	81
[Hmim]BF ₄	51	0,432	311	95	201
[Omim]BF ₄	51	0,429	664	95	201
[Bmim]PF ₆	51	0,428	325	94	146
[Emim]COOCH ₃	51	0,432	330	93	114
[Emim]COOCF ₃	52	0,434	356	91	135
[Bmim]Tf ₂ N	51	0,432	345	95	201

Atunci când substratul testat a fost 2-octanolul, eficiența catalitică a lipazei CaLB a fost cuprinsă între 41 și 52% față de lipaza nativă. Activitatea lipazelor imobilizate a fost comparabilă pentru toate lichidele ionice testate ca aditivi, cu excepția [Emim]BF₄. Această valoare mai scăzută poate fi explicată prin prezența unui lanț alchil mai scurt în partea cationică (Tabelul 2.13). Eficiența catalitică, exprimată ca activitate totală relativă, a crescut de până la de trei ori atunci când lichidul ionic cu cele mai bune performanțe a fost folosit ca aditiv, datorită cantității mai mari de preparat imobilizat. Explicația constă în faptul că folosirea unui lichid ionic duce la obținerea unui randament mai ridicat de formare a matricii sol-gel, rezultând o cantitate mai mare de xerogel.

Pentru aplicații practice, mai ales în industria farmaceutică, enantioselectivitatea unei enzime este esențială deoarece doar unul dintre enantiomeri prezintă activitate biologică, pe când celălalt este inactiv sau chiar toxic

pentru organism. Raportul enantiomeric reprezintă un parametru care exprimă mai corect enantioselectivitatea biocatalizatorilor, deoarece corelează valorile conversiei și excesului enantiomeric al produsului.

Pe baza datelor din Tabelele 2.12 și 2.13 s-a realizat Figura 2.9. Pentru ca un proces să fie considerat eficient, raportul enantiomeric E trebuie să fie peste 25. În cazul preparatelor enzimatiche obținute, s-au obținut valori excelente ale raportului enantiomeric, cuprinse între 81 și 201, ceea ce înseamnă ca acestea pot fi utilizate cu succes în cadrul aplicațiilor industriale.

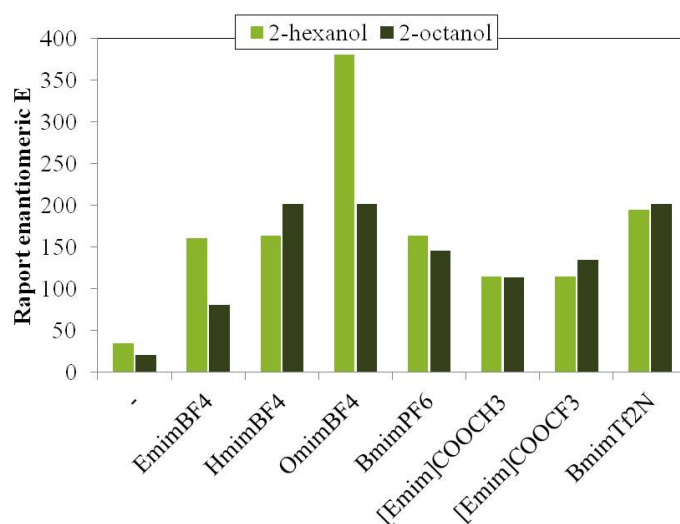


Figura 2.9. Influența lichidului ionic utilizat ca aditiv asupra enantioselectivității biocatalizatorilor obținuți prin Metoda 1 în reacțiile de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului și 2-octanolului.

De asemenea am urmărit influența lichidelor ionice ca aditivi de imobilizare asupra eficienței catalitice a preparatelor enzimatiche cu lipază din *Candida antarctica* B imobilizată prin entrapare în sol-gel (Metoda 2) și utilizate în reacția de acilare enantioselectivă a acelorași alcooli secundari (2-hexanol și 2-octanol). Rezultatele obținute în urma reacțiilor de acilare, după 24 de ore de reacție sunt prezentate în Tabelele 2.14. și 2.15.

Tabelul 2.14. Influența lichidelor ionice utilizate ca aditivi la imobilizarea lipazei CaLB (Metoda 2) asupra eficienței catalitice în cazul acilării enantioselective a 2-hexanolului în *n*-hexan.

Aditiv	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	20	0,852	100	93	35
[Emim]BF ₄	51	0,424	120	94	146
[Hmim]BF ₄	51	0,420	109	95	201
[Omim]BF ₄	45	0,385	102	97	160
[Bmim]PF ₆	50	0,429	101	94	115
[Emim]COOCH ₃	51	0,435	128	90	56
[Emim]COOCF ₃	51	0,437	118	96	380
[Bmim]Tf ₂ N	50	0,427	118	95	146

Lichidele cu același anion, tetrafluoroborat, au dus la activități ridicate ale preparatelor imobilizate odată cu scăderea lungimii lanțului alchil din partea cationică. Conform unor date din literatură, lichidele ionice cu anionul BF₄⁻ pot fi folosite ca tipar pentru obținerea nanostructurilor mezoporoase, în care legăturile de hidrogen dintre BF₄⁻ și grupările silanol din gelul de silice precum și interacțiunile dintre grupările imidazol vecine au un rol important în formarea structurii rețelei [185].

În ceea ce privește lichidele ionice cu același cation, [Emim], prezența în partea anionică a unor substituenți mai voluminoși (trifluoroacetat, acetat), a dus la creșterea activității preparatelor enzimatiche obținute și doar în cazul anionului trifluoroacetat și a enantioselectivității.

În reacția de acilare a 2-octanolului cu preparate enzimatiche obținute cu lichid ionic ca aditiv (Tabelul 2.15), s-au obținut valori mai mari ale activității enzimatiche, însă nu s-au observat diferențe semnificative între natura lichidelor ionice testate.

Tabelul 2.15. Influența lichidelor ionice ca aditivi la imobilizarea lipazei din *Candida antarctica* B (Metoda 2) asupra eficienței catalitice în cazul acilării enantioselective a 2-octanolului în *n*-hexan.

Aditiv	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	20	0,842	100	89	21
EmimBF ₄	51	0,442	127	93	114
HmimBF ₄	51	0,448	117	94	146
OmimBF ₄	51	0,444	119	95	201
BmimPF ₆	51	0,445	106	93	114
[Emim]COOCH ₃	52	0,469	140	90	83
[Emim]COOCF ₃	51	0,458	125	94	146
BmimTf ₂ N	51	0,467	131	95	201

Pe baza datelor din Tabelul 2.14 și 2.15 s-a reprezentat grafic variația enantioselectivității în funcție de natura lichidului ionic utilizat ca aditiv la imobilizare (Figura 2.10.).

S-au obținut valori excelente ale enantioselectivității (comparativ cu enzima nativă), valorile E fiind cuprinse între 56 și 380.

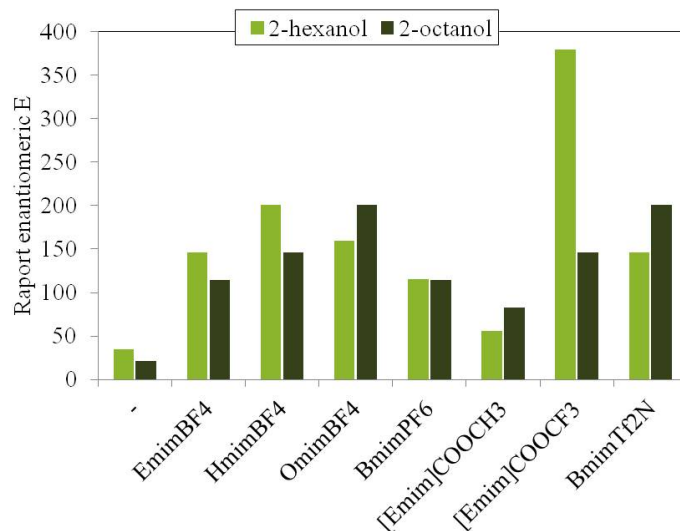


Figura 2.10. Influența lichidului ionic utilizat ca aditiv asupra enantioselectivității biocatalizatorilor obținuți prin Metoda 2 în reacția de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului și 2-octanolului.

Și de această dată în urma imobilizării au rezultat preparate enzimatiche cu valori ale raportului enantiomeric mult mai ridicate comparativ cu lipaza nativă. Cele mai mici valori ale lui E s-au înregistrat atunci când s-a folosit ca aditiv lichidul ionic [Emim]COOCH₃.

Valorile raportului enantiomeric au fost asemănătoare la acilarea 2-hexanolului în cazul ambelor metode de imobilizare testate, cu câteva excepții. În cazul metodei 1, valoarea lui E a fost mult mai ridicată la folosirea [Omim]BF₄ ca aditiv (E=380), iar la metoda 2 cea mai ridicată valoare s-a obținut pentru lichidul ionic EmimCOOCF₃ (E=380). Aceeași tendință a fost observată și pentru substratul 2-octanol, valorile raportului enantiomeric fiind apropiate indiferent de metoda de imobilizare folosită. Aceste observații subliniază faptul că pentru maximizarea performanțelor biocatalitice pentru un anumit substrat trebuie optimizați toți parametrii care intervin în procesul de imobilizare (metoda de imobilizare, aditivul, silanii precursori etc.).

2.1.5. Influența mediului de reacție asupra activității lipazei din *Candida antarctica* B imobilizată prin entrapare în sol-gel

Cu toate că multe enzime funcționează bine în solvent organici, aceștia din urmă au dezavantajul că sunt dăunători pentru mediul înconjurător. Lichidele ionice sunt o posibilă soluție pentru înlocuirea solventilor organici volatili cu un mediu de reacție ecologic, deoarece sunt nevolatile, pot fi utilizate la temperaturi ridicate și pot fi reutilizate. Pe lângă avantajele legate de protecția mediului, s-au raportat de asemenea și îmbunătățiri ale vitezei de reacție, conversiei, enantioselectivității și regioselectivității [174]. Cu toate acestea, nu s-a reușit o corelare a structurii lichidelor ionice cu proprietățile lor de solvent și din acest motiv este necesară o selecție atentă a lichidului ionic potrivit pentru fiecare biocatalizator și aplicație.

În cadrul acestui studiu am investigat reacția de acilare enantioselectivă a 2-octanolului în solvenți organici și în diferite lichide ionice, folosind lipaza B din *Candida antarctica* imobilizată prin entrapare. Matricea sol-gel a fost obținută folosind un sistem ternar de silani precursori, PhTMOS, MeTMOS și TMOS la un raport molar de 1:1:1 și lichidul ionic [Omim]BF₄ ca aditiv (Metoda 1). Deoarece lichidele ionice folosite nu sunt miscibile cu *n*-hexanul, produsul de reacție a fost recuperat prin extracție repetată cu acest solvent. O astfel de procedură prezintă încă un avantaj, și anume posibilitatea de a recicla atât biocatalizatorul cât și lichidul ionic, deoarece acestea rămân în faza non-organică. Dezavantajul este că folosirea unui solvent organic invalidează natura ecologică a procesului.

Tabelul 2.16. Influența mediului de reacție asupra acilării 2-octanolului cu acetat de vinil, catalizată de lipaza B din *Candida antarctica* imobilizată prin entrapare în sol-gel cu precursorii PhTMOS:MTMOS:TMOS (raport molar 1:1:1) și [Omim]BF₄ ca aditiv.

Solvent	Conv. ¹ (%)	A _{trans} ² (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	e.e. (%)	E
[Emim]BF ₄	54	0,457	83	46
[Hmim]BF ₄	51	0,437	89	58
[Omim]BF ₄	51	0,440	93	114
[Bmim]PF ₆	47	0,402	86	30
[Emim]COOCF ₃	2	0,015	64	5
<i>tert</i> -butanol	48	0,402	95	113
acetonă	51	0,431	95	201
tetrahidrofuran	61	0,529	63	20
acetonitril	51	0,433	95	201
toluen	51	0,424	94	146
<i>izo</i> -octan	51	0,435	95	201
<i>n</i> -hexan	51	0,410	95	201

¹ la 24 h de reacție

² activitatea de transesterificare a 2-octanolului, la 24 h de reacție.

Lipaza CaLB entrapată în matrici sol-gel s-a dovedit a fi un catalizator excelent pentru reacția investigată, prezentând valori ridicate ale enantioselectivității în toți solvenții cu polaritate medie sau redusă testați. Această comportare este diferită de cea înregistrată anterior de grupul nostru pentru o altă lipază, cea din *Pseudomonas fluorescens*, care a prezentat o enantioselectivitate

mult mai scăzută în cazul acilării alcoolilor secundari iar solvenții testați au prezentat o influență puternică asupra proprietăților catalitice ale preparatelor testate [181]. În cazul lichidelor ionice, influența mediului de reacție a fost mult mai însemnată. Conversia a fost foarte redusă în [Emim]COOCF₃, singurul lichid ionic testat care este miscibil cu apa. Conversii mai ridicate în cazul reacțiilor de transesterificare catalizate de lipaze în lichide ionice nemiscibile cu apa au fost raportate și de către alți autori [186]. Ținând cont atât de activitate cât și de enantioselectivitate, lichidele ionice cu anioni de tip BF₄⁻ s-au dovedit a fi un mediu de reacție mai eficient decât [Bmim]PF₆. Din grupul lichidelor ionice cu acest tip de anion (BF₄⁻), cele mai bune rezultate au fost obținute atunci când în partea cationică este prezentă o grupare alchil mai hidrofobă (octil). Anterior, în cazul acilării 2-hexanolului cu lipaza din *Pseudomonas fluorescens* am obținut un efect invers al polarității lichidelor ionice [181]. Polaritățile lichidelor ionice testate sunt într-un domeniu restrâns, între 0,67-0,71 pe scala lui Reichardt [187] și am presupus că alte proprietăți, cum ar fi influența acestora asupra conformației active a lipazei și/sau miscibilitatea cu substratul și produșii de reacție sunt mai importante. Din acest motiv este greu de a anticipa comportarea ca solvenți a lichidelor ionice pe baza structurii lor și selectarea mediului de reacție potrivit trebuie să se bazeze strict pe date experimentale. În cazul reacției investigate, acilarea enantioselectivă a 2-octanolului, lichidul ionic care a dus la obținerea unor rezultate comparabile cu cele în solvenți organici tradiționali a fost [Omim]BF₄ [183].

2.1.6. Concluzii parțiale

Cunoașterea valorii optime a încărcării matricii cu proteină este esențială. În urma imobilizării, enantioselectivitatea biocatalizatorilor a fost excelentă comparativ cu lipaza nativă. Având în vedere atât activitatea enzimatică, raportul enantiomeric (E) cât și costul biocatalizatorului, se poate spune că valoarea optimă a încărcării cu enzimă a fost de 17,44. Biocatalizatorii testați în studiile ulterioare au fost obținuți cu o încărcare a matricii cu proteină de 17,44 mg la un gram de xerogel.

Reglarea fină a compoziției sistemului de silani precursori și a structurii lichidului ionic permite dezvoltarea unor biocatalizatori performanți pentru aplicații specifice. În cazul acilării enantioselective a 2-octanolului, protocolul de imobilizare cel mai eficient a implicat utilizarea unui sistem ternar de silani precursori, format din PhTMOS, MeTMOS și TMOS în raport echimolar și lichidul ionic [Omim]BF₄ ca aditiv.

Folosirea unui silan precursor cu grupări vinil nehidrolizabile a avut un efect pozitiv asupra proprietăților catalitice ale lipazei imobilizate. În cazul folosirii unui sistem binar de silani precursori s-a obținut o valoare mai ridicată a activității catalitice atunci când concentrația de grupări vinil în amestecul de silani a fost mai mare (raport molar 2:1).

Atunci când la imobilizare s-a folosit un sistem ternar de silani precursori s-au obținut valori și mai ridicate ale activității enzimatice. Eficiența catalitică exprimată prin randamentul de regăsire a activității enzimatice a fost mai ridicată la folosirea unui sistem ternar de silani precursori, la un raport molar de 1,6:0,4:1, ceea ce înseamnă că o concentrație mai mică a grupării vinil nehidrolizabile în matricea gelului este benefică.

În cazul testării biocatalizatorilor pe substratul 2-octanol, atât în cazul sistemelor binare cât și al celor ternare, s-a observat că o concentrație mai mare a radicalului vinil din precursorul silanic a avut un efect favorabil. În ceea ce privește

eficiența catalitică, se poate observa că s-au obținut valori excelente în cazul tuturor biocatalizatorilor testați, acestea fiind de 3 până la 6 ori mai mari decât în cazul lipazei native. În cazul preparatelor enzimatiche obținute cu sistem binar de silani, cele mai bune valori ale enantioselectivității s-au obținut la raportul molar de 2:1 al VTMOs:TMOS, pe când în cazul celor obținute cu sistem ternar de precursori, valoarea cea mai mare a raportului enantiomeric (E) a fost dată de preparatul obținut cu silanii precursori PhTMOS:VTMOs:TMOS la un raport molar de 0,4:1,6:1.

Pentru lipaza Amano AK din *Pseudomonas fluorescens* s-a optimizat cantitatea de lichid ionic utilizat ca aditiv la imobilizarea prin entrapare în sol-gel. Cele mai ridicate valori ale activității de transesterificare au fost obținute la un raport molar de 0,2 între lichidul ionic și silanii precursori. Enantioselectivitatea biocatalizatorilor obținuți nu a fost influențată semnificativ de cantitatea de lichid ionic, dar a fost ușor îmbunătățită comparativ cu lipaza nativă.

În cazul lipazei B din *Candida antarctica*, mai multe lichide ionice au fost testate ca aditivi de imobilizare la entraparea în matrici sol-gel. Este important de menționat faptul că performanțele lipazei imobilizate nu depind doar de aditiv, ci și de metoda de imobilizare și de substratul testat.

În cazul lichidelor ionice, influența mediului de reacție a fost mult mai importantă. Conversia a fost foarte redusă în [Emim]COOCF₃, singurul lichid ionic testat care este miscibil cu apa. Ținând cont atât de activitate cât și de enantioselectivitate, lichidele ionic cu anioni de tip BF₄⁻ s-au dovedit a fi un mediu de reacție mai eficient decât [Bmim]PF₆. Din grupul lichidelor ionice cu acest tip de anion (BF₄⁻), cele mai bune rezultate au fost obținute atunci când în partea cationică este prezentă o grupare alchil mai hidrofobă (octil). În cazul reacției investigate, acilarea enantioselectivă a 2-octanolului, lichidul ionic optim a fost [Omim]BF₄, care a dus la obținerea unor rezultate comparabile cu cele în solvenți organici tradiționali.

2.2. Imobilizarea prin entrapare în matrici de sol-gel combinată cu adsorbție a lipazelor microbiene

2.2.1. Optimizarea încărcării cu proteină

Studii anterioare au demonstrat că utilizând suporturi cu porozitate ridicată gelifierea a avut loc în interiorul porilor și activitatea a fost scăzută. Suporturile cu porozitate mai mică (Celite 545) au dus la formarea gelului doar în exteriorul suportului rezultând activități ridicate [188, 189].

În cadrul acestui studiu, au fost testate diferite încărcări cu lipază B din *Candida antarctica* pentru imobilizarea prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite 545, folosind ca silani precursori PhTMS, MeTMS și TMS în raport molar de 1,6:0,4:1 și lichidul ionic [Omim]BF₄ ca aditiv (Metoda 3). Reacțiile au fost efectuate în mediu de solvent organic la 40°C. Conform datelor de literatură, desfășurarea acestor reacții este recomandată să aibă loc într-un mediu de solvent cu un conținut cât mai mic de apă pentru a nu favoriza reacțiile de hidroliză, dar suficient pentru a menține conformația catalitic activă a lipazei. Evoluția reacțiilor a fost urmărită prin cromatografie de gaze folosind n-decan ca standard intern pentru analiza cantitativă. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 2.17.

Tabelul 2.17. Influența cantității de enzimă supusă imobilizării prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție, în cazul acilării 2-octanolului în *n*-hexan, după 6 ore de reacție

Încărcarea cu enzimă (mg proteină/g biocatalizator)	Conv. (%)	A _{trans} (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	η _{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	10	1,661	100	81	10
9,13	29	0,968	838	94	47
9,48	38	1,238	1027	95	70
10,72	39	1,328	910	95	73
11,68	37	1,215	694	95	68
13,98	33	1,081	580	94	51

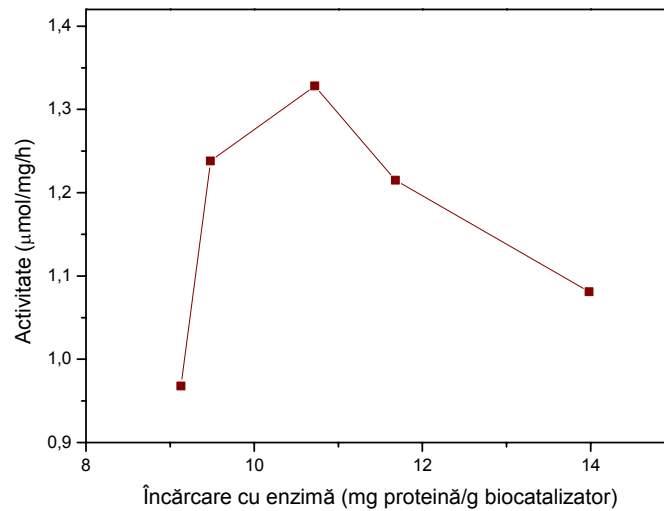


Figura 2.11. Influența cantității de enzimă asupra activității catalitice a lipazei CaLB imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție în reacția de acilare a 2-octanolului în *n*-hexan la 40°C, după 6 ore.

Așa cum se observă din Tabelul 2.17 și din Figura 2.11, cele mai bune valori ale activității s-au obținut atunci când la imobilizare s-a folosit o încărcare cu enzimă de 10,72 mg proteină față de cantitatea de preparat enzimatic obținut. Și în această situație randamentul de imobilizare este practic independent de concentrația de enzimă folosită la metoda de imobilizare combinată.

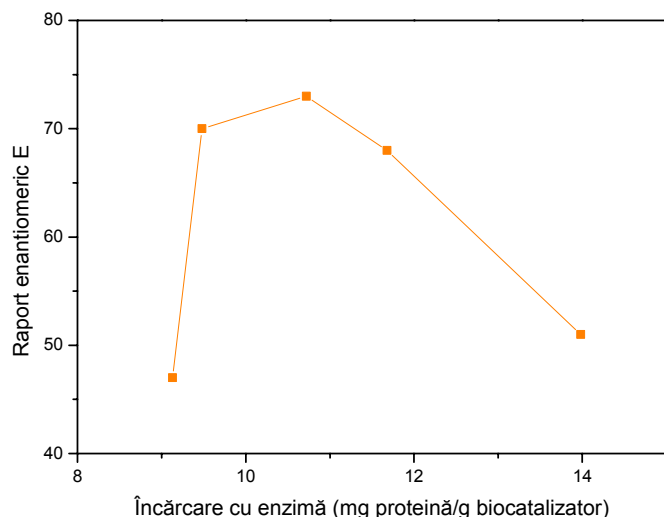


Figura 2.12. Influența cantității de enzimă asupra enantioselectivității lipazei B din *Candida antarctica* imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție în reacția de acilare a 2-octanolului în *n*-hexan la 40°C după 6 ore.

În ceea ce privește enantioselectivitatea preparatelor obținute, din Figura 2.12 se pot observa valori ridicate la încărcări cu proteină de 9,48, 10,72 și 11,68. Trebuie menționat că indiferent de valoarea încărcării cu enzimă, valorile raportului enantiomeric au fost superioare comparativ cu lipaza nativă. Ținând cont atât de activitatea enzimatică, raportul enantiomeric (E) cât și de costul biocatalizatorului, se poate spune că valoarea optimă a încărcării cu enzimă necesară la imobilizarea prin metoda sol-gel combinată cu adsorbție este de 10,72 mg proteină/g xerogel. Biocatalizatorii care au fost testați în studiile ulterioare au fost obținuți la o încărcare a matricii sol-gl cu 10,72 mg proteină/g preparat enzimatic [177].

2.2.2. Influența raportului silan-suport asupra eficienței catalitice

În cazul imobilizării prin entrapare în matrici sol-gel combinată cu adsorbție cantitatea și natura adsorbentului sunt determinante pentru proprietățile finale ale biocatalizatorului obținut. Din acest motiv, optimizarea cantității de suport introdus la dubla imobilizare este esențială. Utilizarea unui adsorbent face ca gelul care se formează să se depună pe suprafața acestuia, într-un strat mai mult sau mai puțin uniform, dar și în pori. Dacă acest strat depus este subțire și uniform, activitatea enzimei entrapate ar trebui să fie mai mare, deoarece rezistența la transferul de masă al reactantului spre centrul activ al enzimei ar trebui să fie mai mic. Din acest punct de vedere, creșterea cantității de suport în raport cu silanii ar trebui să aibă efect favorabil, până se ajunge la o concentrație mult prea mică de enzimă în matrice. Pe de altă parte, enzima entrapată în gelul care se poziționează în interiorul

porilor poate să devină inaccesibilă sau greu accesibilă pentru substrat, având ca rezultat reducerea activității enzimatică. Prin urmare și caracteristicile fizice ale suportului, ca suprafața specifică, diametrul porilor, hidrofobicitatea, etc. influențează proprietățile biocatalizatorului imobilizat.

În cadrul acestui studiu, lipaza Amano AK din *Pseudomonas fluorescens* a fost imobilizată prin entrapare combinată cu adsorbție pe Celite 545 (Metoda 3). Acest suport a fost selectat pe baza unor studii anterioare [190]. Matricea sol-gel a fost obținută folosind un sistem binar de silani precursori, OcTMOS și TMOS în raport molar de 1:1, lichidul ionic [Omim]BF₄ ca aditiv și adsorbentul Celite 545 în diferite cantități (0,5, 1 și 1,5 g), la aceeași cantitate de silani precursori. Biocatalizatorii au fost testați în reacțiile de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului și 2-octanolului cu acetat de vinil în mediu de solvent organic (*n*-hexan sau acetonă) la 40°C. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelele 2.18 și 2.19 [191].

Tabelul 2.18. Evaluare comparativă a eficienței catalitice și enantioselectivității lipazei Amano AK din *Pseudomonas fluorescens* nativă sau imobilizată în reacția de acilare a 2-hexanolului sau 2-octanolului în mediu de *n*-hexan.

Substrat	g Celite 545/mol silani precursori	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
2-hexanol	-	100	78	11
	83,3	227	67	16
	166,7	279	77	16
	250,0	257	84	17
2-octanol	-	100	53	5
	83,3	314	47	6
	166,7	447	51	5
	250,0	390	56	5

Tabelul 2.19. Evaluare comparativă a eficienței catalitice și enantioselectivității lipazei Amano AK din *Pseudomonas fluorescens* nativă sau imobilizată în reacția de acilare a 2-hexanolului sau 2-octanolului în mediu de acetonă.

Substrat	g Celite 545/mol silani precursori	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
2-hexanol	-	100	90	37
	83,3	128	93	76
	166,7	176	94	69
	250,0	172	96	73
2-octanol	-	100	73	11
	83,3	220	72	9
	166,7	259	78	11
	250,0	201	74	8

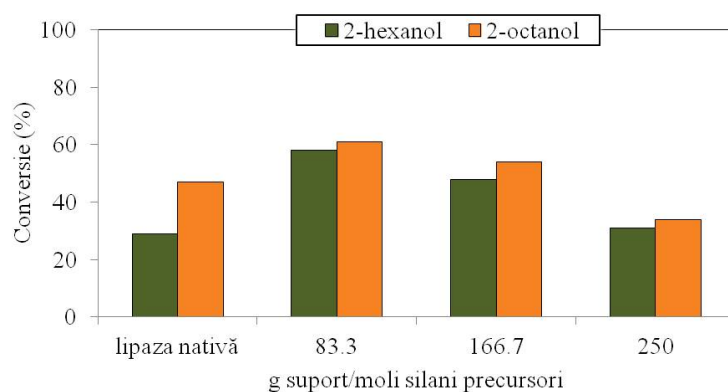


Figura 2.13. Influența raportului adsorbent/silani precursori asupra conversiei reacției de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului sau 2-octanolului în mediu de *n*-hexan catalizată de lipaza din *Pseudomonas fluorescens* imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite 545.

În urma imobilizării valorile conversiei au fost mai ridicate comparativ cu lipaza nativă indiferent de raportul dintre suport și silanii precursori. În cazul în care reacțiile au fost efectuate în mediu de solvent nepolar (*n*-hexan), valorile cele mai ridicate pentru conversie s-au obținut la acilarea 2-octanolului. Indiferent de substratul testat, raportul optim suport/silani precursori la care s-au înregistrat cele mai bune valori ale conversiei a fost de 83,3 (Figura 2.13).

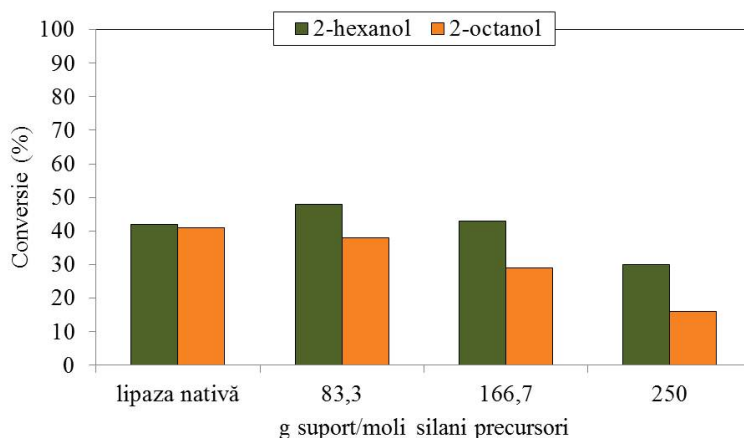


Figura 2.14. Influența raportului adsorbent/silani precursori asupra conversiei reacției de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului sau 2-octanolului în mediu de acetone catalizată de lipaza din *Pseudomonas fluorescens* imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite 545.

Atunci când reacțiile au fost efectuate într-un mediu de reacție polar (acetona), s-a obținut o ușoară scădere a conversiei. În această situație, a fost avantajată reacția de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului. Din Figura 2.14 se poate observa scăderea conversiei o dată cu creșterea raportului suport/silani precursori. Astfel, și în acest caz valoarea optimă a raportului a fost 83,3, de aceea în studiile ulterioare a fost utilizat acest raport între adsorbent și silanii precursori.

2.2.3. Influența silanilor precursori asupra eficienței catalitice a lipazelor microbiene dublu imobilizate

Combinând adsorbția cu entraparea în sol-gel se obține o tehnică de imobilizare care permite utilizarea avantajelor ambelor metode. Entraparea combinată cu depunere pe suport se poate realiza prin amestecarea complexului proteină-macromer format în faza inițială a gelifierii cu suportul solid (de obicei anorganic). Suprafața specifică mare a suportului determină o repartitie uniformă, fără agregare, a enzimei entrapate în sol-gel, iar aceasta conferă stabilitate ridicată și proprietăți îmbunătățite preparatului enzimatic imobilizat obținut în final. Aceste caracteristici pot contribui și la stabilizarea enzimei împotriva inactivării termice datorate depliei proteinei.

Acest studiu a urmărit obținerea de preparate enzimatice cu lipaze din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK), *Burkholderia cepacia* (Amano PS) și *Candida antarctica* B (C-Lecta) imobilizate prin metoda combinată, cu caracteristici de activitate și enantioselectivitate superioare.

Metoda de imobilizare folosită a fost entraparea în sol-gel combinată cu adsorbție pe un suport solid (Celite 545) conform Metodei 3, utilizând un sistem ternar de precursori metoxisilanici: un aril-trimetoxisilan PhTMOS, un alchil-trimetoxisilan MeTMOS și tetrametoxisilan TMOS în rapoarte molare de 1:1:1, 1,6:0,4:1 și 0,4:1,6:1. Ca și aditiv s-a folosit polietilenglicol PEG sau lichid ionic ([Omim]BF₄ sau [Emim]BF₄).

Preparatele enzimatice obținute au fost testate în reacția de acilare a 2-octanolului cu acetat de vinil în mediu de *n*-hexan la 40°C.

Pe baza analizelor cromatografice după 24 h de reacție s-au calculat pentru fiecare preparat activitatea de transesterificare, randamentul de regăsire a activității enzimatice, excesul enantiomeric al (*R*)-esterului (e.e.) și raportul enantiomeric (E), iar rezultatele sunt prezentate în tabelele 2.20., 2.21. și 2.22.

Tabelul 2.20. Influența compoziției sistemului ternar de silani precursori asupra eficienței catalitice a lipazei Amano AK imobilizate prin metoda combinată, în reacția de acilare a 2-octanolului.

Silani precursori (raport molar)	Aditiv	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	-	47	1,910	53	5
PhTMOS:MeTMOS:TMOS 1:1:1	PEG	48	0,400	55	6
	[Omim]BF ₄	37	0,304	58	4
	[Emim]BF ₄	2	0,015	27	2
PhTMOS:MeTMOS:TMOS 1,6:0,4:1	PEG	68	0,569	42	7
	[Omim]BF ₄	36	0,295	57	5
	[Emim]BF ₄	15	0,131	55	4
PhTMOS:MeTMOS:TMOS 0,4:1,6:1	PEG	43	0,359	51	4
	[Omim]BF ₄	10	0,082	42	3
	[Emim]BF ₄	3	0,025	16	1

Tabelul 2.21. Influența compoziției sistemului ternar de silani precursori asupra eficienței catalitice a lipazei Amano PS imobilizate prin metoda combinată, în reacția de acilare a 2-octanolului.

Silani precursori (raport molar)	Aditiv	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	-	23	0,953	74	8
PhTMOS:MeTMOS:TMOS 1:1:1	PEG	48	0,420	76	15
	[Omim]BF ₄	29	0,246	76	10
	[Emim]BF ₄	27	0,233	76	10
PhTMOS:MeTMOS:TMOS 1,6:0,4:1	PEG	44	0,380	76	13
	[Omim]BF ₄	40	0,341	75	11
	[Emim]BF ₄	47	0,421	76	15
PhTMOS:MeTMOS:TMOS 0,4:1,6:1	PEG	40	0,337	77	13
	[Omim]BF ₄	9	0,076	62	5
	[Emim]BF ₄	12	0,100	69	6

Tabelul 2.22. Influența compoziției sistemului ternar de silani precursori asupra eficienței catalitice a lipazei C-Lecta imobilizate prin metoda combinată, în reacția de acilare a 2-octanolului.

Silani precursori (raport molar)	Aditiv	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	-	17	0,705	89	21
PhTMOS:MeTMOS:TMOS 1:1:1	PEG	52	0,434	91	104
	[Omim]BF ₄	51	0,427	95	201
	[Emim]BF ₄	51	0,426	95	201
PhTMOS:MeTMOS:TMOS 1,6:0,4:1	PEG	52	0,438	91	104
	[Omim]BF ₄	51	0,434	95	201
	[Emim]BF ₄	51	0,431	93	114
PhTMOS:MeTMOS:TMOS 0,4:1,6:1	PEG	51	0,446	94	146
	[Omim]BF ₄	51	0,418	96	380
	[Emim]BF ₄	47	0,394	95	104

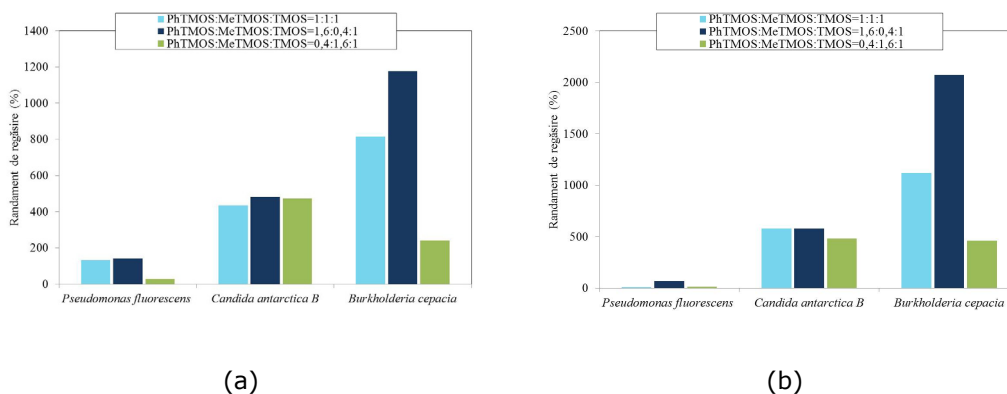


Figura 2.15. Dependența eficienței imobilizării de raportul molar al silanilor precursori, de aditivul de imobilizare (a) [Omim]BF₄ sau (b) [Emim]BF₄ și de tipul biocatalizatorului utilizat la acilarea 2-octanolului în mediu de *n*-hexan.

Pe baza rezultatelor din tabellele 2.20-2.22 s-au calculat randamentele de regăsiere a activității totale pentru cele trei lipaze dublu imobilizate, care sunt prezentate în Figurile 2.15a și 2.15b pentru imobilizările realizate în prezența lichidelor ionice [Omim]BF₄ și respectiv [Emim]BF₄. Se poate observa că după imobilizare activitatea totală a fost mai mare la lipaza din *Burkholderia cepacia*, de până la 8 ori mai mare decât a celorlalte lipaze imobilizate. Lipaza din *Candida antarctica* a prezentat valori ridicate ale randamentului de regăsiere a activității, iar cea din *Pseudomonas fluorescens* a dat valorile cele mai mici. Folosind un raport molar al precursorilor silanici de 1,6:0,4:1 s-au obținut cele mai bune valori ale activității totale. Atunci când s-a folosit lichidul ionic [Emim]BF₄ ca aditiv de modelare a structurii gelului (Figura 2.15b), pentru toate preparatele enzimatic obținute valorile randamentului de regăsiere au fost aproape duble comparativ cu imobilizarea în prezența lui [Omim]BF₄.

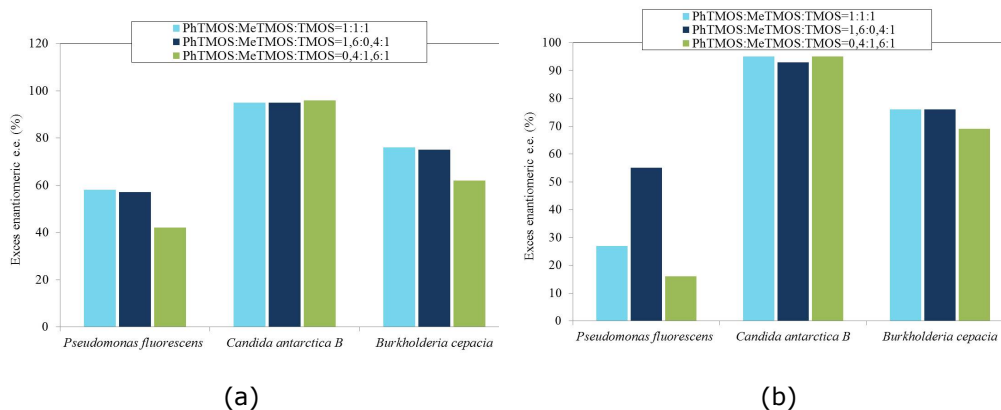


Figura 2.16. Dependența excesului enantiomeric de raportul molar al silanilor precursori, de aditivul de imobilizare (a) [Omim]BF₄ sau (b) [Emim]BF₄ și de tipul biocatalizatorului utilizat la acilarea 2-octanolului în mediu de *n*-hexan.

În Figurile 2.16a și 2.16b sunt prezentate valorile excesului enantiomeric e.e. pentru aceleași preparate. Se poate observa că la acilarea 2-octanolului cu preparatele obținute prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite 545 a lipazei din *Candida antarctica* s-au obținut valorile cele mai mari ale lui e.e. (95%). Indiferent de aditivul de imobilizare folosit și de raportul molar al silanilor precursori, nu se observă o diferență semnificativă a enantioselectivității lipazelor imobilizate, cu excepția lipazei din *Pseudomonas fluorescens*, care a avut valori mai bune la utilizarea lui [Omim]BF₄ ca aditiv (Figura 2.16a). La un raport echimolar al celor trei precursori silanici s-au obținut cele mai bune valori ale enantioselectivității pentru toate preparatele enzimatic obținute.

2.2.4. Influența naturii adsorbentului asupra eficienței catalitice

Enzimele imobilizate prin entrapare în sol-gel prezintă multe avantaje, dintre care cel mai important este stabilitatea operațională. Cu toate acestea, pot apărea unele limitări datorită transferului de masă necorespunzător prin matricea rețelei tridimensionale. Prin depunerea biocatalizatorului entrapat pe un material solid se poate obține o nouă tehnică de imobilizare, care are ca efect creșterea eficienței catalitice și a stabilității termice. Entraparea combinată cu adsorbția pe un adsorbent se poate realiza prin amestecarea complexului format în faza inițială a gelifierii cu suportul solid (de obicei anorganic).

Proprietățile biocatalitice ale lipazelor imobilizate prin entrapare în matrice de sol-gel sunt puternic influențate de natura și concentrația grupelor aril sau alchil nehidrolizabile ale silanilor precursori (PhTMOS și MeTMOS) folosite în combinație cu TMOS. Studii anterioare au demonstrat că cele mai bune rezultate în ceea ce privește activitatea catalitică și enantioselectivitatea lipazei din *Candida antarctica* B imobilizate, folosind amestecuri ternare ale acestor silani precursori, au fost obținute la un raport de 1,6:0,4:1 [191].

S-au folosit două metode de imobilizare (3 și 4). În cazul metodei 3 s-au folosit 6 mmoli de silani precursori și un catalizator nucleofil, iar pentru metoda 4 s-au utilizat 3 mmoli de silani și un catalizator acid.

Metoda de imobilizare folosită a fost entraparea în sol-gel combinată cu adsorbție pe diferite suporturi solide (Celite 545, Celite 521, Celite C22, CaCO₃, Purolite MN200, Celuloză Avicel), conform metodei de lucru prezentată anterior (Metoda 3), utilizând un sistem ternar de precursori metoxisilanici: un aril-trimetoxisilan PhTMOs, un alchil-trimetoxisilan MeTMOs și tetrametoxisilan TMOs, iar ca aditiv de imobilizare s-a folosit lichidul ionic [Omim]BF₄. Preparatele enzimatică obținute au fost testate în rezoluția cinetică a seriei de alcooli secundari alifatici (de la 2-pentanol la 2-nonanol) în mediu de *n*-hexan la 40°C.

Pe baza analizelor cromatografice după 24 ore de reacție s-au calculat pentru fiecare preparat activitatea de transesterificare, randamentul de regăsire a activității enzimatică, excesul enantiomeric al (R)-esterului (e.e.) și raportul enantiomeric (E), iar rezultatele sunt prezentate în tabelele 2.23-2.27.

Tabelul 2.23. Acilarea enantioselectivă a 2-pentanolului în mediu de *n*-hexan prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei CalB, folosind diferite suporturi

Suport	Conv. (%)	A _{trans} (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	η _{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	25	0,961	-	99	277
Celite 545	52	0,288	335	89	69
Celite 521	53	0,263	302	88	86
Celite C22	54	0,283	330	85	82
CaCO ₃	54	0,284	307	85	82
Purolite MN200	55	0,286	246	81	49
Celuloză AVICEL	48	0,251	268	96	146

Tabelul 2.24. Acilarea enantioselectivă a 2-hexanolului în mediu de *n*-hexan prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei CalB, folosind diferite suporturi

Suport	Conv. (%)	A _{trans} (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	η _{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	20	0,852	-	93	35
Celite 545	46	0,304	398	97	170
Celite 521	46	0,309	401	96	125
Celite C22	46	0,301	395	96	125
CaCO ₃	47	0,313	408	96	134
Purolite MN200	47	0,311	323	95	104
Celuloză AVICEL	46	0,302	389	96	125

Tabelul 2.25. Acilarea enantioselectivă a 2-heptanolului în mediu de *n*-hexan prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei CalB, folosind diferite suporturi

Suport	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	20	0,813	-	98	125
Celite 545	50	0,369	507	98	458
Celite 521	50	0,385	523	98	458
Celite C22	50	0,378	521	97	278
CaCO ₃	50	0,378	506	97	278
Purolite MN200	50	0,370	395	98	458
Celuloză AVICEL	45	0,339	450	99	501

Tabelul 2.26. Acilarea enantioselectivă a 2-octanolului în mediu de *n*-hexan prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei CalB, folosind diferite suporturi

Suport	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	20	0,842	-	89	21
Celite 545	51	0,433	574	95	201
Celite 521	51	0,432	566	95	201
Celite C22	51	0,441	586	95	201
CaCO ₃	51	0,435	574	95	201
Purolite MN200	51	0,431	453	95	201
Celuloză AVICEL	47	0,395	516	95	104

Tabelul 2.27. Acilarea enantioselectivă a 2-nonanolului în mediu de *n*-hexan prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei CalB, folosind diferite suporturi

Suport	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	16	0,651	-	99	238
Celite 545	50	0,453	777	98	458
Celite 521	50	0,463	786	98	458
Celite C22	50	0,455	783	97	278
CaCO ₃	50	0,443	758	98	458
Purolite MN200	50	0,470	642	97	278
Celuloză AVICEL	50	0,498	843	99	1057

Așa cum se poate observa, în urma imobilizării, pentru toți alcoolii studiați (cu excepția 2-pentanolului), s-a obținut o creștere însemnată a raportului enantiomeric E comparativ cu enzima nativă (valori cuprinse între 49 și 1100). Cele mai bune valori s-au obținut atunci când cele șase preparate enzimaticе au fost testate pe substraturile 2-heptanol și 2-nonanol. Indiferent de tipul adsorbentului

folosit, în cazul 2-pentanului s-a observat o scădere a raportului enantiomeric E comparativ cu enzima nativă, motiv pentru care rezoluția cinetică a acestui substrat va fi optimizată folosind diferite medii de reacție.

Pe baza tabelor 2.23-2.27 s-a realizat graficul din Figura 2.17, care reprezintă influența tipului de adsorbent folosit pentru dubla imobilizare a lipazei CaLB asupra randamentului total de regăsire a activității enzimaticice.

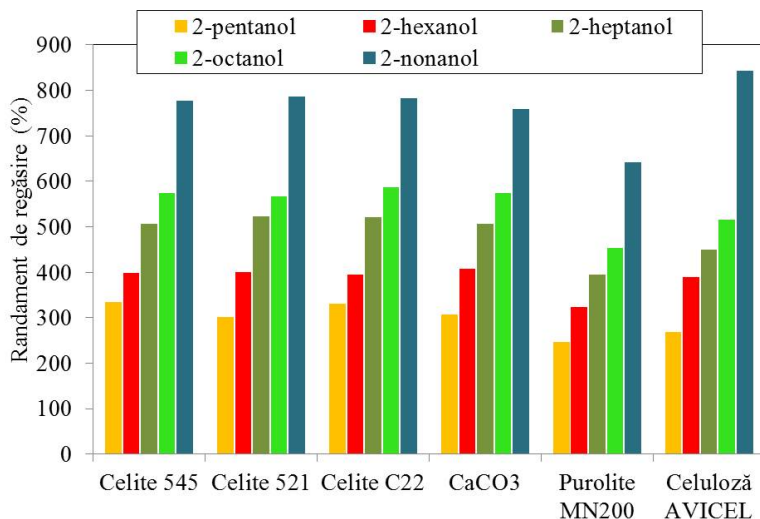


Figura 2.17. Influența adsorbentului asupra eficienței catalitice a preparatelor enzimaticice dublu imobilizate folosite ca biocatalizatori în rezoluția cinetică a alcoolilor secundari în mediu de *n*-hexan, la 40°C.

Așa cum se poate observa din Figura 2.17, valorile randamentului de regăsire au fost excelente pentru toți biocatalizatorii testați (între 250 și 850%). Pentru fiecare preparat enzimatic testat se observă o creștere a randamentului de regăsire de la 2-pentanol la 2-nonanol, fără ca natura adsorbentului să fi avut o influență semnificativă asupra activității catalitice a biocatalizatorilor obținuți. Prin urmare, adsorbentul îndeplinește doar rol de suport, fără a interveni în procesul catalitic, iar selecția sa trebuie realizată în funcție de stabilitatea biocatalizatorului obținut.

A fost studiată influența naturii adsorbentului asupra biocatalizatorilor imobilizați prin entrapare combinată cu adsorbție (Metoda 4). Și în acest caz, preparatele enzimaticice obținute au fost testate în rezoluția cinetică a seriei de alcooli secundari alifatici liniari C₅-C₉, în mediu de *n*-hexan la 40°C.

Tabelul 2.28. Acilarea enantioselectivă a 2-pentanolului în mediu de *n*-hexan prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei CalB

Suport	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	25	0,961	99	277
Celite 545	51	0,278	93	114
Celite 521	50	0,266	90	58
Celite C22	50	0,266	92	79
CaCO ₃	54	0,281	83	46
Purolite MN200	54	0,280	84	56
Celuloză AVICEL	41	0,210	99	412

Tabelul 2.29. Acilarea enantioselectivă a 2-hexanolului în mediu de *n*-hexan prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei CalB

Suport	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	20	0,852	93	35
Celite 545	46	0,298	96	125
Celite 521	47	0,301	96	134
Celite C22	48	0,308	96	146
CaCO ₃	51	0,328	96	380
Purolite MN200	48	0,307	95	113
Celuloză AVICEL	31	0,204	94	49

Tabelul 2.30. Acilarea enantioselectivă a 2-heptanolului în mediu de *n*-hexan prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei CalB

Suport	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	20	0,813	98	125
Celite 545	50	0,372	99	1057
Celite 521	50	0,372	97	278
Celite C22	50	0,367	98	458
CaCO ₃	50	0,387	97	278
Purolite MN200	50	0,386	98	458
Celuloză AVICEL	29	0,228	99	296

Tabelul 2.31. Acilarea enantioselectivă a 2-octanolului în mediu de *n*-hexan prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei CalB

Suport	Conv. (%)	A_{trans} (μmol·h⁻¹·mg⁻¹)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	20	0,842	89	21
Celite 545	49	0,448	95	125
Celite 521	51	0,433	95	201
Celite C22	51	0,429	95	201
CaCO ₃	51	0,429	95	201
Purolite MN200	51	0,441	96	380
Celuloză AVICEL	26	0,220	93	38

Tabelul 2.32. Acilarea enantioselectivă a 2-nonanolului în mediu de *n*-hexan prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei CalB

Suport	Conv. (%)	A_{trans} (μmol·h⁻¹·mg⁻¹)	e.e. (%)	E
Lipaza nativă (control)	16	0,651	99	238
Celite 545	50	0,412	99	1057
Celite 521	50	0,400	98	458
Celite C22	50	0,419	98	458
CaCO ₃	50	0,447	98	458
Purolite MN200	50	0,456	99	1057
Celuloză AVICEL	27	0,253	99	285

Așa cum se poate observa din datele prezentate în Tabelele 2.28-2.32, în urma imobilizării s-a obținut pentru toate substraturile testate (cu excepția 2-pentanolului) o creștere însemnată a raportului enantiomeric E (valori cuprinse între 200 și 1100), creștere de până la 18 ori comparativ cu lipaza nativă. Cele mai mari valori ale lui E s-au obținut atunci când Celite 545 și Purolite MN 200 au fost folosite ca adsorbenți la dubla imobilizare a lipazei CalB. În cazul substratului 2-pentanol, cu excepția celulozei, adsorbantii folosiți au determinat scăderea enantioselectivității lipazei imobilizate, comparativ cu cea nativă.

Pe baza datelor din tabelele 2.28-2.32 s-a realizat graficul din Figura 2.18, care reprezintă influența naturii adsorbentului folosit pentru dubla imobilizare a lipazei B din *Candida antarctica* asupra proprietăților catalitice.

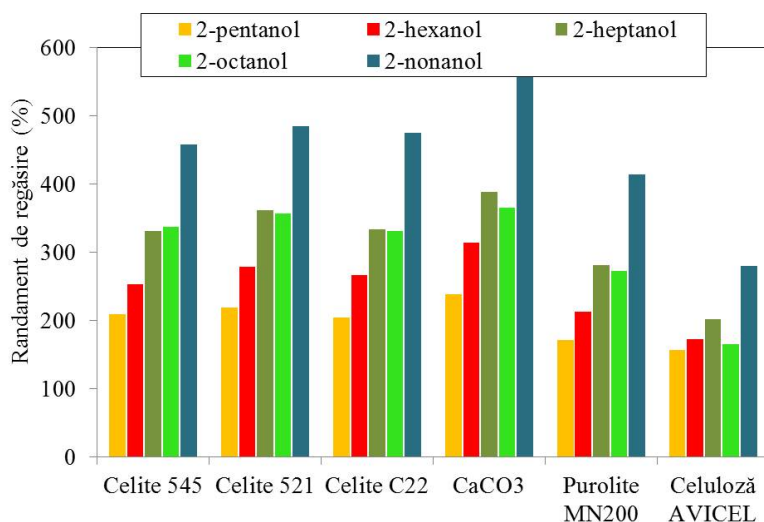


Figura 2.18. Influența adsorbentului asupra eficienței catalitice a preparatelor enzimice dublu imobilizate folosite ca biocatalizatori în rezoluția cinetică a alcoolilor secundari în mediu de *n*-hexan, la 40°C.

Așa cum se poate observa din Figura 2.18, valorile randamentului de regăsire – parametru care caracterizează eficiența catalitică a preparatelor obținute, au fost excelente (între 160 și 560%) pentru toți biocatalizatorii testați. Lipaza imobilizată pe suport de celuloză a determinat obținerea unor conversii mai scăzute după 24 de ore de reacție, având drept consecință valori mai scăzute și pentru ceilalți parametri ai eficienței catalitice. Pentru toate substraturile testate, cele mai ridicate valori ale randamentului de regăsire a activității enzimice au fost obținute atunci când la dubla imobilizare a lipazei din *Candida antarctica* B s-a folosit CaCO₃ ca și adsorbent [190]. Indiferent de adsorbentul folosit, se observă o creștere a randamentului de regăsire de la 2-pentanol la 2-heptanol, apoi doar o ușoară creștere sau chiar o scădere pentru 2-octanol și apoi o creștere pronunțată în cazul 2-nonanolului.

Indiferent de tehnica folosită pentru obținerea biocatalizatorilor s-a observat aceeași tendință, astfel putând concluziona că adsorbentul nu are o influență majoră asupra proprietăților catalitice ale lipazelor imobilizate. Atunci când a fost folosită Metoda 4, valorile randamentului de regăsire a activității enzimice au fost puțin mai scăzute.

2.2.5. Lichide ionice – aditivi la dubla imobilizare a lipazei B din *Candida antarctica*

În cadrul acestui studiu s-a urmărit influența utilizării lichidelor ionice ca aditivi asupra eficienței catalitice a lipazei din *Candida antarctica* B, imobilizate prin metoda combinată. Și pentru acest studiu s-au obținut preparate cu lipaza CaLB conform celor două metode descrise anterior, Metoda 3 și Metoda 4.

Preparatele obținute au fost testate în reacția de acilare enantioselectivă a doi alcooli secundari (2-hexanol și 2-octanol), în mediu de *n*-hexan. Parametrii procesului de imobilizare au fost cei stabiliți în urma studiilor anterioare. Matricea sol-gel a fost obținută pe baza unui amestec ternar de silani precursori PhTMOS, MeTMOS și TMOS, la un raport molar de 1,6:0,4:1, iar ca adsorbent s-a folosit Celite 545 (Metoda 3). Ca și aditivi s-au testat mai multe lichide ionice: [Emim]BF₄, [Hmim]BF₄, [Omim]BF₄, [Bmim]PF₆, [Emim]COOCH₃, [Emim]COOCF₃ și [Bmim]Tf₂N. Rezultatele obținute în urma reacțiilor de acilare după 24 de ore sunt prezentate în Tabelele 2.33 și 2.34 [192].

Tabelul 2.33. Influența lichidelor ionice utilizate ca aditivi la imobilizarea lipazei din *Candida antarctica* B asupra eficienței catalitice în cazul acilării enantioselective a 2-hexanolului în *n*-hexan.

Aditiv	Conv. (%)	A ^{trans} (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	η _{reg} (%)	e.e. (%)
Lipaza nativă (control)	20	0,852	100	93
[Emim]BF ₄	49	0,411	528	96
[Hmim]BF ₄	47	0,402	501	96
[Omim]BF ₄	46	0,304	398	97
[Bmim]PF ₆	51	0,432	529	96
[Emim]COOCH ₃	49	0,417	516	94
[Emim]COOCF ₃	48	0,396	477	95
[Bmim]Tf ₂ N	49	0,413	504	95

Așa cum se poate observa din Tabelul 2.33, în cazul preparatelor imobilizate s-au obținut valori ale randamentului și ale enantioselectivității mai mari comparativ cu lipaza nativă.

Lichidele cu același anion, tetrafluoroborat, au dus la activități ridicate ale preparatelor imobilizate odată cu scăderea lanțului alchil din partea cationică.

În ceea ce privește lichidele ionice cu același cation, [Emim], prezența în partea anionică a unor substituenți mai voluminoși (trifluoroacetat, acetat), a dus la scăderea randamentului de regăsire a activității și a enantioselectivității preparatelor enzimatiche obținute.

Pentru acilarea 2-hexanolului, lichidul ionic cu cele mai bune rezultate ca și aditiv de imobilizare a fost [Bmim]PF₆, cu o creștere de peste 5 ori a activității totale relative a preparatului obținut față de lipaza nativă și cu o valoare de 380 a raportului enantiomeric E.

Tabelul 2.34. Influența lichidelor ionice utilizate ca aditivi la imobilizarea lipazei din *Candida antarctica* B asupra eficienței catalitice în cazul acilării enantioselective a 2-octanolului în *n*-hexan.

Aditiv	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	η_{reg} %	e.e. %
Lipază nativă (control)	20	0,842	100	89
[Emim]BF ₄	51	0,433	563	94
[Hmim]BF ₄	51	0,434	547	95
[Omim]BF ₄	51	0,434	482	95
[Bmim]PF ₆	51	0,459	569	95
[Emim]COOCH ₃	51	0,465	582	94
[Emim]COOCF ₃	51	0,437	533	95
[Bmim]Tf ₂ N	51	0,420	518	95

Se observă că în cazul acilării 2-octanolului (Tabelul 2.34), s-au obținut valori mai bune ale activității enzimatică decât în cazul 2-hexanolului și nu s-au observat diferențe semnificative în funcție de natura lichidelor ionice testate. Preparatul cu cea mai mare valoare a activității a fost cel obținut cu lichidul ionic [Emim]COOCH₃, cu o creștere de peste 5 ori a activității totale relative față de lipaza nativă.

Pe baza datelor din Tabelul 2.33. și 2.34. s-au calculat valorile raportului enantiomeric E, care sunt prezentate în diagrama din Figura 2.19, în funcție de natura lichidului ionic utilizat ca aditiv la imobilizare.

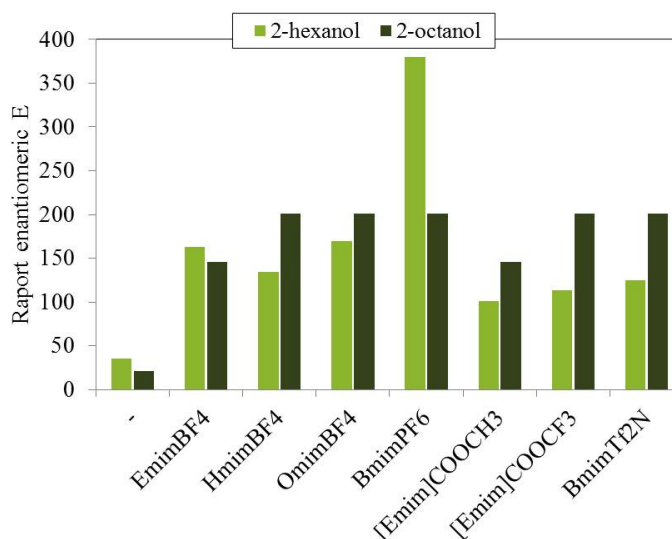


Figura 2.19. Influența lichidului ionic utilizat ca aditiv asupra enantioselectivității biocatalizatorilor în reacțiile de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului și 2-octanolului.

Prin utilizarea lichidelor ionice ca aditivi de imobilizare s-au obținut enantioselectivități excelente pentru rezoluția cinetică a ambelor substraturi investigate, rezultând valori ale raportului enantiomeric E mai mari decât 100 pentru toate preparatele, mult mai mari decât în cazul lipazei native.

Ținând cont atât de enantioselectivitate cât și de activitatea catalitică, în cazul ambelor substraturi testate, lichidul ionic cu cele mai bune rezultate a fost [Bmim]PF₆ (Tabelul 2.33, Tabelul 2.34 și Figura 2.19).

Același studiu privind influența lichidelor ionice ca aditivi a fost repetat și pentru preparatele cu lipază CaLB obținute cu Metoda 4, cu sol prepolimer obținut prin cataliză cu HCl. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelele 2.35 și 2.36.

Tabelul 2.35. Influența lichidelor ionice ca aditivi la imobilizarea prin metoda combinată a lipazei CalB asupra eficienței catalitice în cazul acilării enantioselective a 2-hexanolului.

Aditiv	Conv. (%)	A ^{trans} (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	η ^{reg} (%)	e.e. (%)	E
Enzima nativă (control)	20	0,852	100	93	35
[Emim]BF ₄	48	0,423	350	97	201
[Hmim]BF ₄	46	0,401	313	97	170
[Omim]BF ₄	46	0,386	328	97	170
[Bmim]PF ₆	47	0,405	321	97	183
[Emim]COOCH ₃	50	0,406	315	93	94
[Emim]COOCF ₃	47	0,394	305	95	104
[Bmim]Tf ₂ N	49	0,402	312	96	163

Așa cum se poate observa din tabelul 2.35, în cazul preparatelor imobilizate s-au obținut valori ridicate ale randamentului și ale enantioselectivității.

Lichidele ionice cu același anion, tetrafluoroborat, au dus la activități ridicate ale preparatelor imobilizate odată cu scăderea lanțului alchil din partea cationică.

În ceea ce privește lichidele ionice cu același cation, [Emim], prezența în partea anionică a unor substituenți mai voluminoși (trifluoroacetat, acetat), a dus la scăderea activității și a enantioselectivității preparatelor enzimatiche obținute. Conform unor date din literatură, lichidele ionice cu anionul BF₄⁻ pot fi folosite ca și materiale șablon pentru obținerea nanostructurilor mezoporoase, în care legăturile de hidrogen dintre BF₄⁻ și grupările silanol din gelul de silice precum și interacțiunile dintre grupările imidazol vecine au un rol important în formarea structurii rețelei [193].

Pentru acilarea 2-hexanolului, lichidul ionic cu cele mai bune rezultate ca și aditiv de imobilizare a fost [Emim]BF₄, cu o creștere de peste 3 ori a activității totale relative față de lipaza nativă și cu o valoare de 201 a raportului enantiomeric.

Tabelul 2.36. Influența lichidelor ionice ca aditivi la imobilizarea prin metoda combinată a lipazei CalB asupra eficienței catalitice în cazul acilării enantioselective 2-octanolului.

Aditiv	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	η_{reg} (%)	e.e. (%)	E
Lipază nativă (control)	20	0,842	-	89	21
[Emim]BF ₄	51	0,441	369	95	201
[Hmim]BF ₄	51	0,423	334	96	380
[Omim]BF ₄	49	0,448	338	95	125
[Bmim]PF ₆	51	0,443	355	95	201
[Emim]COOCH ₃	52	0,451	354	92	152
[Emim]COOCF ₃	51	0,442	346	94	146
[Bmim]Tf ₂ N	51	0,438	345	201	

În cazul acilării 2-octanolului (Tabelul 2.36) s-au obținut valori mai ridicate ale activității enzimatică, cu foarte mici diferențe în funcție între natura lichidelor ionice utilizate. Deoarece valorile au fost aproape aceleași și în cazul preparatelor obținute cu Metoda 3, se poate trage concluzia că lichidele ionice cu cation de imidazoliu au efect favorabil în cursul procesului de imobilizare prin metoda combinată de entrapare în sol-gel și adsorbție, dar nu modifică conformația enzimei, chiar dacă rămân parțial înglobate în matricea rezultată. De asemenea, pot contribui la creșterea stabilității enzimei.

Pe baza datelor din Tabelul 2.35 și 2.36 s-a reprezentat grafic variația enantioselectivității în funcție de natura lichidului ionic utilizat ca aditiv la imobilizare (Figura 2.20).

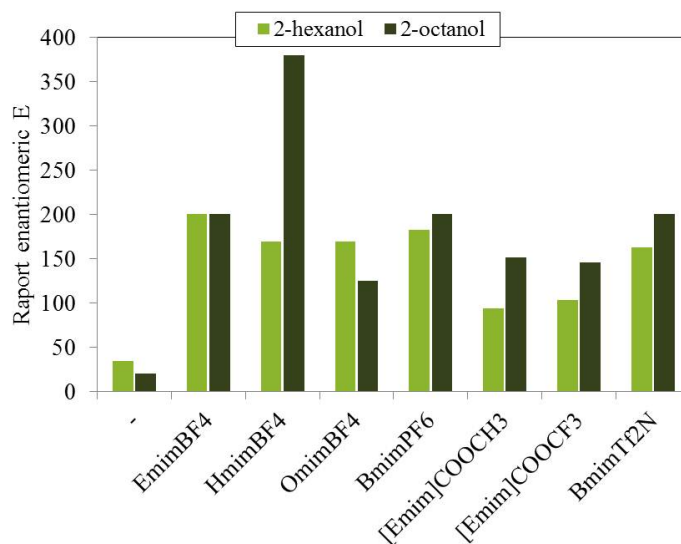


Figura 2.20. Influența lichidului ionic utilizat ca aditiv asupra enantioselectivității biocatalizatorilor în reacțiile de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului și 2-octanolului.

Prin utilizarea lichidelor ionice ca aditivi la dubla imobilizare s-au obținut valori excelente ale enantioselectivității (comparativ cu enzima nativă) în reacțiile de acilare a 2-hexanolului respectiv a 2-octanolului, valorile lui E fiind cuprinse între 94 și 380. Valorile ridicate ale enantioselectivității arată că această proprietate foarte importantă a lipazei este îmbunătățită prin imobilizarea cu metoda combinată și folosirea unui lichid ionic ca aditiv. Faptul că natura lichidului ionic cu cation imidazolic nu influențează enantioselectivitatea face posibilă alegerea sa pe baza unor criterii legate de costul biocatalizatorului și stabilitatea sa în condițiile utilizării preconizate.

Privind comparativ cele două metode de imobilizare studiate, se poate observa că valorile raportului enantiomeric au fost similare, cu două excepții. În cazul în care s-a folosit metoda 3, valoarea cea mai ridicată a lui E pentru acilarea 2-hexanolului s-a obținut pentru lichidul ionic [Bmim]PF₆. Atunci când biocatalizatorii au fost sintetizați conform metodei 4, cea mai ridicată valoare a lui E s-a înregistrat pentru acilarea 2-octanolului cu lipaza CaLB dublu imobilizată în prezența aditivului [Hmim]BF₄.

2.2.6. Influența mediului de reacție asupra enantioselectivității lipazei din *Candida antarctica* B imobilizată prin metoda combinată

În general, prin imobilizare se poate realiza îmbunătățirea stabilității enzimei, nu și a enantioselectivității. Lipazele reprezintă totuși un caz particular din acest punct de vedere, deoarece având un „capac” hidrofob care obturează accesul substratului la centrul activ, existența unor interacțiuni nepolare cu suportul poate avea ca efect deplasarea acestuia și creșterea activității. S-a demonstrat în studiile anterioare că enantioselectivitatea lipazei dublu imobilizate a fost mai mare decât a celei native, pentru majoritatea substraturilor studiate. Singura excepție a reprezentat-o 2-pentanolul, care poate fi explicată, pe baza regulii Kazlauskas, de diferența mică de dimensiuni între cei doi substituenți alchil legați de atomul de carbon asimetric. În Figura 2.21, realizată pe baza datelor din Tabelul 2.28, este prezentată influența naturii substratului asupra enantioselectivității preparatului enzimatic obținut prin dublă imobilizare cu PhTMOS:MeTMOS:TMOS=1,6:0,4:1, [Omim]BF₄ ca aditiv și Purolite MN200 ca adsorbent (conform Metodei 3). Pentru alcoolii din seria de la 2-hexanol până la 2-nonanol s-a observat o îmbunătățire a enantioselectivității preparatului testat comparativ cu enzima nativă, iar pentru 2-pentanol o scădere drastică a acesteia.

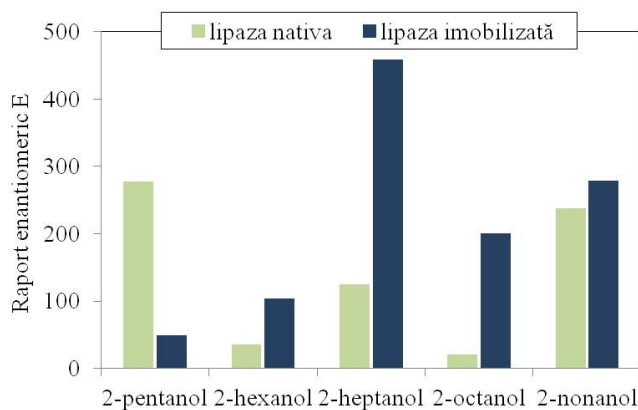


Figura 2.21. Influența substratului asupra enantioselectivității preparatului enzimatic cu lipază CalB imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Purolite MN200.

În aceste condiții, pentru a crește enantioselectivitatea este nevoie de modificarea altor parametri ai reacției care avea influență în acest sens. Un asemenea parametru este natura mediului de reacție. Prin urmare, s-a investigat influența acestui parametru asupra enantioselectivității în reacția de acilare a 2-pentanolului prin biocataliză cu CalB imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Purolite MN200. Rezultatele obținute în diferite medii de reacție sunt prezentate în tabelul 2.37.

Tabelul 2.37. Influența mediului de reacție asupra eficienței catalitice a lipazei din *Candida antarctica* B dublu imobilizată în reacția de acilare enantioselectivă a 2-pentanolului

Mediu de reacție	Conv. (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	ee _p (%)	E
hexan	55	0,286	81	49
ciclohexan	52	0,392	87	51
toluen	50	0,383	87	41
dioxan	53	0,403	86	55
MTBE	51	0,397	79	22
<i>i</i> -octan	45	0,347	89	37
acetona	59	0,464	69	29
THF	27	0,202	88	22
<i>t</i> -butanol	42	0,319	91	42

Activitatea enzimatică este condiționată de alegerea unui mediu de reacție adecvat, deoarece unii solvenți organici inactivează enzima. Din tabelul 2.37 se poate observa că natura mediului de reacție a influențat semnificativ activitatea de

transesterificare. Această activitate a fost cu peste 60% mai mare în acetonă decât în hexan, în timp ce în tetrahidrofuran a scăzut cu 30%. Însă contrar așteptărilor, nu s-a realizat și creșterea enantioselectivității prin modificarea mediului de reacție. Deși în unii dintre solvenții studiați excesul enantiomeric a crescut comparativ cu hexanul, valorile raportului enantiomeric E nu s-au modificat semnificativ, cele mai bune valori fiind în jur de 50.

În cazul reacției de acilare a 2-pentanolului cu preparate obținute prin Metoda 4, cele mai mici valori ale enantioselectivității s-au obținut mai ales atunci când CaCO_3 a fost folosit ca suport pentru dubla imobilizare (Figura 2.22).

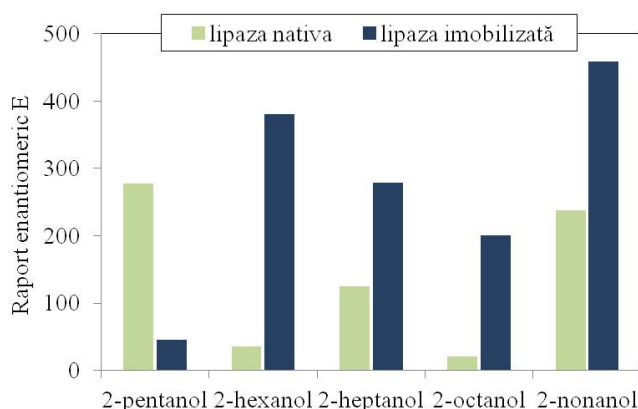


Figura 2.22. Influența substratului asupra enantioselectivității preparatului enzimatic obținut prin dublă imobilizare cu $\text{PhTMOS}:\text{MeTMOS}:\text{TMOS}=1,6:0,4:1$, OmimBF_4 ca aditiv și CaCO_3 (adsorbent).

Pentru îmbunătățirea enantioselectivității în cazul acilării 2-pentanolului cu acetat de vinil, în continuare reacția a fost investigată în mai mulți solvenți organici, iar ca biocatalizator s-a folosit lipaza din *Candida antarctica* B dublu imobilizată cu silani precursori $\text{PhTMOS}:\text{MeTMOS}:\text{TMOS}$ în raport molar de 1,6:0,4:1, $[\text{Omim}]\text{BF}_4$ ca aditiv și CaCO_3 ca adsorbent (Metoda 4).

Tabelul 2.38. Influența mediului de reacție asupra eficienței catalitice a lipazei din *Candida antarctica* B dublu imobilizată în reacția de acilare enantioselectivă a 2-pentanolului

Mediu de reacție	Conversie (%)	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	ee (%)	E
hexan	51	0,386	84	33
ciclohexan	48	0,401	85	29
toluen	55	0,424	81	49
dioxan	52	0,379	91	104
MTBE	51	0,381	82	27
<i>i</i> -octan	49	0,377	87	38
acetona	40	0,321	95	75
THF	50	0,390	91	67
diclormetan	49	0,366	95	113
<i>t</i> -butanol	43	0,343	93	58

Alegerea unui mediu de reacție potrivit este foarte dificilă deoarece unii solvenți organici inactivează enzima. Cele mai ridicate valori ale randamentului și activității de transesterificare s-au obținut atunci când toluenul a fost utilizat ca mediu de reacție, iar cele mai mici valori s-au obținut în cazul acetonei (Tabelul 2.38).

Se observă că enantioselectivitatea preparatului enzimatic utilizat la rezoluția cinetică a 2-pentanolului este puternic influențată de natura mediului de reacție. A fost demonstrat faptul că alegerea unui mediu de reacție potrivit ar putea fi un factor major pentru optimizarea eficienței catalitice a lipazelor native sau imobilizate. Diclormetanul și 1,4-dioxanul, solvenți cu polaritate intermediară, s-au dovedit a fi foarte eficienți, ducând la obținerea unor valori ale raportului enantiomeric mai mari de 100, ceea ce poate fi considerată o rezoluție cinetică excelentă. Valori mai mici ale enantioselectivității s-au obținut în cazul solvenților nepolari, cum ar fi hexan sau ciclohexan.

Cu toate acestea, enantioselectivitatea nu poate fi explicată doar pe baza polarității solventului. De exemplu s-au obținut diferențe considerabile de enantioselectivitate în cazul utilizării acetonei ca mediu de reacție, respectiv a *terț*-butanolului, solvenți cu polarități apropiate [179].

Același preparat enzimatic a fost folosit ca și biocatalizator și la rezoluția cinetică a 2-octanolului în diferite medii de reacție. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 2.39.

Tabelul 2.39. Influența mediului de reacție asupra eficienței catalitice a lipazei din *Candida antarctica* B dublu imobilizată în reacția de acilare enantioselectivă a 2-octanolului

Mediu de reacție	Conversie (%)	A ^{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	ee _p (%)	E
Hexan	51	0,420	95	201
Ciclohexan	51	0,447	95	201
Toluen	51	0,437	95	201
1,4-dioxan	51	0,413	95	201
MTBE	51	0,416	95	201
<i>i</i> -octan	51	0,446	95	201
Acetonă	43	0,357	94	69
THF	42	0,397	94	66
Diclorometan	51	0,397	95	201
<i>t</i> -butanol	32	0,313	93	42

Așa cum se poate observa din Tabelul 2.39, în cazul acilării enantioselective a 2-octanolului, natura mediului de reacție nu a avut o influență semnificativă asupra eficienței catalitice a biocatalizatorului folosit, cu excepția *tert*-butanolului, solvent în care s-au obținut cele mai mici valori ale activității catalitice și enantioselectivității.

2.2.7. Concluzii parțiale

Performanțele catalitice ale lipazelor imobilizate prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție depind foarte mult de încărcarea cu enzimă, de raportul molar al silanilor precursori, precum și de tipul și cantitatea adsorbentului.

S-au obținut valori ridicate la încărcări de 9,48, 10,72 și 11,68 mg proteină/g biocatalizator. Trebuie menționat că indiferent de valoarea încărcării cu enzimă, valorile raportului enantiomeric au fost superioare comparativ cu lipaza nativă. Ținând cont atât de activitatea enzimatică, raportul enantiomeric (E) cât și de costul biocatalizatorului, se poate spune că valoarea optimă a încărcării cu enzimă necesară la imobilizarea prin metoda sol-gel combinată cu adsorbție este de 10,72 mg proteină/g biocatalizator. Biocatalizatorii care vor fi utilizați în studiile următoare vor fi cei obținuți la o încărcare a matricii cu proteină de 10,72. Randamentul de imobilizare a fost independent de încărcarea cu lipază.

Indiferent de substratul testat, raportul optim dintre cantitatea de suport și numărul de moli de silani precursori la care s-au înregistrat cele mai bune valori ale conversiei a fost de 83,3. Atunci când reacțiile au fost efectuate într-un mediu de reacție polar (acetonă), s-a obținut o ușoară scădere a conversiei. În această situație, a fost avantajată reacția de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului.

După imobilizare activitatea totală a fost mai mare la lipaza din *Burkholderia cepacia*, de până la 8 ori mai mare decât a celorlalte lipaze imobilizate. Lipaza din *Candida antarctica* a prezentat valori ridicate ale randamentului de regăsire a activității, iar cea din *Pseudomonas fluorescens* a dat valorile cele mai mici ale randamentului de regăsire. Folosind un raport molar al precursorilor silanici de 1,6:0,4:1 s-a obținut cele mai bune valori ale activității totale. Atunci când s-a folosit [Emim]BF₄ ca aditiv de imobilizare, pentru toate preparatele enzimatiche obținute, valorile randamentului de regăsire au fost aproape duble comparativ cu

imobilizarea în prezența lui OmimBF₄ ca agent de modelare a structurii gelului. Folosind un raport molar al precursorilor silanici de 1:1:1 s-au obținut cele mai bune valori ale enantioselectivității pentru toate preparatele enzimatiche obținute.

Valorile randamentului de regăsire – parametru care caracterizează eficiența catalitică a preparatelor obținute, au fost excelente (între 250 și 560%) pentru toți biocatalizatorii testați, indiferent de protocolul de imobilizare folosit. Indiferent de adsorbentul folosit, se observă o creștere a randamentului de regăsire de la 2-pentanol la 2-heptanol, apoi doar o ușoară creștere sau chiar o scădere pentru 2-octanol și apoi o creștere pronunțată în cazul 2-nonanolului.

Lichidele cu același anion, tetrafluoroborat, au dus la activități ridicate ale preparatelor imobilizate odată cu scăderea lanțului alchil din partea cationică. În ceea ce privește lichidele ionice cu același cation, [Emim], prezența în partea anionică a unor substituenți mai voluminoși (trifluoroacetat, acetat), a dus la scăderea randamentului de regăsire a activității și a enantioselectivității preparatelor enzimatiche obținute.

Privind comparativ cele două metode de imobilizare studiate, se poate observa că valorile raportului enantiomeric au fost similare, cu două excepții. În cazul în care s-a folosit metoda 3, valoarea cea mai ridicată a lui E pentru acilarea 2-hexanolului s-a obținut pentru lichidul ionic [Bmim]PF₆. Atunci când biocatalizatorii au fost sintetizați conform metodei 4, cea mai ridicată valoare a lui E s-a înregistrat pentru acilarea 2-octanolului cu lipaza CaLB dublu imobilizată în prezența aditivului [Hmim]BF₄.

Activitatea enzimatică este condiționată de alegerea unui mediu de reacție adecvat, deoarece unii solvenți organici inactivează enzima. Cele mai ridicate valori ale activității de transesterificare s-au obținut atunci când acetona sau dioxanul au fost utilizați ca mediu de reacție, iar cele mai mici valori s-au obținut în cazul THF.

Cele mai ridicate valori ale randamentului și activității de transesterificare s-au obținut atunci când toluenul a fost utilizat ca mediu de reacție, iar cele mai mici valori s-au obținut în cazul acetonei. Enantioselectivitatea preparatului enzimatic utilizat la rezoluția cinetică a 2-pentanolului este puternic influențată de natura mediului de reacție. Diclormetanul și 1,4-dioxanul, solvenți cu polaritate intermediară, s-au dovedit a fi foarte eficienți, ducând la obținerea unor valori ale raportului enantiomeric mai mari de 100, ceea ce poate fi considerată o rezoluție cinetică excelentă. Valori mai mici ale enantioselectivității s-au obținut în cazul solvenților nepolari, cum ar fi hexan sau ciclohexan.

În cazul acilării enantioselective a 2-octanolului, natura mediului de reacție nu a avut o influență semnificativă asupra eficienței catalitice a biocatalizatorului folosit.

2.3. Creșterea stabilității lipazelor prin imobilizare în sol-gel

2.3.1. Reutilizarea lipazelor microbiene imobilizate

Cea mai importantă proprietate a enzimelor care poate fi îmbunătățită prin imobilizare este stabilitatea. Cu toate acestea, o asemenea creștere a stabilității nu este un rezultat direct al imobilizării, deoarece în unele cazuri stabilitatea enzimei poate scădea în urma imobilizării din diferite motive, cum ar fi interacțiuni nedorite între suport și enzimă. Este bine cunoscut faptul că sunt necesare protocoale de imobilizare specifice pentru obținerea celor mai bune performanțe catalitice. În ceea ce privește aplicarea la nivel industrial, principala cerință este posibilitatea de reutilizare a enzimei în cât mai multe cicluri de reacție.

Imobilizarea prin entrapare în matrici sol-gel permite separarea convenabilă a catalizatorului la sfârșitul fiecărui ciclu de reacție și stabilizează molecula lipazei împotriva agregării și proteolizei cauzate de posibila prezență a proteazelor în enzima brută. În funcție de dimensiunile porilor, de distribuția și localizarea enzimei în matricea poroasă, stabilitatea acesteia poate fi deteriorată, prin colapsarea porilor sau prin colmatarea cauzată de impurități, având ca efect creșterea împiedicării sterice.

Reutilizarea enzimei în mai multe cicluri de reacție reprezintă una dintre principalele obiective ale imobilizării. Acest aspect este esențial mai ales în cazul enzimelor care au preț ridicat, deoarece în majoritatea cazurilor este determinant pentru utilizarea industrială a enzimei respective. În general, se consideră că enzima poate fi reutilizată până când activitatea sa scade la cel mult 25% din cea inițială.

Numeroase lucrări de cercetare s-au concentrat asupra posibilităților de îmbunătățire a stabilității și reutilizării enzimelor imobilizate, pentru a face posibilă aplicarea lor la nivel industrial.

S-a urmărit variația activității lipazei din *Candida antarctica* B (C-Lecta), nativă sau imobilizată prin metoda de entrapare în sol-gel (Metoda 1) și entrapare combinată cu adsorbție pe Celite 545 (Metoda 3), în condițiile reutilizării multiple în reacția de acilare a 2-octanolului în mediu de n-hexan. Imobilizarea s-a realizat utilizând un sistem ternar de precursori metoxisilanici. Silanii precursori folosiți au fost un aril-trimetoxisilan PhTMOS, un alchil-trimetoxisilan MeTMOS și tetrametoxisilan TMOS în raport molar de 1,6:0,4:1.

Studiul a fost efectuat la două temperaturi, 40°C și 60°C, pentru a investiga și stabilitatea termică a lipazei imobilizate în condiții de utilizare repetată, comparativ cu lipaza nativă.

După fiecare ciclu de reacție s-a separat produsul de reacție prin centrifugare, iar lipaza nativă sau preparatul enzimatic rămasă în fiola de reacție au fost spălate cu n-hexan, centrifugate și reintroduse într-un nou ciclu de reacție. Rezultatele studiului realizat la 40°C sunt prezentate în Tabelul 2.40.

Tabelul 2.40. Reutilizarea lipazei din *Candida antarctica* B nativă, imobilizată prin metoda sol-gel (ESG), sau prin metoda combinată cu adsorbție pe Celite 545 (ESG+A), în reacția de acilare a 2-octanolului, la 40°C.

Număr reutilizare	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)			Exces enantiomeric e.e. (%)		
	Lipaza nativă	ESG ²	ESG+A ³	Lipaza nativă	ESG ²	ESG+A ³
0	0,819	0,457	0,443	90	95	95
1	0,719	0,432	0,436	89	94	95
2	0,679	0,433	0,421	88	94	95
3	0,596	0,475	0,419	87	95	95
4	0,615	0,422	0,400	87	94	95
5	0,531	0,432	0,397	85	95	95
6	0,535	0,399	0,403	85	95	95
7	0,093	0,475	0,420	84	95	95
8	0,094	0,447	0,402	83	95	95
9	-	0,411	0,395	-	95	95
10	-	0,472	0,396	-	95	95
11	-	0,430	0,417	-	95	95
12	-	0,439	0,395	-	95	95
13	-	0,452	0,373	-	95	95
14	-	0,474	0,414	-	95	95
15	-	0,444	0,327	-	95	95
16	-	0,414	0,343	-	95	95
17	-	0,451	0,391	-	95	95
18	-	0,416	0,355	-	95	95
19	-	0,441	0,349	-	95	95
20	-	0,428	0,390	-	95	95
21	-	0,421	0,385	-	95	95
22	-	0,423	0,388	-	95	95
23	-	0,448	0,388	-	95	95
24	-	0,410	0,378	-	95	95
25	-	0,442	0,381	-	95	95
26	-	0,417	0,385	-	94	95
27	-	0,420	0,397	-	95	95
28	-	0,414	0,383	-	95	95
29	-	0,420	0,385	-	95	95
30	-	0,428	0,381	-	95	95
31	-	0,431	0,392	-	95	95
32	-	0,422	0,354	-	95	95
33	-	0,407	0,356	-	95	95
34	-	0,406	0,355	-	95	95
35	-	0,431	0,353	-	95	95
36	-	0,418	0,371	-	95	95
37	-	0,422	0,359	-	95	95
38	-	0,402	0,322	-	95	95
39	-	0,461	0,379	-	94	95
40	-	0,432	0,327	-	95	95
41	-	0,412	0,349	-	95	95
42	-	0,409	0,348	-	95	95

¹Raportată la activitatea din primul ciclu de reacție

²Imobilizată prin entrapare în sol-gel

³Imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție.

Din Tabelul 2.40 se poate observa că activitatea de transesterificare a enzimei a rămas constantă pe parcursul reutilizărilor la o valoare de 0,4-0,42, indiferent de tehnica de imobilizare utilizată.

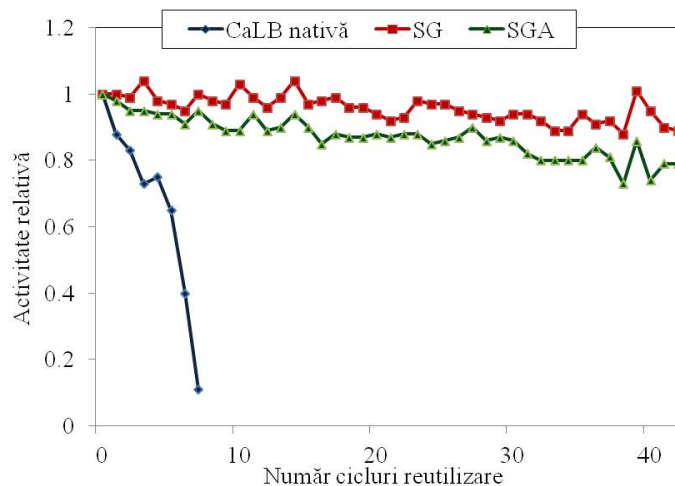


Figura 2.23. Influența reutilizării asupra activității totale relative a lipazei CaLB nativă și imobilizată prin entrapare în sol-gel și entrapare combinată cu adsorbție, în reacția de acilare a 2-octanolului la 40 °C în mediu de *n*-hexan.

Activitatea totală relativă în mai multe cicluri de reutilizare a fost reprezentată în diagrama din Figura 2.23. Se remarcă faptul că în cazul lipazei native această activitate a scăzut pronunțat de la prima reutilizare și a fost de numai 48% după 8 reutilizări.

În aceleași condiții, preparatele imobilizate au păstrat cel puțin 98%, din activitatea totală inițială după 8 reutilizări. Preparatele obținute prin entrapare în sol-gel au avut o stabilitate operațională mai mare decât cele obținute prin entrapare combinată cu adsorbție.

Astfel, numărul de cicluri de reutilizare pentru care activitatea relativă s-a menținut la peste 50% din activitatea inițială a fost de 6 în cazul enzimei native, iar pentru preparatele imobilizate activitatea relativă s-a menținut la peste 90% pe tot parcursul celor 42 cicluri de reutilizare.

Enantioselectivitatea enzimei native a scăzut la reutilizare, de la 90 la 83% după 8 reutilizări. Trebuie remarcat efectul pozitiv pe care l-a avut imobilizarea, excesul enantiomeric menținându-se la valoarea inițială de 95% pe tot parcursul studiului, pentru ambele preparate testate [183].

Aceleași preparate, precum și enzima nativă au fost reutilizate și la 60°C în reacția de acilare a 2-octanolului în mediu de *n*-hexan.

Tabelul 2.41. Reutilizarea lipazei din *Candida antarctica* B nativă și imobilizată prin metoda sol-gel (ESG) sau combinată cu adsorbție pe Celite 545 (ESG+A), utilizând ca silani precursori PhTMOS/MeTMOS/TMOS la un raport molar de 1,6:0,4:1, în reacția de acilare a 2-octanolului în n-hexan la 60°C.

Număr utilizare	A_{trans} ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)			Exces enantiomeric e.e. (%)		
	Lipaza nativă	ESG ²	ESG+A ³	Lipaza nativă	ESG ²	ESG+A ³
0	0,813	0,413	0,410	89	93	94
1	0,692	0,432	0,406	88	91	93
2	0,487	0,268	0,413	83	90	93
3	0,645	0,423	0,423	86	91	94
4	0,558	0,416	0,402	78	91	93
5	0,431	0,417	0,427	75	92	93
6	0,337	0,419	0,404	71	91	94
7	0,312	0,433	0,436	72	91	94
8	0,259	0,437	0,421	67	92	94
9	0,242	0,420	0,429	67	92	94
10	0,227	0,428	0,428	65	93	94
11	0,207	0,413	0,412	63	93	94
12	-	0,418	0,428	-	93	94
13	-	0,420	0,436	-	93	94
14	-	0,423	0,393	-	94	94
15	-	0,416	0,409	-	94	94

¹Raportată la activitatea din primul ciclu de reacție

²Imobilizată prin entrapare în sol-gel

³Imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție

Din tabelul 2.41 se poate observa că activitatea de transesterificare a enzimei a rămas constantă pe parcursul reutilizărilor la o valoare de 0,4-0,42, indiferent de tehnica de imobilizare utilizată.

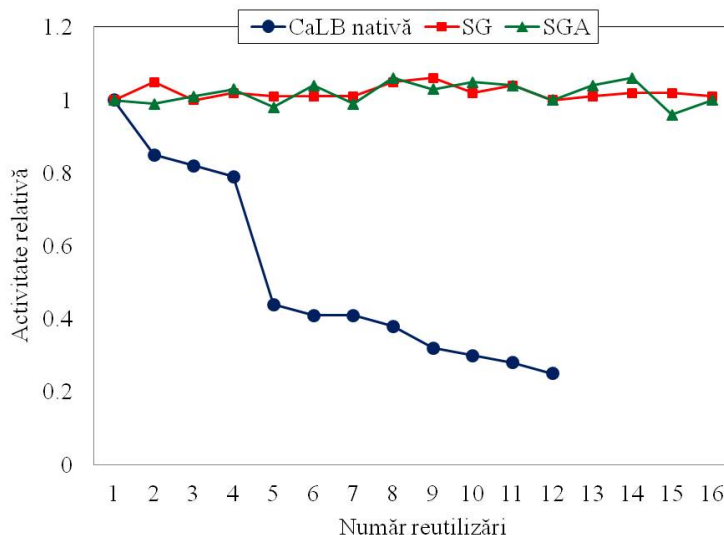


Figura 2.24. Influența reutilizării asupra activității totale relative a lipazei CaLB nativă și imobilizată prin entrapare în sol-gel și entrapare combinată cu adsorbție, în reacția de acilare a 2-octanolului în mediu de *n*-hexan la 60°C.

Activitatea totală relativă în mai multe cicluri de reutilizare a fost reprezentată în diagrama din Figura 2.24. Se remarcă faptul că în cazul lipazei native această activitate a scăzut cu 15% încă de la prima reutilizare și a fost de numai 25% din cea inițială după 11 reutilizări.

În aceleași condiții, preparatele imobilizate și-au menținut activitatea catalitică nemodificată de-a lungul a 15 cicluri de utilizare. Nu au existat diferențe semnificative în ce privește stabilitatea operațională între preparatele obținute prin entrapare în sol-gel și cele obținute prin entrapare combinată cu adsorbție.

Aceeași diferență la reutilizare între enzima imobilizată și cea solubilă s-a constatat și în cazul enantioselectivității. Excesul enantiomeric în condițiile folosirii enzimei native a scăzut de la valoarea inițială de 89% la 63%, după 12 reutilizări. Trebuie remarcat efectul pozitiv pe care l-a avut imobilizarea, excesul enantiomeric menținându-se la valoarea inițială de 93-94% pentru ambele preparate testate, pe tot parcursul celor 15 cicluri de reacție.

Un rezultat foarte important al acestui studiu este că în timp ce eficiența catalitică a lipazei native reutilizate a scăzut considerabil mai repede la creșterea temperaturii de reacție de la 40°C la 60°C, în cazul lipazei imobilizate prin metoda sol-gel ea a rămas aproape nemodificată. Prin urmare, stabilitatea operațională excelentă a lipazei se menține și la temperaturi mai ridicate, ceea ce este un argument important pentru utilizarea industrială a acestor biocatalizatori [177].

2.3.2. Studiul termostabilității lipazelor microbiene imobilizate

Stabilitatea termică este o altă proprietate importantă a enzimelor pentru ca acestea să poată fi utilizate la nivel industrial, deoarece în multe procese este necesară o temperatură mai ridicată decât cea obișnuită pentru reacțiile enzimatică în vederea îmbunătățirii vitezei de reacție. Inactivarea termică este legată de obicei de deplierea enzimelor, iar imobilizarea ar putea preveni modificările conformaționale implicate în acest tip de inactivare. Astfel, menținerea activității enzimelor la peste 40-50°C este un obiectiv important al catalizei enzimatică, deoarece pierderea activității la temperaturi ridicate este unul dintre motivele principale care împiedică aplicarea industrială a biocatalizatorilor. Imobilizarea poate fi o metodă de creștere a termostabilității enzimelor, așa cum s-a demonstrat în mai multe cazuri.

Prezența lichidelor ionice în matrice are ca efect o mai bună stabilizare prin menținerea structurii active a enzimei prin interacțiuni specifice. În plus, enzimele imobilizate sunt mai bine protejate împotriva creșterii locale de temperatură în apropierea suprafeței de încălzire.

În acest studiu s-a urmărit influența temperaturii în intervalul 40-80°C asupra performanțelor catalitice a lipazelor Amano AK din *Pseudomonas fluorescens*, Amano PS din *Burkholderia cepacia* și C-Lecta din *Candida antarctica* B, native sau imobilizate. Preparatele enzimatică testate au fost obținute prin entrapare în sol-gel (Metoda 1) și prin entrapare combinată cu adsorbție (Metoda 3). S-au folosit în ambele cazuri un sistem ternar de precursori silanici PhTMOS, MeTMOS și TMOS la raport molar de 1,6:0,4:1, iar ca aditiv un lichid ionic ([Omim]BF₄). Biocatalizatorii au fost incubati în *n*-hexan la diferite temperaturi timp de o oră, după care au fost folosiți în reacția de acilare enantioselectivă a 2-octanolului cu acetat de vinil la 40°C, în același solvent.

Rezultatele obținute arată o stabilitate termică excelentă a lipazelor imobilizate pe domeniul de temperatură studiat, indiferent de natura lipazei și de tehnica de imobilizare utilizată. Micile variații ale valorilor activității pot fi atribuite distribuției diferite a enzimei în matrice, chiar dacă reacțiile au fost efectuate în duplicat.

În cazul lipazei CaLB nativă (Tabelul 2.42), activitatea de transesterificare crește odată cu creșterea temperaturii, doar pe intervalul 40-65°C, după care se observă o ușoară scădere. Excesul enantiomeric și raportul enantiomeric E prezintă aceeași tendință crescătoare, dar până la temperatura de 60°C, când se înregistrează valorile maxime (e.e. = 91% și E=27).

Tabelul 2.42. Influența temperaturii asupra activității lipazelor imobilizate. Biocatalizatorii au fost incubati 1 oră în n-hexan la temperaturi cuprinse între 40 și 80 °C.

Temp (°C)	Activitate ¹ (μmoli h ⁻¹ ·mg catalizator ⁻¹)								
	Lipaza din <i>Pseudomonas fluorescens</i>			Lipaza din <i>Burkholderia cepacia</i>			Lipaza din <i>Candida antarctica B</i>		
	nativă	SG ²	SGA ³	nativă	SG ²	SGA ³	nativă	SG ²	SGA ³
40	1,910	0,343	0,295	0,953	0,433	0,341	0,289	0,429	0,434
45	1,817	0,338	0,299	1,052	0,438	0,286	0,740	0,418	0,414
50	1,816	0,316	0,250	1,116	0,395	0,274	0,696	0,423	0,406
55	1,929	0,315	0,286	1,061	0,398	0,289	0,784	0,411	0,397
60	1,698	0,316	0,282	1,372	0,393	0,315	0,895	0,424	0,404
65	2,290	0,325	0,297	1,216	0,413	0,285	1,037	0,426	0,413
70	1,805	0,335	0,298	1,176	0,412	0,291	0,715	0,420	0,425
75	1,713	0,331	0,310	0,906	0,411	0,273	0,759	0,424	0,428
80	1,866	0,326	0,319	1,017	0,415	0,286	0,615	0,419	0,430

¹activitatea de transesterificare a 2-octanolului, la 24 ore de reacție

²imobilizare prin entrapare în sol-gel

³imobilizare prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție

În cazul preparatelor enzimatiche utilizate, indiferent de metoda de imobilizare, se observă o bună stabilitate termică ilustrată prin valori menținute constante pe tot intervalul de temperatură studiat (conversie în jur de 50%, exces enantiomeric de 95% și rapoarte enantiomerice de peste 125).

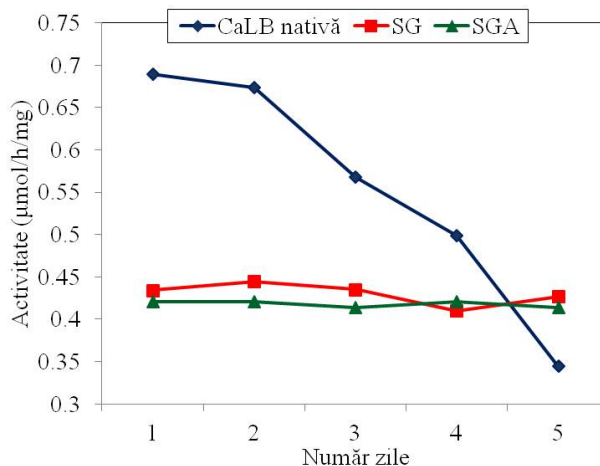


Figura 2.25. Termostabilitatea lipazei din *Candida antarctica B*, nativă sau imobilizată, la 80°C, în reacția de acilare enantioselectivă a 2-octanolului cu acetat de vinil în n-hexan.

Datorită stabilității termice excelente a preparatelor enzimatiche obținute cu lipaza din *Candida antarctica* B și silanii precursori PhTMOS, MeTMOS și TMOS, conform procedurii stabilite, studiile au fost continuate în condiții mai severe, prin incubare în hexan la 80°C timp de 5 zile. Chiar și așa, biocatalizatorii obținuți au prezentat valori ale activității practic neschimbate, pe când enzima nativă a pierdut 50% din activitate după 5 zile (Figura 2.25). Nu s-au înregistrat diferențe semnificative între tehnicile de imobilizare studiate. De asemenea, enantioselectivitatea lipazei nu a fost afectată, rămânând constantă (exces enantiomeric de 94-95%). Anterior a fost raportată termostabilitatea ridicată a lipazei din *Candida cylindracea* imobilizată prin metoda combinată de entrapare (folosind un amestec binar de silani precursori TMOS și propiltrimetoxisilan) și depunere pe Celite, dar timpul de incubare nu a fost extins mai mult de o oră [188]. Rezultatele grupului nostru demonstrează posibilitatea de menținere intactă a proprietăților catalitice ale enzimelor imobilizate prin entrapare în sol-gel pentru o perioadă de timp mai mare [183].

2.3.3. Stabilitatea în solvenți organici

Biocataliza în solvenți organici are o serie de avantaje față de cea în mediu apos: îmbunătățirea solubilității compușilor hidrofobi, posibilitatea de a efectua reacții care sunt restricționate din punct de vedere cinetic sau termodinamic în apă, minimizarea reacțiilor secundare, controlul sau modificarea selectivității enzimei, posibilitatea recuperării unor produși prin folosirea solvenților organici volatili și îmbunătățirea termostabilității enzimei. În ciuda acestor avantaje, enzimele nu îndeplinesc tot timpul cerințele de activitate, productivitate și cel mai important, stabilitate în solvenții organici. Solvenții hidrofobi au ca efect stabilitate și activitate enzimatică ridicate comparativ cu cei hidrofilii, care au tendința de a îndepărta o parte din apa necesară pentru funcționarea enzimelor, scăzând astfel activitatea catalitică. Pe lângă faptul că influențează reacția catalizată, solvenții organici pot prezenta și efecte denaturante asupra enzimelor. Îmbunătățirea stabilității enzimei este principalul avantaj al imobilizării, iar stabilizarea împotriva denaturării cauzate de factori fizici sau chimici este o caracteristică importantă a unei biomolecule imobilizate care trebuie investigată.

Scopul acestui studiu a fost investigarea posibilului efect denaturant al incubării pe termen lung în solvenți organici a lipazei din *Candida antarctica* B imobilizată prin entrapare în sol-gel sau prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție. În cadrul acestui studiu s-a urmărit influența mai multor solvenți organici asupra activității și enantioselectivității lipazei B din *Candida antarctica*, nativă sau imobilizată prin entrapare în sol-gel (Metoda 1) sau prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (Metoda 3) utilizând un sistem ternar de precursori metoxisilanici, PhTMOS, MeTMOS și TMOS în raport molar de 1,6:0,4:1. Lipaza nativă și preparatele imobilizate au fost incubate la 25°C în diferiți solvenți organici timp de o săptămână. Solvenții au fost apoi îndepărtați prin filtrare, urmată de spălarea preparatului de două ori cu câte 1 ml de *n*-hexan, apoi lăsate la etuva de vid timp de o oră pentru uscare. Activitatea enzimatică a fost determinată în reacția de acilare a 2-octanolului cu acetat de vinil la 40°C în mediu de *n*-hexan [177].

Pentru majoritatea solvenților testați (cu excepția DMSO și piridinei) activitatea de transesterificare a lipazelor imobilizate nu a fost influențată semnificativ de natura solventului, demonstrând faptul că aceștia nu au avut efect de denaturare a enzimei incapsulate în matricea sol-gel hibridă. O altă concluzie

importantă este disponibilitatea unei mari varietăți de solvenți organici pentru aplicații sintetice catalizate de lipaza CaLB entrapată în matrici sol-gel, permițând selectarea celui mai bun, în concordanță cu cerințele specifice ale reacției studiate, în special solubilitatea substratului și produșilor. Solvenții cunoscuți a avea efect denaturant asupra lipazelor (DMSO și piridina) și-au menținut acest efect și asupra preparatelor imobilizate.

Tabelul 2.43. Stabilitatea lipazei din *Candida antarctica* B, nativă, imobilizată prin entrapare în sol-gel (SG), sau prin entrapare combinată cu adsorbție pe Celite 545 (SGA), după incubare timp 7 zile în diferiți solvenți organici, măsurată în reacția de acilare a 2-octanolului în hexan la 40°C după 6 ore de reacție.

Solvent	Constanta dielectrică	Conversie (%)			Exces enantimoric e.e. (%)		
		nativă	SG	SGA	nativă	SG	SGA
<i>n</i> -hexan	1,88	8	43	39	75	95	95
<i>i</i> -octan	1,94	9	42	37	79	95	95
ciclohexan	2,02	7	43	37	73	95	95
1,4-dioxan	2,25	12	39	26	83	95	93
toluen	2,38	7	46	42	72	96	95
MTBE	2,60	10	48	41	79	96	95
THF	7,58	8	47	42	77	96	95
<i>terț</i> -butanol	12,4	6	47	42	71	96	95
piridină	12,4	2	12	21	41	83	90
acetonă	20,7	6	49	45	71	96	95
acetonitril	37,5	6	46	36	69	95	95
DMSO	46,6	1	1	1	99	47	99

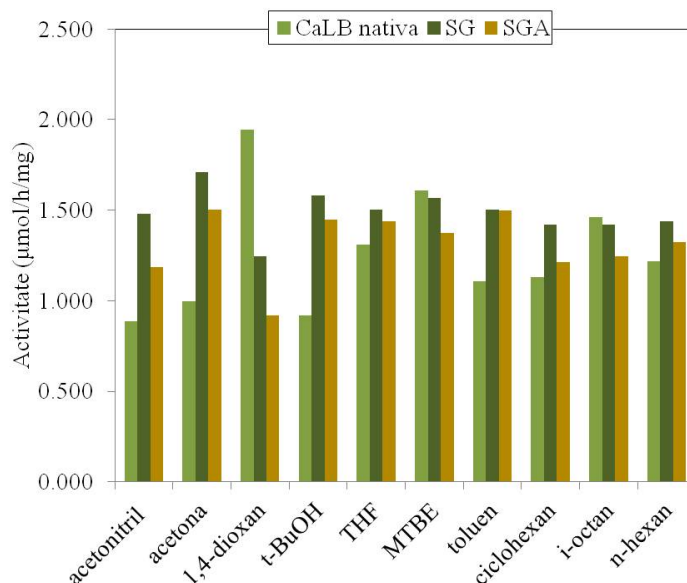


Figura 2.26. Influența solventului asupra activității de transesterificare a lipazei CaLB nativă și imobilizată prin entrapare în sol-gel și entrapare combinată cu adsorbție, în reacția de acilare a 2-octanolului la 40 °C în mediu de *n*-hexan.

Trecerea de la mediul natural de acțiune al enzimelor la medii organice oferă multe avantaje, printre care și o solubilitate mai bună a substraturilor. Cu toate acestea, enzimele pot prezenta adesea viteze de reacție mai mici în mediu organic comparativ cu soluțiile apoase.

Natura solventului folosit pentru un anumit tip de reacție este esențială, deoarece acesta afectează atât stabilitatea cât și specificitatea biocatalizatorilor.

Activitatea de transesterificare nu a fost influențată semnificativ de natura solventului în care au fost incubați biocatalizatorii. Cea mai importantă caracteristică a unui solvent care poate influența activitatea enzimatică este polaritatea. Această proprietate nu este însă intrinsecă și prin urmare nu există o mărime fizică prin care ea să poată fi exprimată. În general, se consideră că polaritatea poate fi caracterizată cel mai bine prin constanta dielectrică. În cazul nostru, nu s-a putut face o corelare clară între valoarea constantei dielectrice a solventului și activitatea enzimei după 7 zile de păstrare în solventul respectiv. Așa cum se poate observa din Figura 2.26, solvenții protici cu polaritate mai mare (acetona, acetone) au avut efect de inactivare asupra lipazei native, activitatea după incubarea în acești solvenți fiind de aproape două ori mai mică față de valoarea măsurată în alți solvenți cu polaritate mai scăzută (dioxan, metil-*tert*-butil-eter). În cazul preparatelor enzimatiche, principala observație este că atât cele obținute prin entrapare în sol-gel, cât și cele prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție au prezentat activități catalitice ridicate, fără a se înregistra diferențe semnificative în funcție de natura solvenților utilizați. Prin urmare, imobilizarea are ca rezultat și o protejare a enzimei față de efectul de inactivare al solventului organic. Acest rezultat este important, deoarece permite ca în reacțiile catalizate de lipaza imobilizată prin procedeul nostru

alegerea mediului de reacție să fie făcută în funcție de caracteristicile materiilor prime și produșilor, pentru o gamă largă de solvenți neexistând nici o restricție impusă de eventuala inactivare a enzimei.

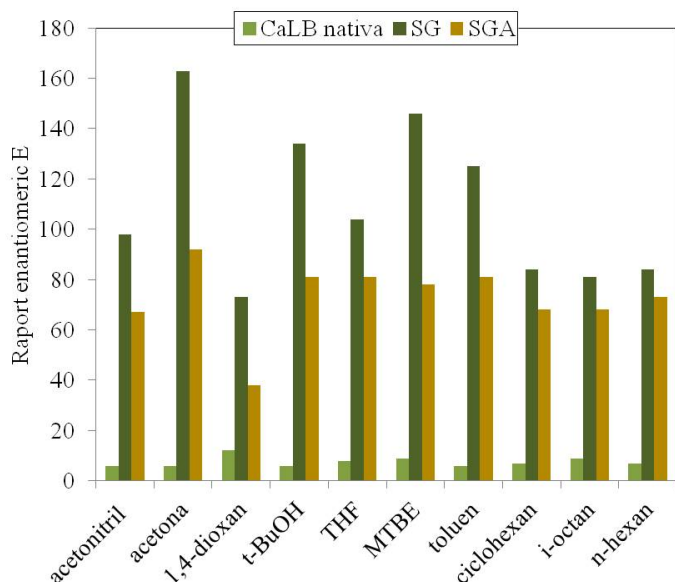


Figura 2.27. Influența solventului asupra enantioselectivității lipazei CaLB nativă și imobilizată prin entrapare în sol-gel și entrapare combinată cu adsorbție, în reacția de acilare a 2-octanolului la 40 °C în mediu de n-hexan.

Enantioselectivitatea este un alt parametru important pentru aplicațiile practice ale biocatalizei enzimaticе. În urma imobilizării s-au obținut preparate enzimaticе cu o stabilitate operațională remarcabilă, fapt care reiese și din valorile excelente ale raportului enantiomeric (E) comparativ cu lipaza nativă (Figura 2.27). Dintre metodele de imobilizare studiate, cele mai bune rezultate s-au înregistrat în cazul entrapării în sol-gel, indiferent de solventul în care au fost incubăți biocatalizatorii. Valorile cele mai ridicate ale enantioselectivității s-au obținut în cazul incubării în solvenți cu polaritate medie (acetona, *tert*-butanol, metil-*tert*-butil eter și toluen) a lipazei entrapate. O posibilă explicație ar fi faptul că acești solvenți au o compatibilitate mai bună cu matricea de polisiloxan substituit (având atât grupări polare cât și nepolare) în care este încapsulată enzima.

2.3.4. Concluzii parțiale

Creșterea numărului posibil de reutilizări a enzimei este un alt obiectiv important, urmărit prin orice metodă de imobilizare. Tehnicile de imobilizare studiate și-au demonstrat eficiența și sub acest aspect. Astfel s-a obținut o creștere însemnată a stabilității enzimei, preparatele imobilizate prezentând o activitate relativă ridicată care s-a menținut la peste 90% pe tot parcursul celor 42 de cicluri de reutilizare, în timp ce pentru enzima nativă această valoare a fost de numai 11% după 8 reutilizări. Enantioselectivitatea preparatelor imobilizate a fost ridicată pe durata studiului de reutilizare, iar excesul enantiomeric s-a menținut la valoarea inițială de 95% .

Un rezultat foarte important al acestui studiu este că în timp ce eficiența catalitică a lipazei native reutilizate a scăzut considerabil mai repede la creșterea temperaturii de reacție de la 40°C la 60°C, în cazul lipazei imobilizate prin metoda sol-gel ea a rămas aproape nemodificată. Prin urmare, stabilitatea operațională excelentă a lipazei se menține și la temperaturi mai ridicate, ceea ce este un argument important pentru utilizarea industrială a acestor biocatalizatori.

Creșterea stabilității operaționale la temperaturi mai ridicate reprezintă unul dintre principalele avantaje ale imobilizării. Astfel, în cadrul studiului de termostabilitate a lipazelor imobilizate prin metodele prezentate anterior, s-a observat că valorile activității și enantioselectivității au fost menținute constante pe tot intervalul de temperatură studiat.

Chiar și în condiții mai dure (incubare la 80°C timp de 5 zile), biocatalizatorii obținuți cu lipază B din *Candida antarctica* au prezentat valori ale activității practic neschimbate, pe când enzima nativă a pierdut 50% din activitate după 5 zile. Nu s-au înregistrat diferențe semnificative între tehnicile de imobilizare studiate. De asemenea, enantioselectivitatea lipazei nu a fost afectată, rămânând constantă (exces enantiomeric de 94-95%).

Tipul solventului folosit pentru un anumit tip de reacție este esențial, deoarece acesta afectează atât stabilitatea cât și specificitatea biocatalizatorilor.

Activitatea de transesterificare nu a fost influențată semnificativ de natura solventului în care au fost încubați biocatalizatorii, cu excepția cazului în care lipaza nativă CaLB a fost incubată în 1,4-dioxan, situație în care s-a înregistrat o activare pronunțată. Preparatele enzimatic obținute prin entrapare în sol-gel, respectiv prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție au prezentat activități catalitice ridicate.

Dintre metodele de imobilizare studiate, cele mai bune rezultate s-au înregistrat în cazul entrapării în sol-gel, indiferent de solventul în care au fost încubați biocatalizatorii. Valorile cele mai ridicate ale enantioselectivității s-au obținut în cazul incubării lipazei imobilizate prin entrapare în sol-gel în solvenți polari sau cu polaritate medie (acetona, *terț*-butanol, metil-*terț*-butil eter și toluen).

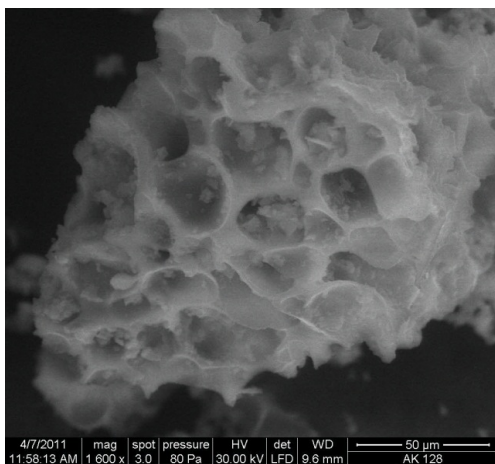
2.4. Caracterizarea morfologică a unor lipaze microbiene immobilizate

În ultimii ani au apărut numeroase studii care s-au concentrat pe caracterizarea fizico-chimică a enzimelor immobilizate prin diferite tehnici în vederea explicării cât mai avansate a proprietăților lor catalitice [182, 194, 195].

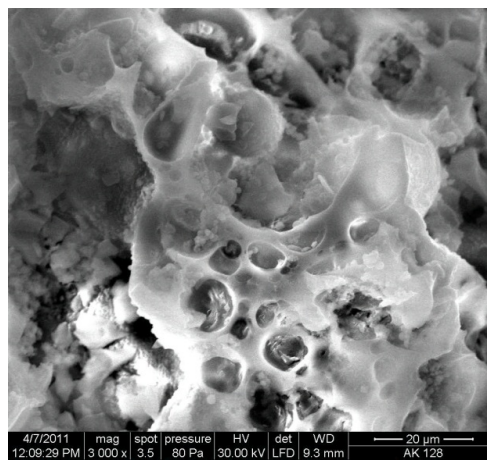
2.4.1. Microscopie electronică de scanare (SEM)

Cu ajutorul microscopiei electronice de scanare (SEM) se pot obține informații importante despre morfologia biocatalizatorilor immobilizați. În cadrul acestui studiu, s-a încercat caracterizarea din punct de vedere textural a biocatalizatorilor obținuți prin entrapare în sol-gel, respectiv prin entrapare combinată cu adsorbție în vederea stabilirii influenței silanilor precursori asupra structurii morfologice a preparatelor enzimatiche.

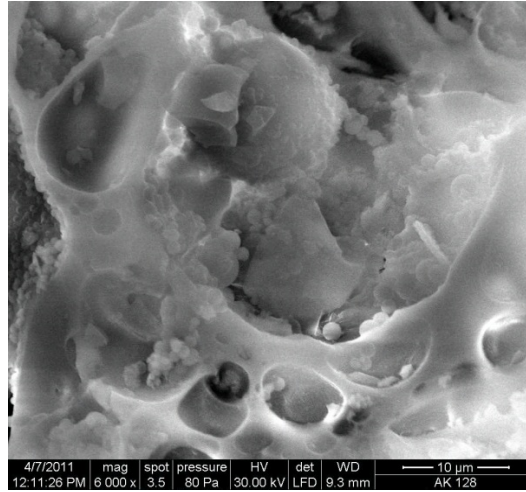
În continuare vor fi discutate imaginile SEM ale lipazei Amano AK din *Pseudomonas fluorescens* immobilizată prin entrapare în sol-gel sau prin metoda combinată folosind un sistem ternar de silani precursori la diferite rapoarte molare și lichidul ionic [Omim]BF₄ ca aditiv. De asemenea, va fi discutată și activitatea catalitică a acestor biocatalizatori.



(a)



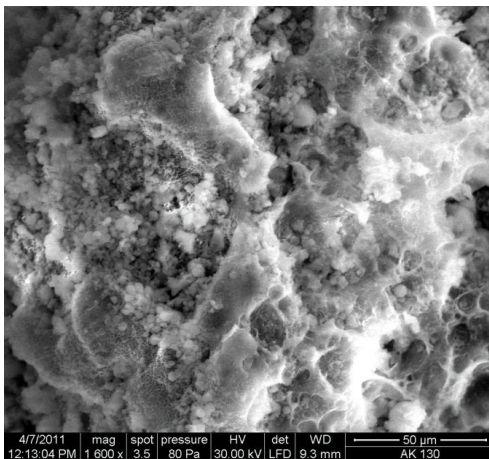
(b)



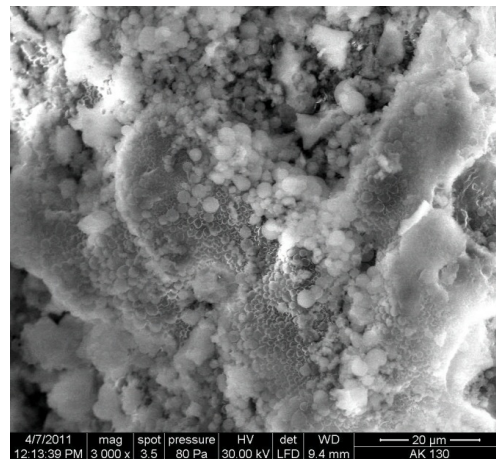
(c)

Figura 2.28. Imaginea SEM a lipazei din *Pseudomonas fluorescens* imobilizată prin entrapare în sol-gel obținută la diferite magnificații: (a) 1600; (b) 3000; (c) 6000. Matricea a fost obținută cu silanii precursori PhTMOS, MeTMOS și TMOS în raport molar de 1:1:1 și lichidul ionic [Ovim]BF₄ ca aditiv.

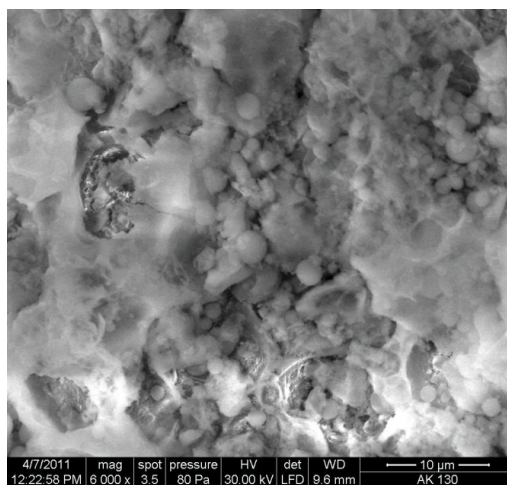
În cazul preparatului enzimatic obținut la un raport molar de 1:1:1 al silanilor precursori s-a obținut o structură poroasă tipică materialelor nanocompozite de tip silice (Figura 2.28). Formarea rețelei tridimensionale este rezultatul înrețelării particulelor de sol formate inițial. Aceasta structură cu pori ordonați este corelată cu o valoare ridicată a activității catalitice, conform subcapitolului 2.1.2, ceea ce înseamnă că substratul poate ajunge cu ușurință în centrul activ al lipazei, fără a exista împiedicare din partea matricii sol-gel.



(a)



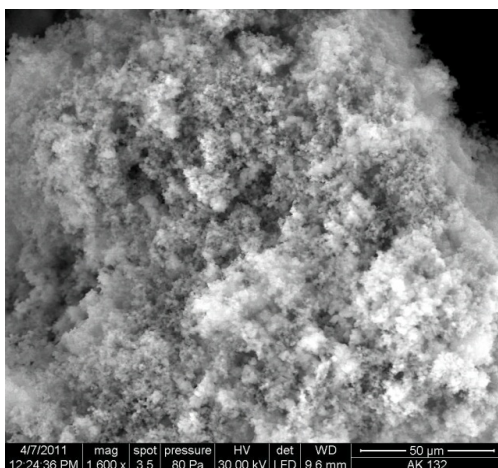
(b)



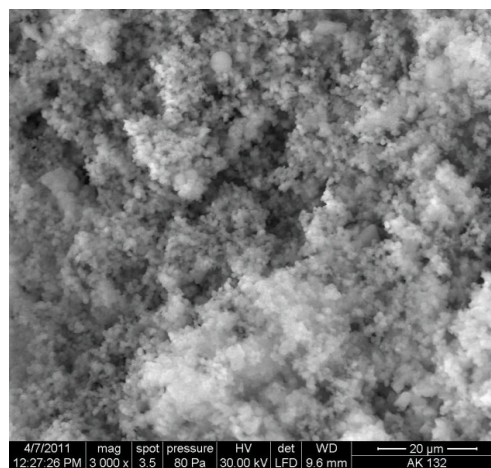
(c)

Figura 2.29. Imaginea SEM a lipazei din *Pseudomonas fluorescens* immobilizată prin entrapare în sol-gel obținută la diferite magnificații: (a) 1600; (b) 3000; (c) 6000. Matricea a fost obținută cu silanii precursori PhTMOS, MeTMOS și TMOS în raport molar de 1,6:0,4:1 și lichidul ionic [Omim]BF₄ ca aditiv.

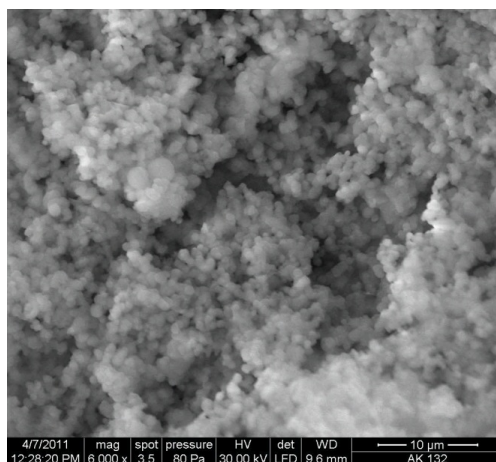
Atunci când la immobilizare s-a folosit un raport molar de 1,6:0,4:1 al silanilor precursori s-a obținut o structură mai compactă a porilor, morfologie care se corelează cu o scădere ușoară a valorii activității de transesterificare (conform subcapitolului 2.1.2) (Figura 2.29).



(a)



(b)



(c)

Figura 2.30. Imaginea SEM a lipazei din *Pseudomonas fluorescens* imobilizată prin entrapare în sol-gel obținută la diferite magnificații: (a) 1600; (b) 3000; (c) 6000. Matricea a fost obținută cu silanii precursori PhTMOS, MeTMOS și TMOS în raport molar de 0,4:1,6:1 și lichidul ionic [Omim]BF₄ ca aditiv.

De asemenea, a fost supus microscopiei de scanare electronică (SEM) și preparatul enzimatic obținut prin entraparea lipazei din *Pseudomonas fluorescens* folosind silanii precursori PhTMOS, MeTMOS și TMOS în raport molar de 0,4:1,6:1. În acest caz se poate observa că se obține o structură compactă, cu pori mici (Figura 2.30). Dintre cele trei preparate enzimatic obținute prin entraparea lipazei Amano AK, cele mai scăzute valori ale activității s-au obținut pentru cel din urmă (subcapitolul 2.1.2) (PhTMOS:MeTMOS:TMOS=0,4:1,6:1), ceea ce se poate explica prin faptul că această structură compactă împiedică accesul substratului la centrul catalitic al lipazei.

În continuare au fost caracterizate din punct de vedere morfologic și preparate obținute prin imobilizarea orin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție a lipazei Amano AK din *Pseudomonas fluorescens*. Utilizarea metodei combinate de entrapare și depunere pe Celite 545 a dus la o structură total diferită a biocatalizatorilor, așa cum era de așteptat. Comparativ, sunt prezentate imaginile SEM obținute pentru suportul solid (Celite 545) și pentru lipaza din *Pseudomonas fluorescens* dublu imobilizată. Matricea sol-gel a fost obținută cu silanii precursori PhTMOS, MeTMOS și TMOS la un raport molar de 1,6:0,4:1, iar ca aditiv s-a utilizat lichidul ionic [Omim]BF₄.

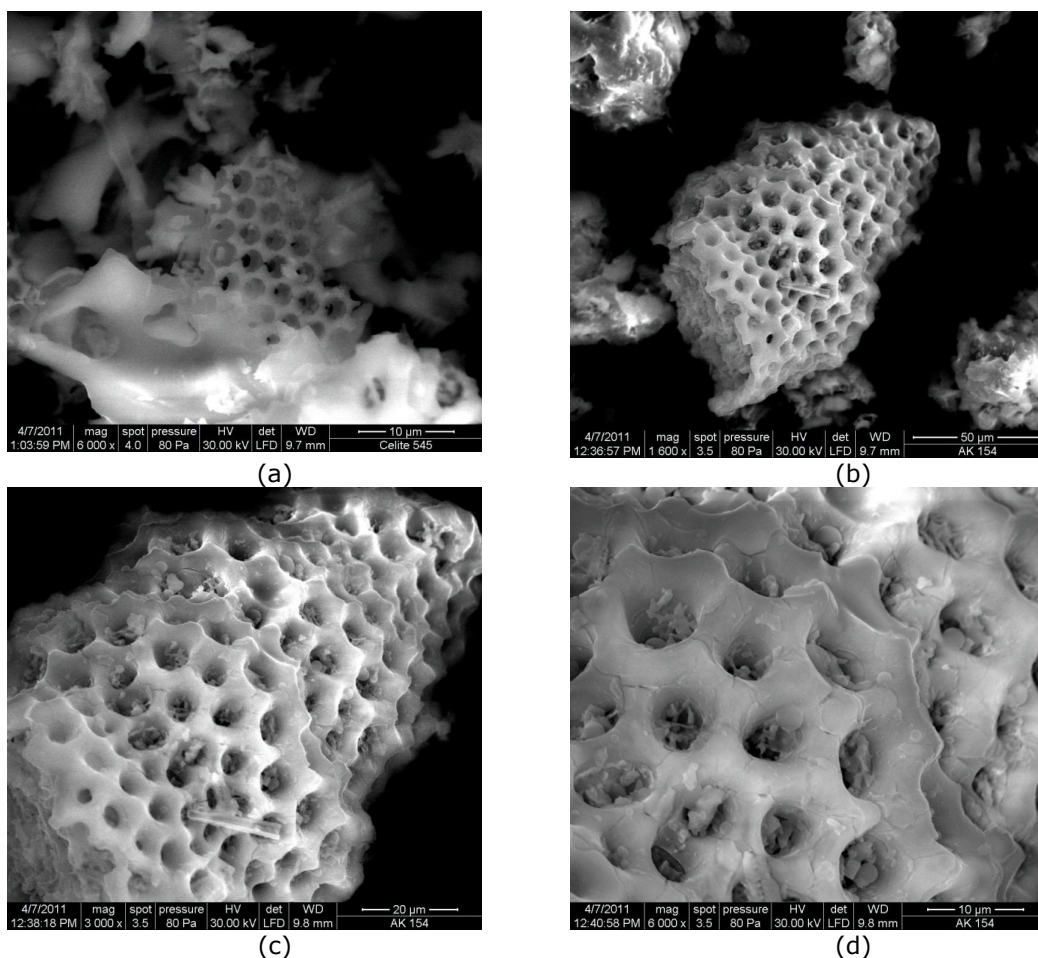


Figura 2.31. Imaginile SEM obținute pentru Celite 545 (a) și pentru lipaza din *Pseudomonas fluorescens* dublu immobilizată. Magnificații: (b) 1600; (c) 3000; (d) 6000. Matricea a fost obținută cu silanii precursori PhTMOS, MeTMOS și TMOS în raport molar de 0,4:1,6:1 și lichidul ionic [Omim]BF₄ ca aditiv.

Din Figura 2.31 se poate observa o structură poroasă ordonată în cazul adsorbentului, iar în cazul biocatalizatorului immobilizat se observă că particulele de sol s-au format pe suprafața suportului, dar și în interiorul porilor, ceea ce poate explica scăderea activității comparativ cu preparatul obținut prin entrapare (subcapitolul 2.1.2). Este posibil ca o mai mare cantitate din lipază să fi fost entrapată în interiorul porilor adsorbentului și doar o mică parte a fost immobilizată la suprafață.

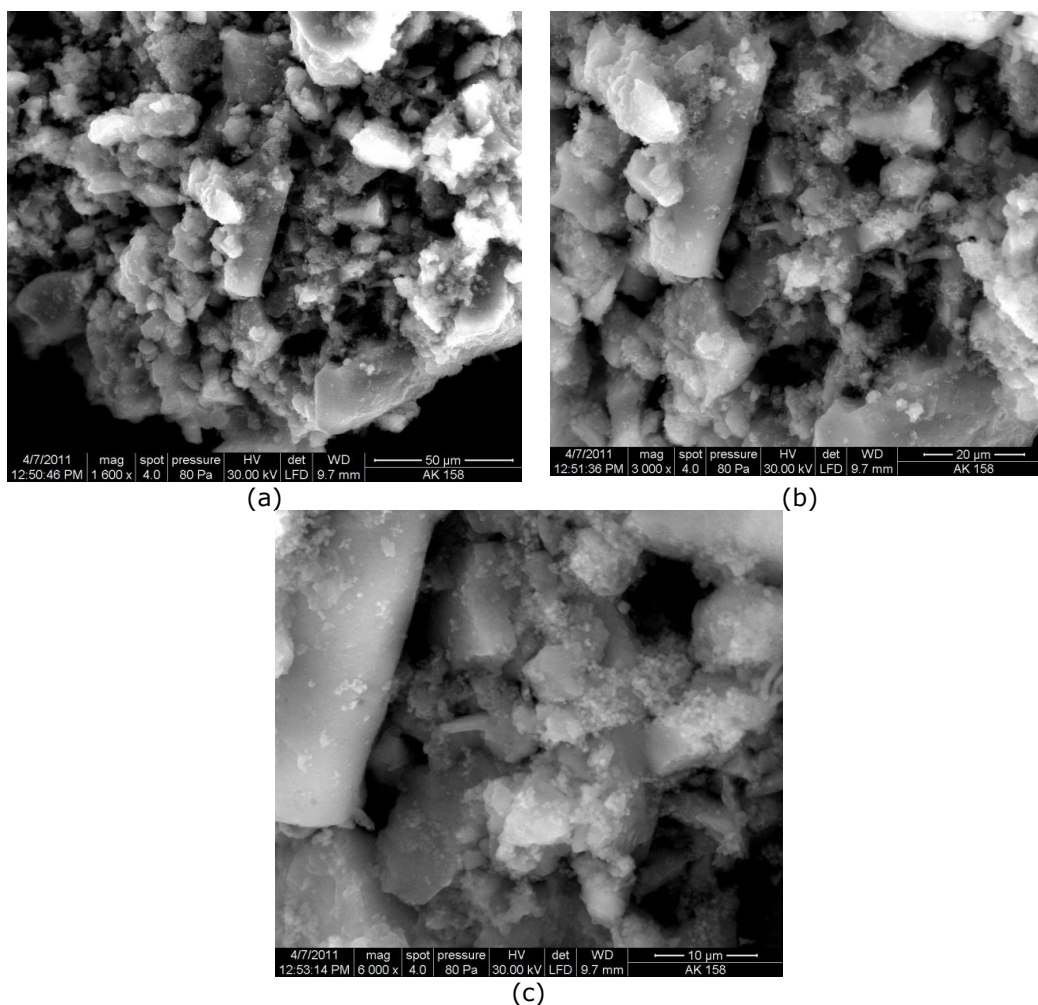


Figura 2.32. Imaginea SEM a lipazei din *Pseudomonas fluorescens* imobilizată prin entrapare în sol-gel obținută la diferite magnificații: (a) 1600; (b) 3000; (c) 6000. Matricea a fost obținută cu silanul precursor TMOS (6 mmoli) și lichidul ionic [Omim]BF₄ ca aditiv.

Dintre preparatele enzimice obținute, cele mai scăzute valori ale activității de transesterificare (0,047 $\mu\text{mol/mg/h}$) s-au obținut atunci când s-a folosit un singur silan precursor, TMOS. De aceea s-a încercat caracterizarea acestui preparat prin microscopie electronică de scanare în vederea stabilirii unei legături între morfologia biocatalizatorului și valoarea activității. Așa cum se poate observa în Figura 2.32, pentru acest preparat s-a obținut o structură amorfă, cu blocuri compacte neregulate, complet diferită de morfologia observată la utilizarea sistemului ternar de silani precursori.

În continuare au fost supuse microscopiei electronice de scanare și preparate obținute cu lipaza din *Candida antarctica* B imobilizată prin entrapare în sol-gel sau prin entrapare combinată cu adsorbție.

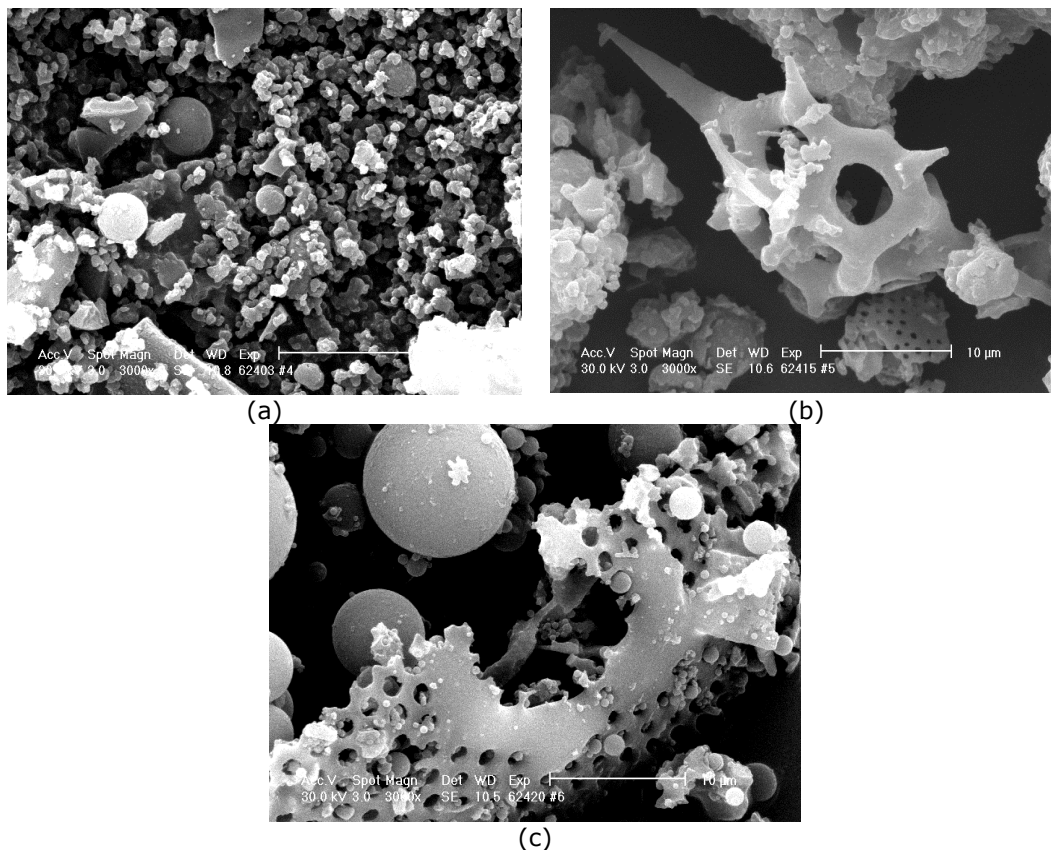


Figura 2.33. Imaginea SEM a lipazei B din *Candida antarctica* (a) immobilizată prin entrapare în sol-gel; (b) immobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (Metoda 1); (c) immobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (Metoda 3). Matricea a fost obținută cu silanii precursori PhTMOS, MeTMOS și TMOS în raport molar de 0,4:1,6:1 și lichidul ionic [Omim]BF₄ ca aditiv. Ca adsorbent s-a folosit Celite 545.

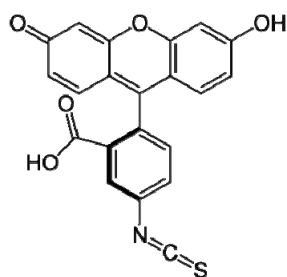
În cazul preparatului enzimatic obținut prin entrapare în matrice sol-gel (a) se poate observa o structură amorfă cu blocuri neregulate, astfel că nu am putut identifica dimensiunile sau distribuția porilor. În Figura 2.33b este prezentată imaginea SEM a lipazei CaLB dublu immobilizată. Se poate observa că particulele sol-gel sunt la suprafața suportului, fapt care se corelează cu valoarea ridicată a activității de transesterificare (subcapitolul 2.1.2) [177]. Este important de menționat că aceste două preparate au fost testate în vederea reutilizării, situație în care s-au obținut rezultate excelente. De asemenea, s-a obținut și o termostabilitate ridicată, lipazele immobilizate păstrându-și activitatea chiar și după ce au fost incubate timp de 5 zile la 80°C (subcapitolele 2.3, 2.4). În Figura 2.33c este prezentată imaginea SEM a preparatului obținut cu lipază B din *Candida antarctica* immobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție conform Metodei 4. Și în această

situație se poate observa o structură cu pori dispuși la suprafața suportului solid, ceea ce explică valorile ridicate ale activității catalitice.

2.4.2. Microscopia cu fluorescență

Microscopia cu fluorescență este o altă metodă folosită pentru caracterizarea din punct de vedere morfologic a enzimelor imobilizate prin diferite tehnici. Această tehnică se utilizează în vederea studierii distribuției enzimei (proteinei) în interiorul matricii de sol-gel.

Din cauză că enzimele studiate nu prezintă fluorescență, este necesară marcarea lor cu un compus fluorocrom. Există mai mulți asemenea compuși, printre care fluorescein izotiocianatul (FITC). FITC este un compus derivat al fluoresceinei care conține o grupare reactivă izotiocianat.



FITC

Acest compus este foarte utilizat la marcarea proteinelor. Gruparea izotiocianat din structura sa reacționează cu grupările amino primare, sulfhidril, imidazoil, tirozil sau carbonil din proteine, peptide sau alte biomolecule.

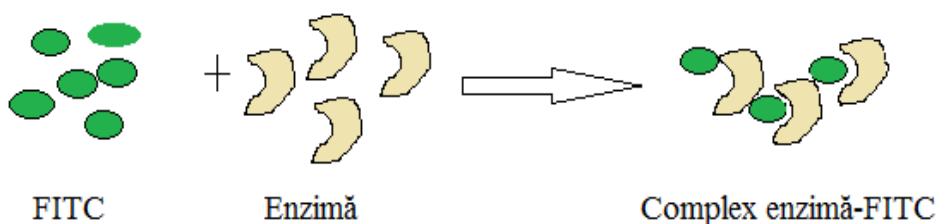


Figura 2.34. Schema generală de obținere a complexului enzimă-FITC.

Pentru acest studiu lipazele din *Pseudomonas fluorescens* și *Candida antarctica* au fost marcate cu FITC și apoi imobilizate prin entrapare în sol-gel sau prin entrapare combinată cu adsorbție. Se va discuta influența silanilor precursori asupra distribuției proteinei în matricea sol-gel, iar acest parametru va fi corelat cu activitatea catalitică în reacția de acilare enantioselectivă a 2-octanolului în mediu de *n*-hexan.

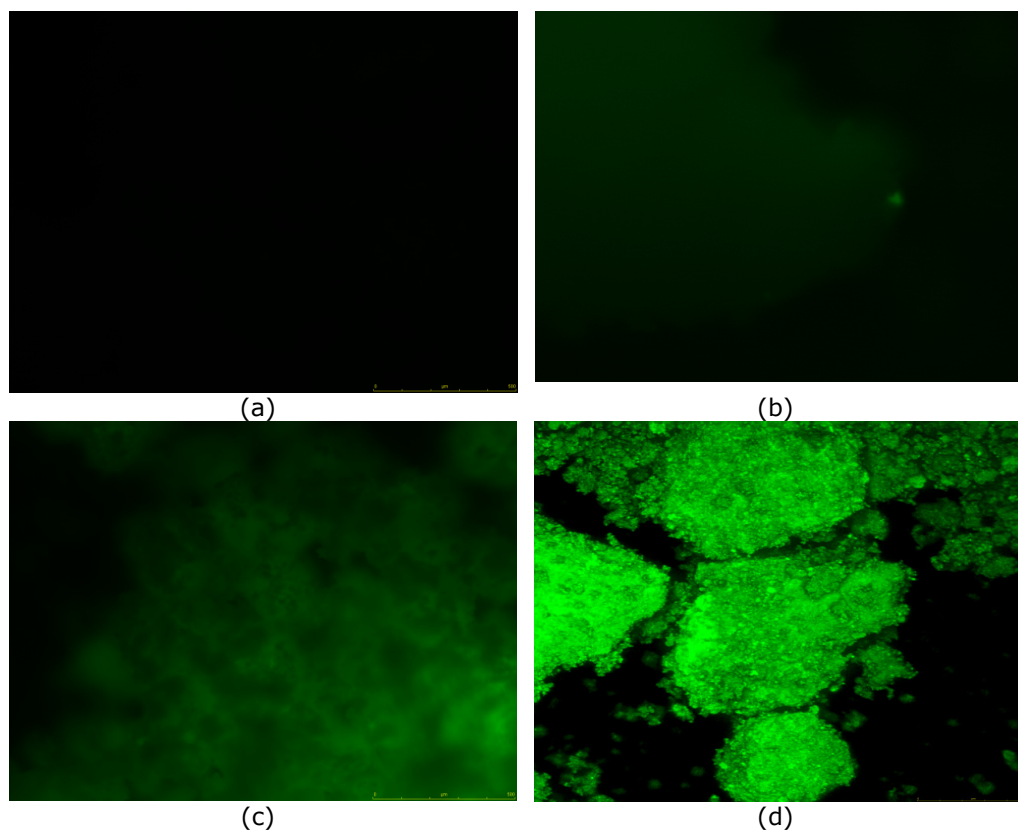


Figura 2.35. Imaginile fluorescente ale preparatelor enzimatiche cu lipaza din *Pseudomonas fluorescens* obținute cu PhTMOs, MeTMOs și TMOs (raport molar 1,6:0,4:1) și [Omim]BF₄ ca aditiv: (a) SG-lipază; (b) SG martor; (c) SG-lipază-FITC; (d) SG-lipază-FITC - scanare.

În Figura 2.35 sunt prezentate comparativ imaginile fluorescente ale preparatului enzimatic obținut cu lipaza din *Pseudomonas fluorescens* entrapată în sol-gel. Se poate observa că doar complexul lipază-FITC prezintă fluorescență, în timp ce aceasta lipsește în cazul preparatelor realizate pentru control. Distribuția agentului de marcare pe toată suprafața matricii sol-gel indică aranjarea uniformă a enzimei în preparatul obținut.

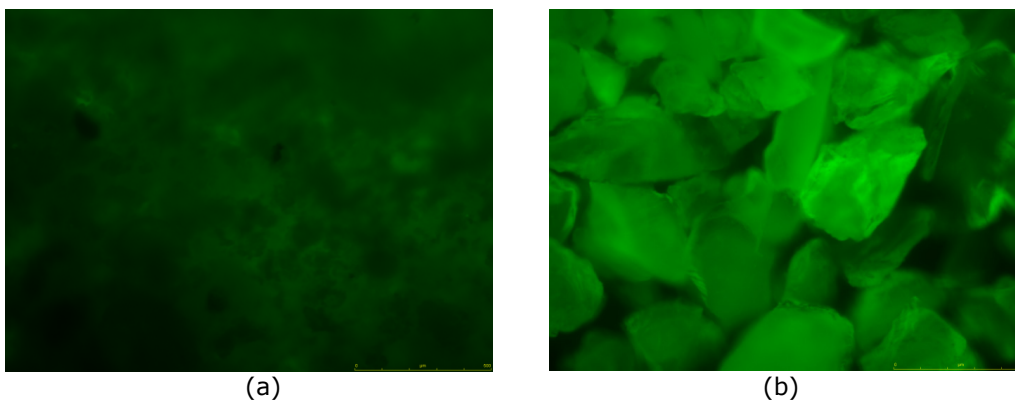


Figura 2.36. Imaginile fluorescente ale preparatelor enzimatiche cu lipaza din *Pseudomonas fluorescens* obținute cu PhTMOS, MeTMOS și TMOS (raport molar 1,6:0,4:1), [Omim]BF₄ ca aditiv și Celite 545 ca adsorbent: (a) SGA-lipază-FITC; (b) SG-lipază – FITC obținut cu 6 mmoli TMOS.

Imaginea fluorescentă a lipazei Amano AK entrapată în matrici de PhTMOS, MeTMOS și TMOS (raport molar de 1,6:0,4:1) și adsorbită pe Celite 545 este prezentată în Figura 2.36. Nu există diferențe semnificative în ceea ce privește fluorescența preparatului obținut prin entrapare în sol-gel și cea a celui obținut prin entrapare combinată cu adsorbție. Din acest motiv, se poate concluziona că valorile diferite ale activității nu depind de distribuția enzimei în interiorul matricii, ci probabil de morfologia acestora.

De asemenea, a fost supus microscopiei de fluorescență și preparatul enzimatic obținut prin entraparea lipazei din *Pseudomonas fluorescens* folosind silanul precursor TMOS (6 mmoli). Ca și în cazul microscopiei electronice de scanare, pentru acest biocatalizator s-a obținut o structură total diferită. Se pot observa particule de dimensiuni mari, compacte, structură care se poate corela cu activitatea scăzută a acestui preparat enzimatic (Figura 2.36b).

Au fost supuse microscopiei de fluorescență și preparate enzimatiche obținute prin imobilizarea lipazei B din *Candida antarctica*. Pentru imobilizare s-au folosit silanii precursori PhTMOS, MeTMOS și TMOS în raport molar de 1,6:0,4:1, polietilenglicolul (PEG) sau lichidul ionic [Omim]BF₄ ca aditivi de imobilizare, iar în cazul metodei combinate, Celite 545 ca adsorbent.

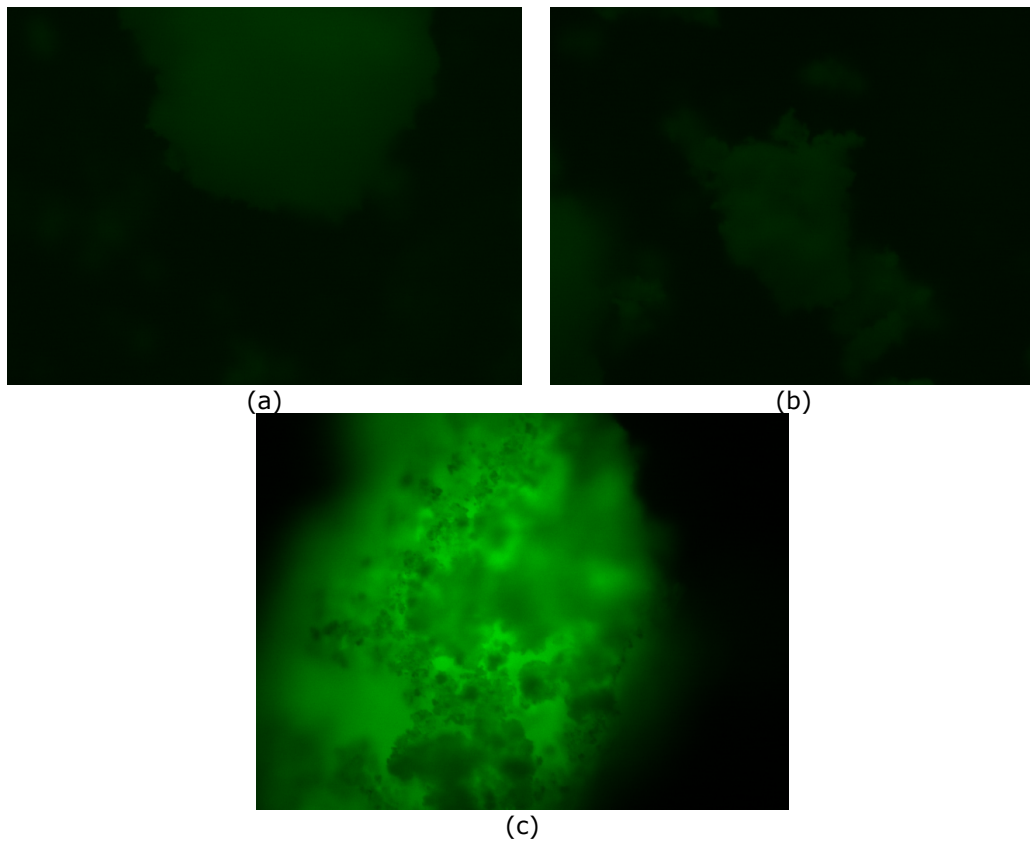


Figura 2.37. Imaginile fluorescente ale preparatelor enzimatiche cu lipaza B din *Candida antarctica* obținute cu PhTMOS, MeTMOS și TMOS (raport molar 1,6:0,4:1) și PEG ca aditiv: (a) SG-lipază; (b) SG martor; (c) SG-lipază-FITC.

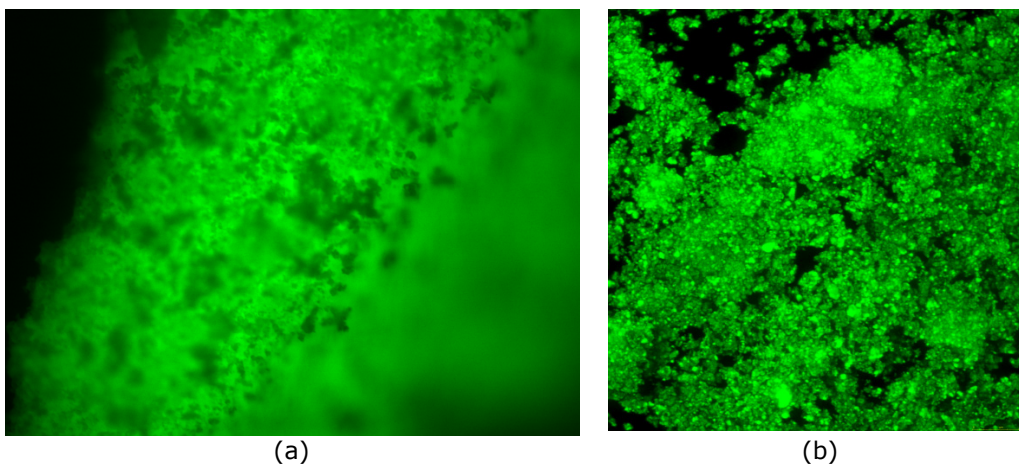


Figura 2.38. Imaginile fluorescente ale preparatelor enzimatiche cu lipaza B din *Candida antarctica* obținute cu PhTMOS, MeTMOS și TMOS (raport molar 1,6:0,4:1) și [Omim]BF₄ ca aditiv: (a) SG-lipază-FITC; (b) SG-lipază-FITC - scanare.

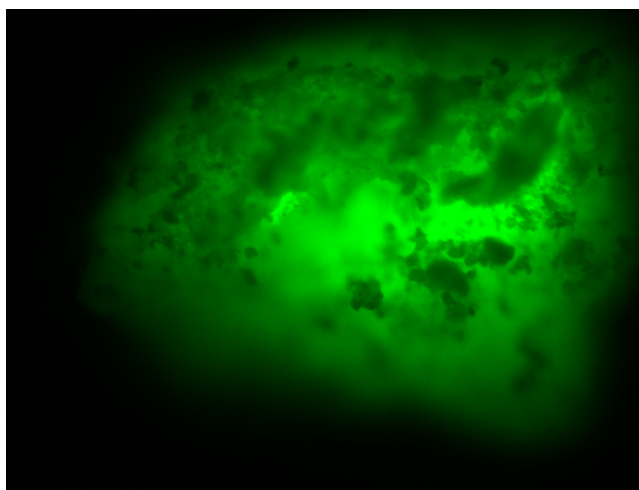


Figura 2.39. Imaginea fluorescentă a preparatului enzimatic cu lipaza B din *Candida antarctica* marcată cu FITC obținut cu PhTMOS, MeTMOS și TMOS (raport molar 1,6:0,4:1).

Și în cazul biocatalizatorilor obținuți prin imobilizarea lipazei B din *Candida antarctica* prin entrapare în sol-gel sau prin entrapare combinată cu adsorbție s-au obținut imagini fluorescente asemănătoare, indiferent de aditivul folosit și de tehnica de imobilizare. În toate situațiile se poate observa o structură poroasă, cu o distribuție uniformă a complexului lipază-FITC în interiorul matricii sol-gel, ceea ce explică rezultatele foarte bune ale activității și enantioselectivității [177].

2.4.3. Determinarea suprafeței specifice cu ajutorul metodei BET

Denumită după Stephen Brauner, P. H. Emmet și Edward Teller, metoda BET este prima metodă dezvoltată pentru măsurarea suprafeței specifice a solidelor poroase.

Suprafața specifică BET, diametrul porilor și volumul microporilor determinate pentru unele preparate enzimaticе obținute cu lipazele din *Candida antarctica* B și *Pseudomonas fluorescens* sunt prezentate în Tabelele 2.44 și 2.45:

Tabelul 2.44. Caracteristicile fizico-chimice ale unor preparate enzimaticе obținute cu lipaza din *Candida antarctica* B ([Omim]BF₄ ca aditiv)

Precursori	D _p Adsorpție (nm)	D _p Desorpție (nm)	S _{BET} (m ² /g)	V _{total} (cm ³ /g)	Izotermă
PhTMOS:MeTMOS: TMOS=1:1:1	4,23	3,71	7,70	0,010	III
PhTMOS:MeTMOS: TMOS=1,6:0,4:1	2,92	1,94	3,82	0,006	III
PhTMOS:MeTMOS: TMOS=0,4:1,6:1	4,20	3,86	343,78	0,374	IV
PhTMOS:MeTMOS: TMOS=1,6:0,4:1 0,5 g Celite 545	4,23	3,41	5,06	0,006	III

Așa cum reiese din Tabelul 2.44, diametrul porilor preparatelor testate au valori cuprinse între 2-50 nm, care conform IUPAC corespund substanțelor mezoporoase [194]. Valorile suprafeței specifice BET sunt foarte variate, acoperind un domeniu mare de valori (3,82-485,52 m²/g).

Izotermă de tipul III

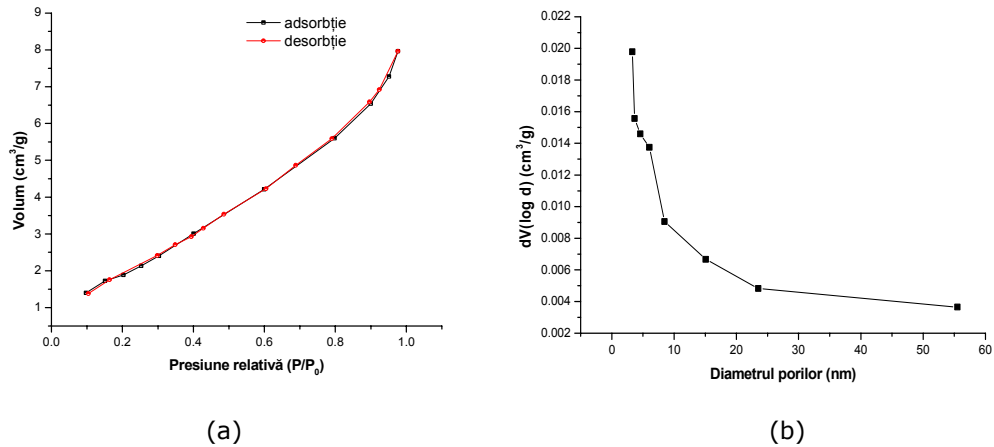


Figura 2.40. Izoterma adsorbție-desorbție (a) și distribuția porilor (b) obținute pentru preparatul enzimatic cu lipaza din *Candida antarctica* B (PhTMOS:MeTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 și [Omim]BF₄ ca aditiv).

Izotermă de tipul IV, histereză H3 - slit-like pores

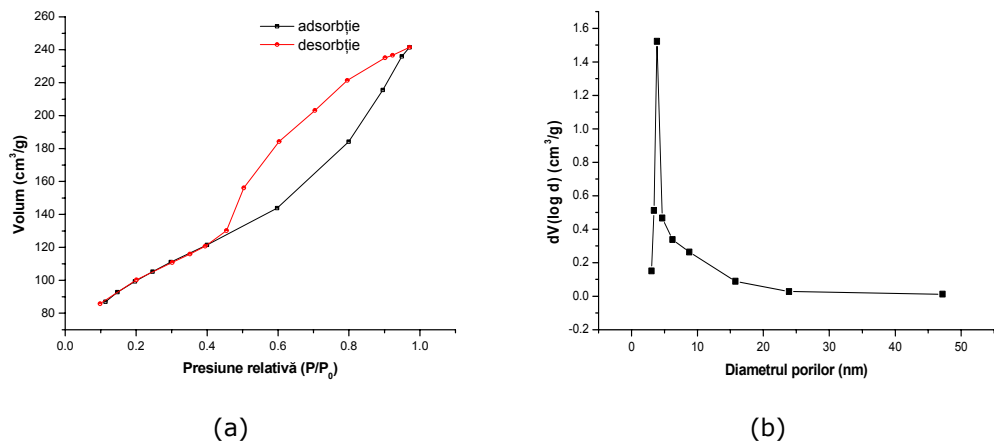


Figura 2.41. Izoterma adsorbție-desorbție (a) și distribuția porilor (b) obținute pentru preparatul enzimatic cu lipaza din *Candida antarctica* B (PhTMOS:MeTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 și [Omim]BF₄ ca aditiv).

Din Figura 2.40a ce prezintă izoterma de adsorbție-desorbție a preparatului cu CALB (obținut cu sistem ternar de silani precursori PhTMOS:MeTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 și lichid ionic ca aditiv) se poate observa (conform clasificării IUPAC a izotermelor de adsorbție-desorbție [195]) prezența unei izoterme de tip III, caracteristică substanțelor neporoase sau cu număr redus de pori. În acest caz interacțiunile adsorbat-adsorbent joacă un rol important. Distribuția porilor determinată prin metoda Barrett-Joyner-Halenda (BJH) (Figura 2.40b)

demonstrează o distribuție uniformă a diametrului porilor 2-50 nm, specific mezoporilor, cu valori centrate în jurul a 3 nm.

În cazul modificării raportului molar dintre silanii precursori (PhTMOS:MeTMOS:TMOS 0,4:1,6:1), conform Figurii 2.41a se observă prezența unei izoterme adsorbție-desorbție de tip IV ce prezintă o histereză H3 caracteristică substanțelor poroase cu structură a porilor în formă de sticlă de cerneală „ink-bottle pores”. Prezența acestui tip de histereză se corelează cu o suprafață specifică mare Tabelul 2.44.

Distribuția porilor determinată prin metoda (BJH) (Figura 2.41b) demonstrează o distribuție uniformă a diametrului porilor 2-50 nm, prezentând o valoare maximă la 4 nm.

Tabelul 2.45. Caracteristicile fizico-chimice ale unor preparate enzimaticе obținute cu lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (precursori OcTMOS:TMOS în raport molar de 1:1)

Raport molar lichid ionic/silani precursori	D _p Adsorbție (nm)	D _p Desorbție (nm)	S _{BET} (m ² /g)	V _{total} (cm ³ /g)	Izotermă
0,064	4,19	3,75	6,70	0,002	III
0,129	4,20	3,72	7,52	0,014	III
0,193	4,19	3,74	11,06	0,016	IV
0,257	4,24	3,30	1,69	0,004	III
0,322	4,25	3,01	2,85	0,006	III

Din Tabelul 2.45 se observă o creștere a suprafeței specifice odată cu raportul molar dintre lichidul ionic și silanii precursori, atingând valoarea maximă la un raport 0,193, după care are loc o scădere pronunțată până la sub 3 m²/g. În figurile 2.42 și 2.43 sunt prezentate izotermele adsorbție-desorbție și distribuția porilor pentru preparatele obținute la un raport molar IL/silani precursori 0,193 și 0,322.

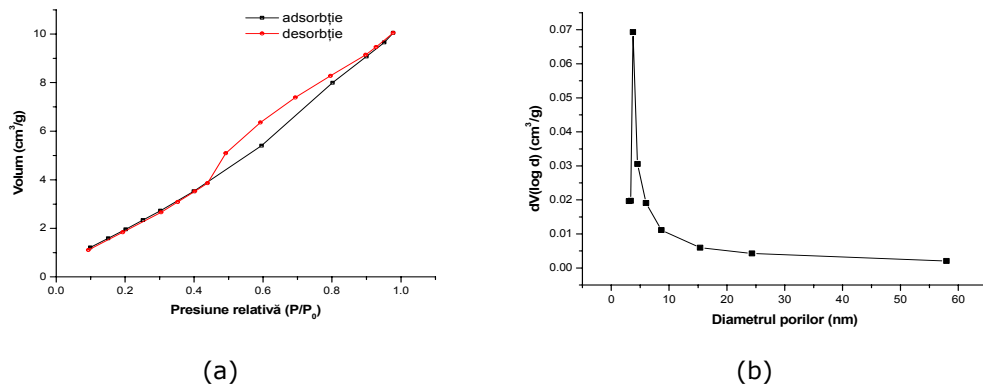
Izotermă de tipul IV, histereză H3 - *slit-like pores*

Figura 2.42. Izoterma adsorbție-desorbție (a) și distribuția porilor (b) obținute pentru preparatul enzimatic cu lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (OcTMOS:TMOS=1:1 și raport molar IL/silani precursori 0,193).

Izotermă de tipul III

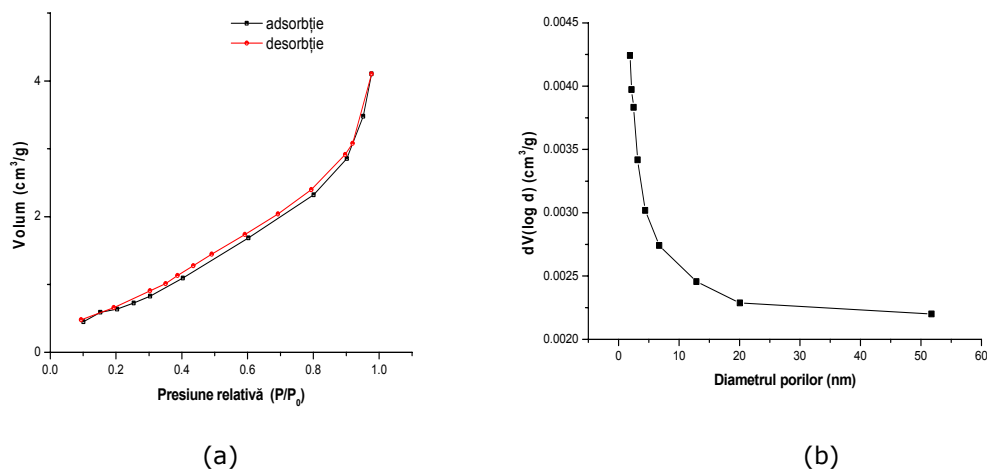


Figura 2.43. Izoterma adsorbție-desorbție (a) și distribuția porilor (b) obținute pentru preparatul enzimatic cu lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (OcTMOS:TMOS=1:1 și raport molar IL/silani precursori 0,322).

Preparatul cu raport molar IL/silani precursori de 0,193 prezintă o izotermă de tip IV cu histereză H3 specifică substanțelor poroase cu structură a porilor în formă de sticlă de cerneală „ink-bottle pores” (Figura 2.42). Prezența acestui tip de histereză se corelează cu o suprafață specifică mai mare comparativ cu celelalte preparate enzimatiche (Tabelul 2.45).

În cazul creșterii raportului molar între aditiv și silanii precursori se obține o izotermă de tip III (Figura 2.43) caracteristică substanțelor neporoase sau cu număr redus de pori.

Distribuția porilor determinată prin metoda (BJH) (Figura 2.42b și 2.43b) demonstrează o distribuție uniformă a diametrului porilor 2-50 nm, cu valori centrate în jurul a 4 nm.

2.4.4. Concluzii parțiale

Caracterizarea morfologică a lipazelor immobilizate prin diferite tehnici este foarte importantă deoarece poate oferi informații privind structura biocatalizatorilor care se pot corela cu proprietățile catalitice.

În urma analizei prin microscopie electronică de scanare (SEM) s-a observat o structură poroasă tipică materialelor nanocompozite de tip silice. Formarea rețelei tridimensionale este rezultatul înrețelării particulelor de sol formate inițial. Aceasta structură cu pori ordonați este corelată cu o valoare ridicată a activității catalitice, ceea ce înseamnă că substratul poate ajunge cu ușurință în centrul activ al lipazei, fără a exista împiedicare din partea matricii sol-gel. În cazul preparatului obținut la entraparea în matrici de TMOS a lipazei din *Pseudomonas fluorescens* s-a obținut o structură diferită, formată din blocuri compacte, aceasta explicând parțial valoarea scăzută a activității catalitice.

Analiza prin microscopie de fluorescență a demonstrat o distribuție uniformă a lipazei în interiorul matricii sol-gel indiferent de aditivul folosit sau de tehnica de imobilizare.

În urma analizei BET s-a obținut în cazul tuturor preparatelor enzimactice testate un diametru al porilor cuprins între 2-50 nm, care conform IUPAC corespunde substanțelor mezoporoase. Valorile suprafeței specifice BET sunt foarte variate, acoperind un domeniu larg.

3. PARTEA EXPERIMENTALĂ

3.1. Metode de imobilizare a lipazelor

Materiale

În studiile de imobilizare s-au utilizat: tetrametoxisilan TMOS 98% (Merck), metiltrimetoxisilan MeTMOS 98% (Merck), octiltrimetoxisilan OctTMOS 95% (Fluka), feniltrimetoxisilan PhTMOS 99% (Fluka), viniltrimetoxisilan VTMOS 97% (Merck), alcool izopropilic 99,7% (Chimopar), acid clorhidric 1M (Chimopar), amoniac soluție 25% (Chimopar) polietilenglicol (PEG M=20000 de la Fluka), fluorură de sodiu (Fluka), tampon TRIS-HCl tris-(hidroximetil)-aminoetan de pH=8,0, Celite 545 (Merck), Celite 521 (Aldrich), Celite C22 (Loba Chemie), carbonat de calciu (Loba Chemie), Purolite MN200 108/02/5 (Purolite), Celuloză Avicel PH-101 (Aldrich), n-hexan 98% (Merck).

Lichide ionice: tetrafloroborat de 1-etil-3-metil imidazoliu EmimBF₄ (Merck), tetrafloroborat de 1-hexil-3-metil imidazoliu HmimBF₄ (Merck), tetrafloroborat de 1-octil-3-metil imidazoliu OmimBF₄ (Merck), hexaflorofosfat de 1-butil-3-metil imidazoliu BmimPF₆ (Merck), acetat de 1-etil-3-metil imidazoliu EmimCOOCH₃ (Aldrich), trifloroacetat de 1-etil-3-metil imidazoliu EmimCOOCF₃ (Aldrich), bis[(trifluorometil)sulfonil] amida de 1-butil-3-metil imidazoliu BmimTf₂N (Aldrich).

Enzimele folosite au fost: lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (AMANO AK de la Aldrich), *Burkholderia cepacia* (AMANO PS de la Aldrich) și *Candida antarctica* B (C-Lecta).

3.1.1. Imobilizarea prin entrapare în sol-gel

Metoda 1

S-a preparat o soluție de lipază (120 mg/ ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0), care a fost menținută la agitare (700 prm) timp de 30 minute. Soluția rezultată a fost centrifugată, iar supernatantul a fost folosit pentru imobilizare.

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 1 ml supernatant de lipază, 200 μl soluție lichid ionic sau PEG, 100 μl soluție fluorură de sodiu 1 M și 200 μl alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menținut 30 minute pe agitatorul magnetic pentru omogenizare, după care s-au introdus precursorii silanici (6 mmoli) la diferite rapoarte molare cu menținerea agitării până la gelificare.

Gelul obținut a fost păstrat în frigider timp de 24 de ore, pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost spălat cu 7 ml alcool izopropilic, 5 ml apă distilată, 5 ml alcool izopropilic și 5 ml n-hexan, după care s-a filtrat pe frită. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei 24 de ore și la etuva de vid timp de 24 de ore.

Prin această metodă de imobilizare s-au obținut 16 preparate enzimatiche cu lipază Amano AK, 9 preparate cu lipază Amano PS și 27 preparate cu lipază CaLB.

Tabelul 3.1. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu lipază Amano AK obținute prin Metoda 1.

Cod	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
AK1	133,63	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1:1:1	NaF, PEG	478,6
AK2	133,63	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1:1:1	NaF, [Omim]BF ₄	508,7
AK3	133,63	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	NaF, PEG	666,1
AK4	133,63	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	NaF, [Omim]BF ₄	605,1
AK5	133,63	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =0,4:1,6:1	NaF, PEG	433,1
AK6	133,63	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =0,4:1,6:1	NaF, [Omim]BF ₄	441,5
AK7	123,31	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1:1:1	NaF, [Emim]BF ₄	528,6
AK8	123,31	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	NaF, [Emim]BF ₄	559,7
AK9	123,31	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =0,4:1,6:1	NaF, [Emim]BF ₄	462,5
AK10	78,0	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Omim]BF ₄ (100 μl)	466,2
AK11	78,0	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Omim]BF ₄ (200 μl)	496,1
AK12	78,0	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Omim]BF ₄ (300 μl)	502,2
AK13	78,0	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Omim]BF ₄ (400 μl)	531,9
AK14	78,0	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Omim]BF ₄ (500 μl)	554,4
AK15	108,9	TMOS	NaF, PEG	453,7
AK16	108,9	TMOS	NaF, [Omim]BF ₄	464,7

Tabelul 3.2. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu lipază Amano PS obținute prin Metoda 1.

Cod	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
PS1	27,83	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1:1:1	NaF, PEG	506,4
PS2	27,83	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1:1:1	NaF, [Omim]BF ₄	532,1
PS3	27,83	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	NaF, PEG (200 μl)	480,8
PS4	27,83	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	NaF, [Omim]BF ₄	649,8
PS5	27,83	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =0,4:1,6:1	NaF, PEG	467,0
PS6	27,83	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =0,4:1,6:1	NaF, [Omim]BF ₄	518,3
PS7	32,19	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1:1:1	NaF, [Emim]BF ₄	526,0

150 Partea experimentală - 3

PS8	32,19	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	NaF, [Emim]BF ₄	586,4
PS9	32,19	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =0,4:1,6:1	NaF, [Emim]BF ₄	468,0

Tabelul 3.3. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu lipază CALB obținute prin Metoda 1.

Cod	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
CAL1	139,33	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1:1:1	NaF, PEG	700,7
CAL2	139,33	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1:1:1	NaF, [Omim]BF ₄	543,8
CAL3	139,33	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	NaF, PEG	540,8
CAL4	139,33	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	NaF, [Omim]BF ₄	622,8
CAL5	139,33	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 0,4:1,6:1	NaF, PEG	481,6
CAL6	139,33	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 0,4:1,6:1	NaF, [Omim]BF ₄	523,4
CAL7	118,47	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1:1:1	NaF, [Emim]BF ₄	554,4
CAL8	118,47	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	NaF, [Emim]BF ₄	588,9
CAL9	118,47	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 0,4:1,6:1	NaF, [Emim]BF ₄	534,8
CAL10	118,47	PhTMOS:DMeDMOS:TMOS= 1:1:1	NaF, PEG	253,1
CAL11	118,47	PhTMOS:DMeDMOS:TMOS= 1:1:1	NaF, [Omim]BF ₄	651,5
CAL12	118,47	PhTMOS:DMeDMOS:TMOS= 1:1:1	NaF, [Emim]BF ₄	402,1
CAL13	104,48	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	NaF, EmimBF ₄	617,6
CAL14	104,48	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	NaF, HmimBF ₄	632,6
CAL15	104,48	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	NaF, BmimPF ₆	668,2
CAL16	104,48	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	NaF, EmimCOOCH ₃	671,7
CAL17	104,48	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	NaF, EmimCOOCF ₃	720,7
CAL18	104,48	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	NaF, BmimTf ₂ N	702,7
CAL19	77,24	VTMOS:TMOS=1:1	NaF, OmimBF ₄	528,2
CAL20	77,24	VTMOS:TMOS=2:1	NaF, OmimBF ₄	529,0
CAL21	77,24	PhTMOS:VTMOS:TMOS= 1:1:1	NaF, OmimBF ₄	574,0
CAL22	77,24	PhTMOS:VTMOS:TMOS=	NaF, OmimBF ₄	604,0

CAL23	77,24	1,6:0,4:1 PhTMOS:VTMOS:TMOS= 0,4:1,6:1	NaF, OmimBF ₄	505,6
CAL24	63,04	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	NaF, OmimBF ₄	580,5
CAL25	78,48	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	NaF, OmimBF ₄	597,3
CAL26	114,36	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	NaF, OmimBF ₄	660,7
CAL27	121,32	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	NaF, OmimBF ₄	634,2

Metoda 2

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-a preparat un SOL prepolimer prin amestecarea timp de o oră pe un agitator magnetic a 3 mmoli precursori silanici la diferite rapoarte molare, 0,2 ml apă distilată și 30 μ l acid clorhidric 0,04M.

S-a preparat o soluție de enzimă (120 mg/ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0), care a fost menținută la agitare (700 rpm) timp de 30 minute. Soluția rezultată a fost centrifugată, iar supernatantul a fost folosit pentru imobilizare.

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 1 ml supernatant de lipază, 200 μ l soluție lichid ionic și 200 μ l alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menținut 30 minute pe agitatorul magnetic (600 rpm) pentru omogenizare.

SOL-ul apos obținut s-a trecut într-o fiolă de sticlă de 8 ml și s-au mai introdus sub agitare 1,4 ml soluție de lipază și 100 μ l amoniac 25%. Agitarea s-a menținut până când amestecul a gelificat. Gelul obținut a fost păstrat la temperatura camerei 24 de ore pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost spălat cu 7 ml alcool izopropilic, 5 ml apă distilată, 5 ml alcool izopropilic și 5 ml n-hexan, după care s-a filtrat pe frită. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei timp de o zi, apoi la etuva de vid la 25°C timp de o zi.

Prin această metodă de imobilizare s-au obținut 7 preparate enzimatiche cu lipază CALB.

Tabelul 3.4. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu lipază CALB obținute prin Metoda 2.

Cod	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
CAL28	106,39	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	EmimBF ₄	257,3
CAL29	106,39	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	HmimBF ₄	234,8
CAL30	106,39	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	BmimPF ₆	212,6
CAL31	106,39	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	EmimCOOCH ₃	267,5
CAL34	106,39	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	EmimCOOCF ₃	244,2
CAL35	106,39	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	BmimTf ₂ N	251,1
CAL36	104,48	PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	OmimBF ₄	235,8

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

Metoda 3

S-a preparat o soluție de lipază (120 mg/ ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0), care a fost menținută la agitare (700 prm) timp de 30 minute. Soluția rezultată a fost centrifugată, iar supernatantul a fost folosit pentru imobilizare.

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 1 ml supernatant de lipază, 200 μ l soluție lichid ionic sau PEG, 100 μ l soluție fluorură de sodiu 1 M și 200 μ l alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menținut 30 minute pe agitatorul magnetic pentru omogenizare, după care s-au introdus precursorii silanici (6 mmoli) la diferite rapoarte molare cu menținerea agitării până la gelifiere, moment în care s-a introdus 0,5 g Celite 545.

Gelul obținut a fost păstrat la temperatura camerei timp de 24 de ore, pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost spălat cu 7 ml alcool izopropilic, 5 ml apă distilată, 5 ml alcool izopropilic și 5 ml n-hexan, după care s-a filtrat pe frită. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei 24 de ore și la etuva de vid timp de 24 ore.

Prin această metodă de imobilizare s-au obținut 12 preparate enzimaticice cu lipază Amano AK, 9 preparate cu lipază Amano PS și 24 preparate cu lipază CALB.

Tabelul 3.5. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu lipază Amano AK obținute prin Metoda 3.

Cod	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Suport solid (0,5 g)	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
AK17	123,31	PhTMOS:MeTMOS:TMOS = 1:1:1		NaF, PEG	1039,0
AK18	123,31	PhTMOS:MeTMOS:TMOS = 1:1:1		NaF,[Omim]BF ₄	1023,8
AK19	123,31	PhTMOS:MeTMOS:TMOS = 1,6:0,4:1		NaF, PEG	962,1
AK20	123,31	PhTMOS:MeTMOS:TMOS = 1,6:0,4:1		NaF,[Omim]BF ₄	1140,6
AK21	123,31	PhTMOS:MeTMOS:TMOS = 0,4:1,6:1	Celite 545	NaF, PEG	922,5
AK22	123,31	PhTMOS:MeTMOS:TMOS = 0,4:1,6:1		NaF,[Omim]BF ₄	798,9
AK23	107,25	PhTMOS:MeTMOS:TMOS = 1:1:1		NaF,[Emim]BF ₄	1125,8
AK24	107,25	PhTMOS:MeTMOS:TMOS = 1,6:0,4:1		NaF,[Emim]BF ₄	1074,7
AK25	107,25	PhTMOS:MeTMOS:TMOS = 0,4:1,6:1		NaF,[Emim]BF ₄	996,8
AK26	78	OcTMOS:TMOS=1:1	Celite 545 (0,5 g)	NaF, Omim]BF ₄	933,2
AK27	78	OcTMOS:TMOS=1:1	Celite 545 (1,0 g)	NaF, Omim]BF ₄	1415,3
AK28	78	OcTMOS:TMOS=1:1	Celite 545 (1,5 g)	NaF, Omim]BF ₄	1998,5

Tabelul 3.6. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu lipază Amano PS obținute prin Metoda 3.

Cod	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Suport solid (0,5 g)	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
PS10	32,19	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=1:1:1		NaF, PEG	995,5
PS11	32,19	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=1:1:1		NaF, [Omim]BF ₄	1016,9
PS12	32,19	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=1,6:0,4:1		NaF, PEG	996,2
PS13	32,19	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=1,6:0,4:1		NaF, [Omim]BF ₄	1060,2
PS14	32,19	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=0,4:1,6:1	Celite 545	NaF, PEG	837,9
PS15	32,19	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=0,4:1,6:1		NaF, [Omim]BF ₄	972,0
PS16	22,38	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=1:1:1		NaF, [Emim]BF ₄	1023,9
PS17	22,38	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=1,6:0,4:1		NaF, [Emim]BF ₄	1049,5
PS18	22,38	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=0,4:1,6:1		NaF, [Emim]BF ₄	983,8

Tabelul 3.7. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu lipază CALB obținute prin Metoda 3.

Cod	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Suport solid (0,5 g)	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
CAL37	118,47	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=1:1:1		NaF, PEG	1039,8
CAL38	118,47	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=1:1:1		NaF, [Omim]BF ₄	919,0
CAL39	118,47	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=1,6:0,4:1		NaF, PEG	969,3
CAL40	118,47	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=1,6:0,4:1		NaF, [Omim]BF ₄	1005,6
CAL41	118,47	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=0,4:1,6:1	Celite 545	NaF, PEG	902,9
CAL42	118,47	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=0,4:1,6:1		NaF, [Omim]BF ₄	1023,7
CAL43	112,58	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=1:1:1		NaF, [Emim]BF ₄	1074,1
CAL44	112,58	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=1,6:0,4:1		NaF, [Emim]BF ₄	1067,8
CAL45	112,58	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=0,4:1,6:1		NaF, [Emim]BF ₄	971,7
CAL46	99,79	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=1,6:0,4:1	Celite 521	NaF, [Omim]BF ₄	1102,1
CAL47	99,79	PhTMOS:MeTMOS:TMOS=	Celite	NaF, [Omim]BF ₄	1117,3

154 Partea experimentală - 3

CAL48	99,79	1,6:0,4:1 PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	C22 CaCO ₃	NaF, [Omim]BF ₄	1107,6
CAL49	99,79	1,6:0,4:1 PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	Purolite MN200	NaF, [Omim]BF ₄	883,4
CAL50	99,79	1,6:0,4:1 PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	Celuloză Avicel	NaF, [Omim]BF ₄	1096,0
CAL51	104,48	1,6:0,4:1 PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1		NaF, EmimBF ₄	1144,2
CAL52	104,48	1,6:0,4:1 PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1		NaF, HmimBF ₄	1109,6
CAL53	104,48	1,6:0,4:1 PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1		NaF, BmimPF ₆	1090,0
CAL54	104,48	1,6:0,4:1 PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1	Celite 545	NaF, EmimCOOCH ₃	1101,1
CAL55	104,48	1,6:0,4:1 PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1		NaF, EmimCOOCF ₃	1072,4
CAL56	104,48	1,6:0,4:1 PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1		NaF, BmimTf ₂ N	1085,4
CAL57	63,04	1,6:0,4:1 PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1		NaF, OmimBF ₄	906,0
CAL58	78,48	1,6:0,4:1 PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1		NaF, OmimBF ₄	1081,4
CAL59	114,36	1,6:0,4:1 PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1		NaF, OmimBF ₄	1084,4
CAL60	121,32	1,6:0,4:1 PhTMOS:MeTMOS:TMOS= 1,6:0,4:1		NaF, OmimBF ₄	1081,9

Metoda 4

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-a preparat un SOL prepolimer prin amestecarea timpde o oră pe un agitator magnetic a 3 mmoli precursori silanici la diferite rapoarte molare, 0,2 ml apă distilată și 30 μ l acid clorhidric 0,04M. S-a preparat o soluție de enzimă (120 mg/ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0), care a fost menținută la agitare (700 prm) timp de 30 minute Soluția rezultată a fost centrifugată, iar supernatantul a fost folosit pentru imobilizare.

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 1 ml supernatant de lipază, 200 μ l soluție lichid ionic și 200 μ l alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menținut 30 minute pe agitatorul magnetic (600 rpm) pentru omogenizare.

SOL-ul apos obținut s-a trecut într-o fiolă de sticlă de 8 ml și s-au mai introdus sub agitare 1,4 ml soluție de lipază și 100 μ l amoniac 25%. Agitarea s-a menținut până când amestecul a gelificat, moment în care s-au adăugat 0,5 g suport solid. Gelul obținut a fost păstrat la temperatura camerei 24 de ore pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost spălat cu 7 ml alcool izopropilic, 5 ml apă distilată, 5 ml alcool izopropilic și 5 ml n-hexan, după care s-a filtrat pe frită. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei timp de o zi, apoi la etuva de vid la 25°C timp de o zi.

Prin această metodă de imobilizare s-au obținut 9 preparate enzimaticice cu lipază Amano AK și 18 preparate cu lipază CALB.

Tabelul 3.8. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu lipază Amano AK obținute prin Metoda 4.

Cod	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Suport solid (0,5 g)	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
AK29	114,85	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1:1:1		OmimBF ₄	740,5
AK30	114,85	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1:1:1		EmimBF ₄	650,4
AK31	114,85	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1:1:1		PEG	661,5
AK32	114,85	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1		OmimBF ₄	730,6
AK33	114,85	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	Celite 545	EmimBF ₄	762,0
AK34	114,85	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1		PEG	608,8
AK35	114,85	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =0,4:1,6:1		OmimBF ₄	655,9
AK36	114,85	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =0,4:1,6:1		EmimBF ₄	670,7
AK37	114,85	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =0,4:1,6:1		PEG	658,7

Tabelul 3.9. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu lipază CALB obținute prin Metoda 4.

Cod	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Suport solid (0,5 g)	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
CAL61	100,65	OcTMOS:TMOS=1:1	Celite 545	OmimBF ₄	776,8
CAL62	100,65	OcTMOS:TMOS=1:1	Celite 521	OmimBF ₄	808,5
CAL63	100,65	OcTMOS:TMOS=1:1	Celite C22	OmimBF ₄	826,4
CAL64	100,65	OcTMOS:TMOS=1:1	CaCO ₃	OmimBF ₄	797,2
CAL65	100,65	OcTMOS:TMOS=1:1	Purolite MN200	OmimBF ₄	592,6
CAL66	100,65	OcTMOS:TMOS=1:1	Celuloză Avicel	OmimBF ₄	806,4
CAL67	100,65	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	Celite 545	OmimBF ₄	728,0
CAL68	100,65	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	Celite 521	OmimBF ₄	794,9
CAL69	100,65	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	Celite C22	OmimBF ₄	743,4
CAL70	100,65	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	CaCO ₃	OmimBF ₄	822,5
CAL71	100,65	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	Purolite MN200	OmimBF ₄	595,3
CAL72	100,65	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	Celuloză Avicel	OmimBF ₄	726,1
CAL73	106,39	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	Celite 545	EmimBF ₄	750,3

CAL74	106,39	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	HmimBF ₄	707,8
CAL75	106,39	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	BmimPF ₆	718,2
CAL76	106,39	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	EmimCOOCH ₃	703,6
CAL77	106,39	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	EmimCOOCF ₃	701,3
CAL78	106,39	PhTMOS:MeTMOS:TMOS =1,6:0,4:1	BmimTf ₂ N ₃	704,6

3.2. Metode de analiză

3.2.1. Analiza cantitativă prin cromatografie de gaze

Analiza cantitativă în cromatografie se bazează pe faptul că, în condițiile unui răspuns liniar al detectorului, aria picului este proporțională cu cantitatea componentei careia îi corespunde picul, indiferent de forma picului. Însă acest răspuns al detectorului diferă în funcție de structura compusului și de selectivitatea detectorului. Așadar pentru a realiza analiza cantitativă este necesar ca, după obținerea cromatogramei în care componentele să fie separate cu o rezoluție cât mai bună, să fie efectuate două operații:

- calcularea cât mai exactă a ariilor
- calibrarea, adică stabilirea corespondenței dintre arie și concentrația componentei.

Determinarea concentrației componentelor unui amestec analizat se poate face prin următoarele metode:

- metoda normării ariilor
- metoda calibrării răspunsului detectorului
- metoda standardului intern
- metoda standardului extern.

În cadrul acestei teze, pentru analiza cantitativă s-a utilizat **metoda standardului intern** care constă în adăugarea unui compus standard în cantitate cunoscută la amestecul de analizat, iar determinarea cantitativă se face prin raportare la acest standard. Metoda are avantajul că nu este necesară cunoașterea exactă a cantității de probă injectată și că mici modificări ale condițiilor de analiză care afectează aria picului nu vor duce la rezultate eronate, ele influențând în măsură egală picul componentei și al standardului.

Analizele cromatografice au fost efectuate pe un cromatograf de gaze Varian 450-GC echipat cu detector de ionizare în flacără și coloană capilară chirală cu dimensiunile 30 m x 0,25 mm cu fază staționară Elite Cyclosil B de grosime 0,25 μm (Perkin Elmer).

Condițiile de analiză au fost:

- program de temperatură: 100-170°C (10°/min.)
- temperatură injector: 240°C
- temperatură detector: 280°C
- gaz purtător: hidrogen cu presiune de 10,0 psi.

Mod de lucru

În cinci fiole cromatografice s-au cântărit cu exactitate volume diferite de compus etalon, o cantitate fixă de standard intern și solvent. Cantitățile de compus etalon și standard au fost alese astfel încât concentrațiile lor și raportul acestora să se înscrie în domeniul reacției urmărite. Probele au fost analizate gaz-cromatografic, fiecare injectându-se de 2-3 ori pentru eliminarea erorilor de măsură, iar în calcul s-a luat media determinărilor ariilor respective. S-a reprezentat grafic raportului ariilor (compus etalon/standard) în funcție de raportul cantităților (compus etalon/standard). Această dependență este liniară de forma $Y = a + bX$, iar în Tabelul 3.8 se pot observa parametrii dreptelor de etalonare pentru compuşii studiați.

Tabelul 3.10. Parametrii dreptelor de etalonare

Nr.crt.	Compus etalon	Standard intern	a	b
1.	2-butanol	Decan	-0,0029	0,67289
2.	2-pentanol	Decan	0,0302	0,71015
3.	2-hexanol	Dodecan	-0,03903	0,78751
4.	2-heptanol	Decan	-0,01381	0,75147
6.	2-octanol	Decan	0,01051	0,74903
7.	2-nonanol	Decan	0,00968	0,72665
8.	Acetat de hexil	Dodecan	-0,01306	0,66363
10.	Acetat de octil	Decan	-0,00697	0,69645

Cu ajutorul acestor parametri se poate calcula cantitatea de alcool respectiv ester care se găsește la un moment dat în amestecul de reacție:

$$m_{\text{alc/ester}} = \left(\frac{A_{\text{alc/ester}}}{A_{\text{st}}} - a \right) \cdot \frac{m_{\text{st}}}{b} \text{ (mg)}$$

unde:

$A_{\text{alc/ester}}$ = aria alcoolului/esterului

A_{st} = aria standardului intern

m_{st} = cantitatea de standard

3.2.2. Metoda Bradford de determinare a proteinelor

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

Etalonarea soluției de BSA prin metoda Bradford

Mod de lucru:

S-au realizat soluții de albumină serică bovină (BSA) de diferite concentrații în apă deionizată (0,1-1 mg/ml). S-au luat câte 25 μ l din aceste soluții și s-au introdus în cuvele corespunzătoare, adăugându-se apoi 750 μ l reactiv Bradford. Probele astfel obținute au fost menținute la temperatura camerei timp de 15 minute, apoi s-a citit extincția la 595 nm față de un martor obținut în aceleași condiții, dar cu înlocuirea soluției de BSA cu apă deionizată. Pentru siguranța determinării probele au fost realizate în duplicat. Rezultatele sunt redată în Tabelul II.5.

Tabelul 3.11. Etalonarea soluției de BSA prin metoda Bradford

Nr. Crt.	Concentrație soluție BSA (mg/ml)	Extincție
1 (martor)	-	-
2	0,1	0,23915
3	0,2	0,3991
4	0,3	0,52645
5	0,4	0,63515
6	0,5	0,7675
7	0,6	0,9348
8	0,7	0,9727
9	0,8	1,0556
10	0,9	1,20545
11	1,0	1,2496

S-a realizat reprezentarea grafică a extincției în funcție de concentrația de proteină.

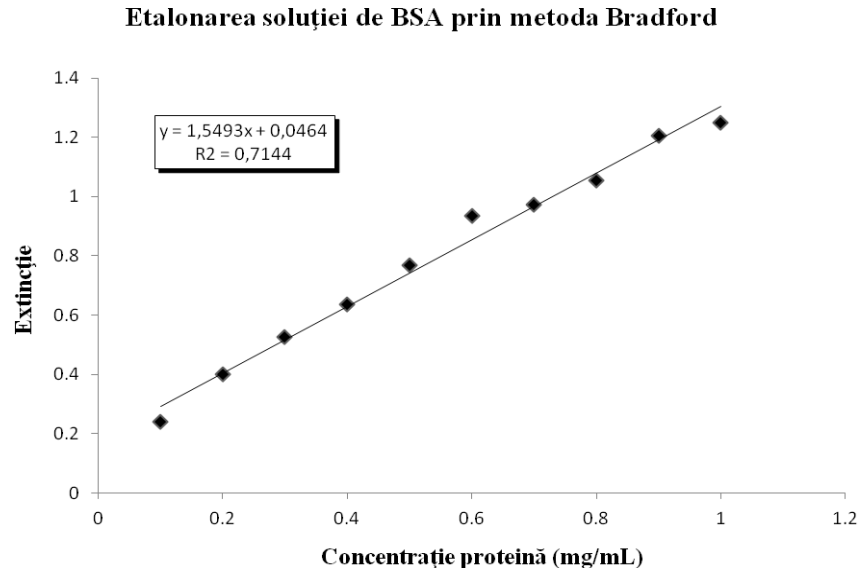


Figura 3.1. Caracteristica de etalonare a soluției de BSA prin metoda Bradford

Determinarea conținutului de proteine într-o probă necunoscută

Pentru determinarea conținutului de proteine dintr-o probă necunoscută s-a procedat în mod similar. Într-o cuvă s-au pipetat 25 μ l probă și 750 μ l reactiv Bradford. Probele astfel obținute au fost menținute la temperatura camerei timp de 15 minute, apoi s-a citit extincția la 595 nm față de martor.

Concentrația de proteină din probă s-a determinat cu formula:

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

unde:

- C_p - concentrația de proteină, (mg / ml)
- b - panta dreptei
- E_p - extincție probă
- d - diluția.

În cazul preparatelor imobilizate, cantitatea totală de proteine din apele de spălare s-a obținut prin produsul dintre concentrația de proteină și volumul de filtrat obținut. Cantitatea de proteină imobilizată s-a calculat prin diferența dintre cantitatea de proteină supusă imobilizării și cantitatea totală de proteine regăsită în apele de spălare. Randamentul de imobilizare s-a calculat prin raportarea cantității de proteină imobilizată la cea inițială.

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

3.2.3. Microscopie electronică de scanare (SEM)

Tehnica de microscopie electronică de scanare (Scanning electron microscopy) presupune două moduri de lucru:

- în vid înaintat (High-vacuum mode) (tipic 10^{-5} mbar) pentru imagistica și microanaliza probelor conductoare și/sau a probelor preparate convențional (acoperite – cu un metal conductor)

- în vid preliminar (Low-vacuum mode) (< 270 Pa) pentru imagistica și microanaliza probelor fără preparare.

În funcție de modul de lucru corespunzător se folosește un anumit tip de detector: ETD (pentru vid înaintat) și LFD (pentru vid preliminar).

Imaginile SEM au fost înregistrate folosind tehnica microscopiei electronice de scanare (SEM), pe un microscop electronic de baleiaj Inspect S + Edax Genesis XM 2i (FEI Company - Olanda).

Microscopul electronic de baleiaj Inspect S conține trei lentile electromagnetice prealiniat și răcite cu aer, coloana optimizată pentru rezoluție înaltă și curent de fascicul mare, cu o singură apertură fix pe lentila finală. Elementele principale ale opticii electronice sunt:

Sursa: Filament de wolfram montat în ansamblul tun electronic de tip tetrodă

Tensiune: 200 V la 30 kV

Curent fascicul $> 2\mu\text{A}$

Rezoluție: 3,0 nm pe specimenul standard cu particule de aur separate pe substrat de carbon, la 30 kV în ambele moduri de operare: High- și Low-vacuum; 10 nm la 3 kV în modul High-vacuum, < 12 nm la 3 kV în modul Low-vacuum

Domeniu focalizare: 3-99 mm

Mărire: 6x (la cea mai mare distanță de lucru) la $> 1,000,000x$ cu afișare pe monitor standard 19" LCD

Câmp de vizualizare: identic în High și Low-vacuum (18 mm la cea mai mare distanță de lucru)

Mod de lucru – imagistică calitativă

Pe o bandă dublu adezivă de carbon așezată pe un stab (suport) s-a presărat aproximativ 1-2 mg probă. Proba astfel așezată a fost sprayată cu aer comprimat pentru a se evita contaminarea coloanei electromagnetice, după care a fost introdusă în camera microscopului și s-a dat comanda pentru vid înaintat (high-vacuum mode). Când presiunea a atins valoarea de aproximativ $1,56 \cdot 10^{-2}$ Pa și curentul de emisie a ajuns la 100 μA s-a început scanarea (baleierea). Zonele de interes au fost aduse la magnificația corespunzătoare obținându-se astfel imaginile SEM.

3.2.4. Marcarea proteinelor cu fluorocromi

Fluorescein izotiocianatul (FITC) este unul dintre cei mai utilizați compuși fluorocromi pentru metoda anticorpilor și proteinelor fluorescente. Izotiocianații reacționează cu grupările aminice libere ale proteinelor, formând o legătură tiocarbamidică. Superioritatea fluorescein izotiocianatului față de izocianat constă nu numai în prepararea ușoară și conservarea mai bună, ci și în fluorescența de patru ori mai intensă a conjugatelor sale.

Materiale și aparatură

Pentru această determinare s-au folosit: lipazele din *Pseudomonas fluorescens* (AMANO AK de la Aldrich) și din *Candida antarctica* B (C-Lecta), 5(6)-izotiocianat de fluoresceină (Fluka), soluție tampon TRIS pH= 8,0, N,N-dimetilformamidă (Sigma Aldrich), Sephadex A-25 (Sigma Aldrich), microscop cu fluorescență Leika True Confocal Scanner (Leika TCS SPE).

Mod de lucru

Cantitatea de proteine din probă a fost determinată prin metoda Bradford. Reacția de cuplare s-a realizat într-un flacon de sticlă prin incubarea a 7 mL soluție de lipază (30 mg proteină/mL) și 2500 μ L soluție FITC, timp de o oră la temperatura camerei (conform PIERCE EZ-Label™ FITC Labelling Kit). Reacția s-a realizat la întuneric, sub folie de aluminiu.

Numărul de moli de FITC necesar a fost calculat cu relația:

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

unde:

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

Volumul de soluție de FITC s-a determinat folosind relația:

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

unde:

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

Separarea FITC libere de cea legată de proteină s-a realizat folosind o coloană umplută cu Sephadex A-25. Eluția componentelor s-a efectuat cu apă

distilată. S-a citit absorbanta fracțiunilor colectate la 280 nm. La finalul separării, concentrația de proteină legată a fost de 0,36 mg proteină/mL.

Soluția fluorescentă de proteină legată a fost concentrată prin liofilizare la -55°C timp de 34 de ore. În final, proba solidă a fost redizolvată în tampon TRIS, obținându-se o suspensie având concentrația de 0,11 mg proteină/mL. Această suspensie s-a folosit la imobilizare. Imaginile fluorescente au fost înregistrate cu ajutorul microscopului cu fluorescență Leika True Confocal Scanner.

3.2.5. Determinarea suprafeței specifice (BET)

Principiul metodei

Măsurătorile s-au efectuat la aparatul fabricat de Quantachrome. Tipul aparatului este Nova 1200e, iar măsurătorile sunt efectuate la temperatura azotului lichid (77K). Procesul de degazare s-a efectuat timp de 3 ore la vid și la temperatura de 100°C . Probele au fost cântărite înainte și după degazare.

Cantitatea cântărită după degazare este utilizată pentru determinarea datelor din izoterme. În marea majoritatea cazurilor se cântăresc 50-150 mg probă, dar probele care prezintă o porozitate redusă necesită o cantitate mai mare, adică 600-1000 mg de probă pentru acuratețea determinărilor.

Din forma izotermelor se pot determina informații suplimentare asupra texturii materialelor caracterizate. Pentru o viziune mai completă asupra porozității dimensiunea medie a porilor D_p a fost determinată atât din curba de adsorpție cât și din cea de desorpție. Suprafețele specifice S_{BET} au fost determinate din curba de adsorpție în domeniul $0,05-0,03 - p/p_0$. Volumul total de pori V_{total} a fost determinat din ultimul punct al curbei de adsorpție care corespunde cu primul punct al curbei de desorpție.

3.3. Rețete de lucru

3.3.1. Reacții de transesterificare

Determinarea activității de transesterificare a unor lipaze native sau imobilizate prin diverse metode, a excesului enantiomeric și a selectivității reacției s-a realizat pentru reacția de acilare a unor alcooli secundari (2-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol, 2-heptanol, 2-octanol și 2-nonanol) cu acetat de vinil în mediu de solvent organic sau de lichid ionic.

Materiale și aparatură

În reacțiile de transesterificare s-au folosit: 2-butanol 99% (Fluka), 2-pentanol 98% (Fluka), 2-hexanol 98% (Fluka), 2-heptanol 99% (Fluka), 2-octanol 98% (Fluka), 2-nonanol 98% (Merck), acetat de vinil (Fluka), n-hexan 98% (Merck), n-decan 95% (Riedel de Haen), n-dodecan 99% (Merck), izooctan 99,5% (Merck), tetrahidrofuran 99,9% (Merck), toluen (Chimopar), acetonitril 99,9% (Merck), acetonă 99,8% (Merck), [Emim]BF₄ (Merck), [Bmim]BF₄ (Merck), [Hmim]BF₄ (Merck), [Omim]BF₄ (Fluka), [Bmim]PF₆ (Merck), agitator orbital MIR S-100 Sanyo E&E (Japonia) și incubator Pol Eko-CLN 115 STD.

Catalizator: lipaza din *Pseudomonas fluorescens* Amano AK și *Burkholderia cepacia* Amano PS (Aldrich) și din *Candida antarctica* B (C-Lecta).

Determinările cromatografice pentru probele din reacțiile de transesterificare au fost efectuate pe un cromatograf de gaze Varian 450-GC echipat cu detector de ionizare în flacără și coloană capilară chirală cu dimensiunile 30 m x 0,25 mm cu fază staționară Elite Cyclosil B de grosime 0,25 μm (Perkin Elmer).

Condițiile de analiză au fost:

- temperatură injector: 240°C
- temperatură detector: 280°C
- gaz purtător: hidrogen cu presiune de 10,0 psi.
- program de temperatură: diferit pentru fiecare alcool secundar în parte și a fost ales astfel încât să se obțină o separare completă a componentelor probei analizate într-un timp optim de analiză.

Mod de lucru

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 0,5 mmoli alcool secundar (2-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol, 2-heptanol, 2-octanol, 2-nonanol), 1,5 mmoli acetat de vinil, 1 ml solvent organic sau lichid ionic și 15 μl n-decan sau n-dodecan (standard intern). La momentul zero al reacției s-a introdus 25 mg preparat enzimatic obținut prin entrapare în sol-gel sau prin entrapare combinată cu adsorbție. Fiola de sticlă conținând amestecul de reacție a fost plasată într-o incintă termostată la 40°C și supusă agitării la 300 rotații/min. Reacția a fost urmărită în timp, prin prelevare de probe la 24 de ore de reacție cu ajutorul unei micropipete. Pe baza analizelor efectuate, prin metoda standardului intern s-au calculat conversia alcoolului, masa de ester, activitatea preparatelor imobilizate și randamentul de regăsire a activității enzimatică la 24 de ore de reacție. Pentru calculul randamentelor de regăsire ale activității enzimatică după imobilizare, s-a efectuat o sinteză în aceleași condiții, în care s-a utilizat 5 mg lipază nativă.

Pe baza datelor din literatură [30, 182], s-a presupus că lipazele Amano AK, Amano PS și CALB sunt (*R*)-specifice în reacția de acilare a alcoolilor secundari testați, deci produsul principal a fost considerat a fi (*R*)-esterul. Excesul enantiomeric al produsului (e.e._p) a fost calculat pe baza ariei picurilor enantiomerilor.

$$e.e._p(\%) = \frac{\% \text{ ester (R)} - \% \text{ ester (S)}}{\% \text{ ester (S)} + \% \text{ ester (R)}} \cdot 100$$

Raportul enantiomeric (E) a fost calculat în conformitate cu [37], folosind relația:

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + e.e._p)]}{\ln[1 - c(1 - e.e._p)]}$$

unde:

e.e._p = excesul enantiomeric al produsului

c = conversia alcoolului

3.3.1.1. Reutilizarea preparatelor enzimatică în reacții de transesterificare în mediu organic

Materiale și aparatură

S-au folosit: 2-octanol 98% (Fluka), acetat de vinil (Fluka), n-hexan 98% (Merk), n-decan (Merck), agitator orbital MIR S-100 Sanyo E&E (Japonia) și incubator Pol Eko-CLN 115 STD.

Catalizator: lipaza din *Candida antarctica* B CALB (C-Lecta) nativă sau imobilizată prin entrapare în sol-gel, respectiv entrapare combinată cu adsorbție pe un suport solid.

Mod de lucru

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 0,5 mmoli alcool secundar (2-octanol), 1,5 mmoli acetat de vinil, 1 ml n-hexan (mediu de reacție) și 15 μ l n-decan (standard intern). La momentul zero al reacției s-a introdus 5 mg lipază CALB nativă, 25 mg preparat enzimatic obținut prin entrapare în sol-gel sau 25 mg preparat obținut prin entrapare combinată cu adsorbție. Fiola de sticlă conținând amestecul de reacție a fost plasată într-o incintă termostată la 40°C și supusă agitării la 300 rotații/min. După fiecare reutilizare (24 de ore de reacție) s-a prelevat probă, iar mediul de reacție a fost îndepărtat cu ajutorul unei micropipete. Enzima nativă sau preparatul enzimatic rămase în fiolă au fost spălate cu 2 ml n-hexan și centrifugate la 15°C și 5000 rpm. După decantarea solventului, peste lipaza nativă sau preparatul enzimatic s-au introdus 0,5 mmoli alcool secundar (2-octanol), 1,5 mmoli acetat de vinil, 1 ml n-hexan și 15 μ l n-decan (standard intern), iar amestecul rezultat a fost reintrodus într-un nou ciclu de reacție.

Pe baza analizelor gaz-cromatografice efectuate, prin metoda standardului intern, s-au calculat după fiecare reutilizare conversia alcoolului, masa de ester, activitatea preparatelor imobilizate, activitatea totală relativă raportată la reacția inițială, excesul enantiomeric al produsului (e.e._p) și raportul enantiomeric (E).

3.3.1.2. Stabilitatea termică a biocatalizatorilor obținuți în reacții de transesterificare în mediu organic

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 5 mg lipază Amano AK, Amano PS sau CALB nativă sau 25 mg preparat enzimatic (obținut prin entrapare în sol-gel *Metoda 1* sau prin entrapare combinată cu adsorbție *Metoda 3*) și 1 ml n-hexan (mediu de reacție), după care acesta a fost plasată într-o incintă termostată, fiind menținută timp de o oră la diferite temperaturi (45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C și 80°C). După răcirea la temperatura camerei, s-au introdus 0,5 mmoli alcool secundar și 1,5 mmoli acetat de vinil. Fiola de sticlă conținând amestecul de reacție a fost plasată într-o incintă termostată la 40°C și supusă agitării la 300 rotații/min. Reacția a fost urmărită prin prelevare de probă la 24 de ore de reacție cu ajutorul unei micropipete.

Pe baza analizelor gaz-cromatografice efectuate, prin metoda standardului intern, s-au calculat după fiecare reutilizare conversia alcoolului, masa de ester, activitatea preparatelor imobilizate, activitatea totală relativă raportată la reacția inițială, excesul enantiomeric al produsului (e.e._p) și raportul enantiomeric (E).

3.3.1.3. Stabilitatea în solvenți organici a lipazei din *Candida antarctica* B

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 1 ml solvent organic (*n*-hexan, ciclohexan, toluen, 1,4-dioxan, metil-*tert*-butil eter, *i*-octan, acetonă, tetrahidrofuran, acetonitril, *tert*-butanol), 5 mg lipază CaLB nativă, 25 mg preparat enzimatic obținut prin entrapare în sol-gel sau 25 mg preparat obținut prin entrapare combinată cu adsorbție. Fiola de sticlă a fost plasată apoi într-o incintă termostată la 25°C timp de o săptămână. După aceea, mediul de reacție a fost îndepărtat cu ajutorul unei micropipete. Enzima nativă sau preparatul enzimatic rămase în fiolă au fost spălate cu 2 ml *n*-hexan și centrifugate la 15°C și 5000 rpm. După decantarea solventului, peste lipaza nativă sau preparatul enzimatic s-au introdus 0,5 mmoli alcool secundar (2-octanol), 1,5 mmoli acetat de vinil, 1 ml *n*-hexan și 15 μl *n*-decan (standard intern), iar amestecul rezultat a fost introdus într-o incintă termostată la 40 °C.

Pe baza analizelor gaz-cromatografice efectuate, prin metoda standardului intern, s-au calculat conversia alcoolului, masa de ester, activitatea preparatelor imobilizate, activitatea totală relativă raportată la reacția inițială, excesul enantiomeric al produsului (e.e._p) și raportul enantiomeric (E).

4. CONCLUZII FINALE

Principalele obiective urmărite în cadrul acestei teze de doctorat au fost obținerea de catalizatori stabili și eficienți cu aplicabilitate în sinteza compușilor optic activi și imobilizarea unor lipaze microbiene în matrici de sol-gel sau prin entrapare combinată cu adsorbție folosind sisteme terțiare de silani precursori. De asemenea, s-a dorit optimizarea unei noi metode de imobilizare prin entrapare în sol-gel, respectiv prin entrapare combinată cu adsorbție, în prezență de lichide ionice ca aditivi. În urma imobilizării s-a urmărit creșterea stabilității termice, operaționale și a numărului posibil de reutilizări a biocatalizatorilor obținuți prin entrapare în sol-gel folosind lichide ionice ca aditivi. Lipazele imobilizate prin tehnici sol-gel au fost caracterizate fizico-chimic folosind microscopia electronică de scanare (SEM), metoda BET de determinare a suprafeței specifice și microscopia cu fluorescență.

În prima parte a tezei este prezentat un studiu de literatură cu privire la structura și proprietățile enzimelor, biocataliza cu lipaze, tehnici de imobilizare, în special entraparea în matrici de sol-gel și imobilizarea prin entrapare combinată cu adsorbție, posibilitatea de utilizare a lichidelor ionice ca aditivi, precum și modalități de caracterizare morfologică a preparatelor enzimatiche obținute. Acest studiu a reprezentat fundamentul științific pentru obiectivele urmărite în partea de cercetări experimentale.

Studiile realizate în cadrul contribuțiilor originale au avut următoarele obiective:

- Elaborarea unei metode de imobilizare prin entrapare în sol-gel, respectiv prin entrapare combinată cu adsorbție a unor lipaze microbiene.
- Optimizarea parametrilor de imobilizare în scopul obținerii unor preparate enzimatiche cu activitate și stabilitate ridicată.
- Influența adsorbentului folosit la dubla imobilizare asupra eficienței catalitice a biocatalizatorilor obținuți.
- Influența lichidelor ionice folosite ca aditivi la imobilizarea prin entrapare în sol-gel, respectiv la dubla imobilizare asupra eficienței catalitice a preparatelor enzimatiche.
- Influența mediului de reacție asupra eficienței catalitice a lipazei B din *Candida antarctica* imobilizată prin entrapare în sol-gel.
- Influența mediului de reacție asupra enantioselectivității lipazei B din *Candida antarctica* dublu imobilizată.
- Studiul stabilității operaționale a lipazei imobilizate din *Candida antarctica* la diferite temperaturi.
- Studiul termostabilității lipazelor microbiene imobilizate prin diferite tehnici.
- Stabilitatea în solvenți organici a lipazei B din *Candida antarctica*.
- Caracterizarea morfologică a unor lipaze microbiene imobilizate prin diferite tehnici.

Din studiile experimentale realizate, efectuate în conformitate cu obiectivele stabilite, se pot concluziona următoarele:

1. Imobilizarea prin entrapare în matrici de sol-gel a unor lipaze de origine microbială:

Cunoașterea valorii optime a încărcării matricii cu proteină este esențială. În urma imobilizării, enantioselectivitatea biocatalizatorilor a fost excelentă comparativ cu lipaza nativă. Având în vedere atât activitatea enzimatică, raportul enantiomeric (E) cât și costul biocatalizatorului, se poate spune că valoarea optimă a încărcării cu enzimă a fost de 17,44. Biocatalizatorii testați în studiile ulterioare au fost obținuți cu o încărcare a matricii cu proteină de 17,44 mg la un gram de xerogel.

Reglarea fină a compoziției sistemului de silani precursori și a structurii lichidului ionic permite dezvoltarea unor biocatalizatori performanți pentru aplicații specifice. În cazul acilării enantioselective a 2-octanolului, protocolul de imobilizare cel mai eficient a implicat utilizarea unui sistem ternar de silani precursori, format din PhTMS, MeTMS și TMOS în raport echimolar și lichidul ionic [Omim]BF₄ ca aditiv.

Folosirea unui silan precursor cu grupări vinil nehidrolizabile a avut un efect pozitiv asupra proprietăților catalitice ale lipazei imobilizate. În cazul folosirii unui sistem binar de silani precursori s-a obținut o valoare mai ridicată a activității catalitice atunci când concentrația de grupări vinil în amestecul de silani a fost mai mare (raport molar 2:1).

Atunci când la imobilizare s-a folosit un sistem ternar de silani precursori s-au obținut valori și mai ridicate ale activității enzimatică. Eficiența catalitică exprimată prin randamentul de regăsire a activității enzimatică a fost mai ridicată la folosirea unui sistem ternar de silani precursori, la un raport molar de 1,6:0,4:1, ceea ce înseamnă că o concentrație mai mică a grupării vinil nehidrolizabile în matricea gelului este benefică.

În cazul testării biocatalizatorilor pe substratul 2-octanol, atât în cazul sistemelor binare cât și al celor ternare, s-a observat că o concentrație mai mare a radicalului vinil din precursorul silanic a avut un efect favorabil. În ceea ce privește eficiența catalitică, se poate observa că s-au obținut valori excelente în cazul tuturor biocatalizatorilor testați, acestea fiind de 3 până la 6 ori mai mari decât în cazul lipazei native. În cazul preparatelor enzimatică obținute cu sistem binar de silani, cele mai bune valori ale enantioselectivității s-au obținut la raportul molar de 2:1 al VTMS:TMOS, pe când în cazul celor obținute cu sistem ternar de precursori, valoarea cea mai mare a raportului enantiomeric (E) a fost dată de preparatul obținut cu silanii precursori PhTMS:VTMS:TMOS la un raport molar de 0,4:1,6:1.

Pentru lipaza Amano AK din *Pseudomonas fluorescens* s-a optimizat cantitatea de lichid ionic utilizat ca aditiv la imobilizarea prin entrapare în sol-gel. Cele mai ridicate valori ale activității de transesterificare au fost obținute la un raport molar de 0,2 între lichidul ionic și silanii precursori. Enantioselectivitatea biocatalizatorilor obținuți nu a fost influențată semnificativ de cantitatea de lichid ionic, dar a fost ușor îmbunătățită comparativ cu lipaza nativă.

În cazul lipazei B din *Candida antarctica*, mai multe lichide ionice au fost testate ca aditivi de imobilizare la entraparea în matrici sol-gel. Este important de menționat faptul că performanțele lipazei imobilizate nu depind doar de aditiv, ci și de metoda de imobilizare și de substratul testat.

În cazul lichidelor ionice, influența mediului de reacție a fost mult mai importantă. Conversia a fost foarte redusă în [Emim]COOCF₃, singurul lichid ionic testat care este miscibil cu apa. Ținând cont atât de activitate cât și de

enantioselectivitate, lichidele ionice cu anioni de tip BF_4^- s-au dovedit a fi un mediu de reacție mai eficient decât $[\text{Bmim}]\text{PF}_6$. Din grupul lichidelor ionice cu acest tip de anion (BF_4^-), cele mai bune rezultate au fost obținute atunci când în partea cationică este prezentă o grupare alchil mai hidrofobă (octil). În cazul reacției investigate, acilarea enantioselectivă a 2-octanolului, lichidul ionic optim a fost $[\text{Omim}]\text{BF}_4$, care a dus la obținerea unor rezultate comparabile cu cele în solvenți organici tradiționali.

2. Imobilizarea prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție a unor lipaze microbiene:

Performanțele catalitice ale lipazelor imobilizate prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție depind foarte mult de încărcarea cu enzimă, de raportul molar al silanilor precursori, precum și de tipul și cantitatea adsorbentului.

S-au obținut valori ridicate la încărcări de 9,48, 10,72 și 11,68 mg proteină/g biocatalizator. Trebuie menționat că indiferent de valoarea încărcării cu enzimă, valorile raportului enantiomeric au fost superioare comparativ cu lipaza nativă. Ținând cont atât de activitatea enzimatică, raportul enantiomeric (E) cât și de costul biocatalizatorului, se poate spune că valoarea optimă a încărcării cu enzimă necesară la imobilizarea prin metoda sol-gel combinată cu adsorbție este de 10,72 mg proteină/g biocatalizator. Biocatalizatorii care vor fi utilizați în studiile următoare vor fi cei obținuți la o încărcare a matricii cu proteină de 10,72. Randamentul de imobilizare a fost independent de încărcarea cu lipază.

Indiferent de substratul testat, raportul optim dintre cantitatea de suport și numărul de moli de silani precursori la care s-au înregistrat cele mai bune valori ale reacției a fost de 83,3. Atunci când reacțiile au fost efectuate într-un mediu de reacție polar (acetonă), s-a obținut o ușoară scădere a conversiei. În această situație, a fost avantajată reacția de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului.

După imobilizare activitatea totală a fost mai mare la lipaza din *Burkholderia cepacia*, de până la 8 ori mai mare decât a celorlalte lipaze imobilizate. Lipaza din *Candida antarctica* a prezentat valori ridicate ale randamentului de regăsire a activității, iar cea din *Pseudomonas fluorescens* a dat valorile cele mai mici ale randamentului de regăsire. Folosind un raport molar al precursorilor silanici de 1,6:0,4:1 s-au obținut cele mai bune valori ale activității totale. Atunci când s-a folosit $[\text{Emim}]\text{BF}_4$ ca aditiv de imobilizare, pentru toate preparatele enzimatiche obținute, valorile randamentului de regăsire au fost aproape duble comparativ cu imobilizarea în prezența lui OmimBF_4 ca agent de modelare a structurii gelului. Folosind un raport molar al precursorilor silanici de 1:1:1 s-au obținut cele mai bune valori ale enantioselectivității pentru toate preparatele enzimatiche obținute.

Valorile randamentului de regăsire – parametru care caracterizează eficiența catalitică a preparatelor obținute, au fost excelente (între 250 și 560%) pentru toți biocatalizatorii testați, indiferent de protocolul de imobilizare folosit. Indiferent de adsorbentul folosit, se observă o creștere a randamentului de regăsire de la 2-pentanol la 2-heptanol, apoi doar o ușoară creștere sau chiar o scădere pentru 2-octanol și apoi o creștere pronunțată în cazul 2-nonanolului.

Lichidele cu același anion, tetrafluoroborat, au dus la activități ridicate ale preparatelor imobilizate odată cu scăderea lanțului alchil din partea cationică. În ceea ce privește lichidele ionice cu același cation, $[\text{Emim}]$, prezența în partea anionică a unor substituenți mai voluminoși (trifluoroacetat, acetat), a dus la scăderea randamentului de regăsire a activității și a enantioselectivității preparatelor enzimatiche obținute.

Privind comparativ cele două metode de imobilizare studiate, se poate observa că valorile raportului enantiomeric au fost similare, cu două excepții. În cazul în care s-a folosit metoda 3, valoarea cea mai ridicată a lui E pentru acilarea 2-hexanolului s-a obținut pentru lichidul ionic [Bmim]PF₆. Atunci când biocatalizatorii au fost sintetizați conform metodei 4, cea mai ridicată valoare a lui E s-a înregistrat pentru acilarea 2-octanolului cu lipaza CaLB dublu imobilizată în prezența aditivului [Hmim]BF₄.

Activitatea enzimatică este condiționată de alegerea unui mediu de reacție adecvat, deoarece unii solvenți organici inactivează enzima. Cele mai ridicate valori ale activității de transesterificare s-au obținut atunci când acetona sau dioxanul au fost utilizați ca mediu de reacție, iar cele mai mici valori s-au obținut în cazul THF.

Cele mai ridicate valori ale randamentului și activității de transesterificare s-au obținut atunci când toluenul a fost utilizat ca mediu de reacție, iar cele mai mici valori s-au obținut în cazul acetonei. Enantioselectivitatea preparatului enzimatic utilizat la rezoluția cinetică a 2-pentanolului este puternic influențată de natura mediului de reacție. Diclormetanul și 1,4-dioxanul, solvenți cu polaritate intermediară, s-au dovedit a fi foarte eficienți, ducând la obținerea unor valori ale raportului enantiomeric mai mari de 100, ceea ce poate fi considerată o rezoluție cinetică excelentă. Valori mai mici ale enantioselectivității s-au obținut în cazul solvenților nepolari, cum ar fi hexan sau ciclohexan.

În cazul acilării enantioselective a 2-octanolului, natura mediului de reacție nu a avut o influență semnificativă asupra eficienței catalitice a biocatalizatorului folosit.

3. Creșterea stabilității lipazelor prin imobilizare în sol-gel:

Creșterea numărului posibil de reutilizări a enzimei este un alt obiectiv important, urmărit prin orice metodă de imobilizare. Tehnicile de imobilizare studiate și-au demonstrat eficiența și sub acest aspect. Astfel s-a obținut o creștere însemnată a stabilității enzimei, preparatele imobilizate prezentând o activitate relativă ridicată care s-a menținut la peste 90% pe tot parcursul celor 34 de cicluri de reutilizare, în timp ce pentru enzima nativă această valoare a fost de numai 11% după 8 reutilizări. Enantioselectivitatea preparatelor imobilizate a fost ridicată pe durata studiului de reutilizare, iar excesul enantiomeric s-a menținut la valoarea inițială de 95%.

Un rezultat foarte important al acestui studiu este că în timp ce eficiența catalitică a lipazei native reutilizate a scăzut considerabil mai repede la creșterea temperaturii de reacție de la 40°C la 60°C, în cazul lipazei imobilizate prin metoda sol-gel ea a rămas aproape nemodificată. Prin urmare, stabilitatea operațională excelentă a lipazei se menține și la temperaturi mai ridicate, ceea ce este un argument important pentru utilizarea industrială a acestor biocatalizatori.

Creșterea stabilității operaționale la temperaturi mai ridicate reprezintă una dintre principalele avantaje ale imobilizării. Astfel, în cadrul studiului de termostabilitate a lipazelor imobilizate prin metodele prezentate anterior, s-a observat că valorile activității și enantioselectivității au fost menținute constante pe tot intervalul de temperatură studiat.

Chiar și în condiții mai dure (incubare la 80°C timp de 5 zile), biocatalizatorii obținuți cu lipază B din *Candida antarctica* au prezentat valori ale activității practic neschimbate, pe când enzima nativă a pierdut 50% din activitate după 5 zile. Nu s-au înregistrat diferențe semnificative între tehnicile de imobilizare studiate. De

asemenea, enantioselectivitatea lipazei nu a fost afectată, rămânând constantă (exces enantiomeric de 94-95%).

Tipul solventului folosit pentru un anumit tip de reacție este esențial, deoarece acesta afectează atât stabilitatea cât și specificitatea biocatalizatorilor.

Activitatea de transesterificare nu a fost influențată semnificativ de natura solventului în care au fost incubați biocatalizatorii, cu excepția cazului în care lipaza nativă CaLB a fost incubată în 1,4-dioxan, situație în care s-a înregistrat o activare pronunțată. Preparatele enzimatic obținute prin entrapare în sol-gel, respectiv prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție au prezentat activități catalitice ridicate.

Dintre metodele de imobilizare studiate, cele mai bune rezultate s-au înregistrat în cazul entrapării în sol-gel, indiferent de solventul în care au fost incubați biocatalizatorii. Valorile cele mai ridicate ale enantioselectivității s-au obținut în cazul incubării lipazei imobilizate prin entrapare în sol-gel solvenți polari sau cu polaritate medie (acetona, *terț*-butanol, metil-*terț*-butil eter și toluen).

4. Caracterizarea morfologică a unor lipaze microbiene imobilizate prin diferite tehnici:

Caracterizarea morfologică a lipazelor imobilizate prin diferite tehnici este foarte importantă deoarece poate oferi informații privind structura biocatalizatorilor care se pot corela cu proprietățile catalitice.

În urma analizei prin microscopie electronică de scanare (SEM) s-a observat o structură poroasă tipică materialelor nanocompozite de tip silice. Formarea rețelei tridimensionale este rezultatul înrețelării particulelor de sol formate inițial. Aceasta structură cu pori ordonați este corelată cu o valoare ridicată a activității catalitice, ceea ce înseamnă că substratul poate ajunge cu ușurință în centrul activ al lipazei, fără a exista împiedicare din partea matricii sol-gel. În cazul preparatului obținut la entraparea în matrici de TMOS a lipazei din *Pseudomonas fluorescens* s-a obținut o structură diferită, formată din blocuri compacte, aceasta explicând parțial valoarea scăzută a activității catalitice.

Analiza prin microscopie de fluorescență a demonstrat o distribuție uniformă a lipazei în interiorul matricii sol-gel indiferent de aditivul folosit sau de tehnica de imobilizare.

În urma analizei BET s-a obținut în cazul tuturor preparatelor enzimatic testate un diametru al porilor cuprins între 2-50 nm, care conform IUPAC corespunde substanțelor mezoporoase. Valorile suprafeței specifice BET sunt foarte variate, acoperind un domeniu larg.

BIBLIOGRAFIE

1. Newell-McGloughlin M., Re E. B., *The Evolution of Biotechnology*, **2006**, Editura Springer, Dordrecht.
2. *Industrial Biotechnology and Sustainable Chemistry*, **2004**, Royal Belgian Academy Council of Applied Science.
3. Drauz K., Waldmann H., *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, **2002**, Editura Wiley-VCH, Weinheim.
4. Mosier N.S., Ladisch M.R., *Modern Biotechnology – Connecting Innovations in Microbiology and Biochemistry to Engineering Fundamentals*, **2009**, Editura Wiley-VCH, Hoboken.
5. Rodwell V.W., *Enzymes: General Properties* în Harper's Biochemistry, Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W., **1990**, Editura Appleton & Lange, Norwalk.
6. Péter F., *Biotransformări enzimatică*, Editura Politehnica, **2005**, Timișoara.
7. Campbell M.K., Geis I, *Biochemistry*, **1995**, Editura Saunders College, Philadelphia.
8. www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes (**08.07.2012**).
9. Copeland R.A., *Enzymes. A practical introduction to structure, mechanism and data analysis*, **2000**, Editura Wiley-VCH, New York.
10. Laberge M., *Essential chemistry. Biochemistry*, **2008**, Editura Chelsea House Publishers, New York.
11. Tao J.A., Kazlauskas R., *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*, **2011**, Editura Wiley-VCH, Hoboken.
12. Smith C.M., Marks A.D., Lieberman M.A., *Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*, **2005**, Editura Lippincott Williams & Wilkins.
13. Johannes T., Simurdial M.R., Zhao H., *Encyclopedia of Chemical Processing*, Vol. 1, **2006**, Editura Taylor & Francis, Londra.
14. Nelson D.L., Cox M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, **2005**, Editura W.H. Freeman and Company, New York.
15. Marangoni A.G., *Enzyme Kinetics – A modern Approach*, **2003**, Editura Wiley-VCH, Hoboken.
16. Da Ros P.C.M., Silva G.A.M., Mendes A.A., Santos J.C., de Castro H.F., *Bioresource Technol*, **2010**, *101*, 5508-5516.
17. Vila-Real H., Alfaia A.J., Rosa J.N., Gois P.M.P., Rosa M.E., Calado A.R.T., Ribeiro M.H., *J Biotechnol*, **2011**, *152* (4), 147-158.
18. Kirk O., Borchert T.V., Fuglsang C.C., *Curr Opin Biotechnol*, **2002**, *13*, 345-351.
19. Lorenz P., Eck J., *Nat Rev Microbiol*, **2005**, *3*, 510-516.
20. Dumitru I.F., Iordăchescu D., *Introducere în Enzimologie*, **1981**, Editura Medicală, București.
21. Lupea A.X., *Biochimie*, **2003**, Editura Politehnica, Timișoara.
22. Ghanem A., Aboul-Enein H.Y., *Chirality*, **2005**, *17*, 1-15.
23. Chen C.S., Fujimoto Y., Girdaukas G., Sih C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 7294-7299.
24. Chen C.S., Sih C., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1989**, *28*, 695-707.

25. Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J., *Hydrolases in Organic Synthesis. Regio- and Stereoselective Biotransformations*, **2006**, Editura Wiley-VCH, Weinheim.
26. Buchholz K., Kasche V., Bornscheuer U.T., *Biocatalysts and Enzyme Technology*, **2005**, Editura Wiley-VCH, Weinheim.
27. Bommarius A. S., Riebel B. R., *Biocatalysis, Fundamentals and Applications*, **2004**, Editura Wiley-VCH, Weinheim.
28. Kasche V., Schlothauer R., Brunner G., *Biotechnol. Lett.*, **1988**, *10*, 569-574.
29. Kasche V., Lummer K., Nurk A., Piostraschke E., Riecks A., Stoeva S., Voelter W., *Biocim. Biophys. Acta*, **1999**, *1433*, 76-86.
30. Hasan F., Shah A.A., Hameed A., *Enzyme Microb Tech*, **2006**, *39* (2), 235-251.
31. Roig M., Kennedy J., *Crit Rev Biotechnol*, **1992**, *12*, 391-412.
32. Özturk D.C., Kazan D., Erarslan A., *World J Microb Biot*, **2002**, *18*, 881-888.
33. Abian O., Mateo C., Fernandez-Lorente G., Palomo J.M., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M., *Biocatal Biotransfor*, **2001**, *19* (5-6), 489-503.
34. Mateo C., Abian O., Bernedo M., Cuenca E., Fuentes M., Fernandez-Lorente G., Palomo J.M., Grazu V., Pessela B.C.C., Giacomini C., Irazoqui G., Villarino A., Ovsejevi K., Batista-Viera F., Fernandez-Lafuente R., Guisán J.M., *Enzyme Microb Tech*, **2005**, *37* (4), 456-462.
35. Kim J., Grate J.W., Wang P., *Chem Eng Sci*, **2006**, *61* (3), 1017-1026.
36. Wilson L., Fernandez-Lorente G., Fernandez-Lafuente R., Illanes A., Guisán J.M., Palomo J.M., *Enzyme Microb Tech*, **2006**, *39* (4), 750-755.
37. Haring D., Schreier P., *Curr Opin Chem Biol*, **1999**, *3*, 35-38l.
38. Roy J.J., Abraham T.E., *J Mol Catal B: Enzym*, **2006**, *38*, 31-36.
39. Cao L., van Langen L., Sheldon R., *Curr Opin Biotech*, **2003**, *14*, 1-8.
40. Mateo C., Palomo J.M., van Langen L.M., van Rantwijk F., Sheldon R.A., *Biotechnol Bioeng*, **2004**, *86* (3), 273-276.
41. Schoevaart R., Wolbers M.W., Golubovic M., Ottens M., Kieboom A.P.G., van Rantwijk F., van der Wielen L.A.M., Sheldon R.A., *Biotechnol Bioeng*, **2004**, *87* (6), 754-762.
42. Illanes A., Wilson L., Caballero E., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M., *Appl Biochem Biotech*, **2006**, *133* (3), 189-202.
43. Illanes A., *Enzyme Biocatalysis*, **2008**, Editura Springer, Dordrecht.
44. Salleh A.B., Rahman R.N.Z.R.A., Basri M., *New Lipases and Proteases*, **2006**, Editura Nova Science, New York.
45. Houde A., Kademi A., Leblanc D., *Appl Biochem Biotech*, **2004**, *118*, 155-170.
46. Yasin Y., Basri M., Ahmad F., Salleh A.B., *J Chem Technol Biotechnol*, **2008**, *83*, 694-698.
47. Moghaddam M.G., Ahmad F.B.H., Basri M., Rahman M.B.A., *J Appl Sci*, **2010**, *10* (4), 337-342.
48. Ahmad F.B.H., Moghaddam M.G., Basri M., Rahman M.B.A., *Biosci Biotechnol Biochem*, **2010**, *74* (5), 1025-1029.
49. Helwani Z., Othman M.R., Aziz N., Fernando W.J.N., Kim J., *Fuel Process Technol*, **2009**, *90*, 1502-1514.
50. Hellner G., *Application of lipolytic enzymes of microbial origin as biocatalysts*, PhD Thesis, **2011**.

51. Benešová E., Králová B., *Affinity Interactions as a Tool for Protein Immobilization in Affinity Chromatography*, Magdeldin S. (editor), InTech, **2012**.
52. Guisan J. M., *Immobilization of Enzymes and Cells*, **2006**, Editura Humana Press, Totowa.
53. Datta S., Christena L.R., Rajaram Y.R.S., *3 Biotech*, **2012**, 2, doi: 10.1007/s13205-012-0071-7.
54. Elçin Y.M., *Biomaterials*, **1995**, 16, 1157-1161.
55. Flores-Maltos A., Rodriguez-Duran L.V., Renovato J., Contreras J.C., Rodriguez R., Aguilar C.N., *Enzyme Res*, **2011**, doi: 10.406/2011/768183.
56. Vaillant F., Millan P., Dornier M., Decloux M., Reynees M., *Process Biochem*, **2000**, 35, 989-996.
57. Kappor M., Kuhad R.C., *Appl Biochem Biotechnol*, **2007**, 142, 125-138.
58. Hsieh H.J., Liu P.C., Liao W.J., *Biotechnol Lett*, **2000**, 22, 1459-1464.
59. Betigeri S.S., Neau S.H., *Biomaterials*, **2002**, 23, 3627-3636.
60. Chang Y.K., Chu L., *Biochem Eng J*, **2007**, 35, 37-47.
61. Katwa L.C., Ramakrishna M., Rao M.R.R., *J Biosci*, **1981**, 3, 135-142.
62. Tümtürk H., Karaca N., Demirel G., Şahin F., *Int J Biol Macromol*, **2007**, 40, 281-285.
63. Jegannathan K.R., Jun-Yee L., Chan E.S., Ravindra P., *Fuel*, **2010**, 89, 2272-2277.
64. Rao C.S., Prakasham R.S., Rao A.B., Yadav J.S., *Appl Biochem Biotechnol*, **2008**, 149, 219-228.
65. Girigowda K., Mulimani V.H., *World J Biotechnol*, **2006**, 22, 437-442.
66. Emregul E., Sungur S., Akbulut U., *Process Biochem*, **2006**, 38, 27-30.
67. Shen Q., Yang R., Hua X., Ye F., Zhang W., Zhao W., *Process Biochem*, **2011**, 46, 1565-1571.
68. Ateş S., Doğan N.S., *Turk J Biochem*, **2010**, 35, 58-62.
69. Al-Adhami A.J.H., Bryjak J., Greb-Markiewicz B., Peczyńska-Czoch W., *Process Biochem*, **2002**, 37, 1387-1294.
70. Mislovicová D., Masarova J., Vikartovska A., Germeiner P., Michalkova E., *J Biotechnol*, **2004**, 110, 11-19.
71. Bryjak J., Anilyte J., Liesiene J., *Carbohydr Res*, **2007**, 342, 1105-1109.
72. Namdeo M., Bajpai S.K., *J Mol Catal B: Enzym*, **2009**, 59, 134-139.
73. Labus K., Turek A., Liesiene J., Bryjak J., *Biochem Eng J*, **2011**, 56, 232-240.
74. Huang X.J., Chen P.C., Huang F., Ou Y., Chen M.R., Xu Z.K., *J Mol Catal B: Enzym*, **2011**, 70, 95-100.
75. Klein M.P., Scheeren C.W., Lorenzoni A.S.G., Dupont J., Frazzon J., Hertz P.F., *Process Biochem*, **2011**, 46, 1375-1379.
76. Matto M., Husain Q., *J Mol Catal B: Enzym*, **2009**, 57, 164-170.
77. Gómez L., Ramírez H.L., Neira-Carrillo A., Villalonga R., *Bioproc Biosyst Eng*, **2006**, 28, 387-395.
78. Satar R., Matto M., Husain Q., *J Sci Ind Res India*, **2008**, 67, 609-615.
79. Hosseinkhani S., Szittner R., Nemat-Gorgani M., Meighen E.A., *Enzyme Microb Tech*, **2003**, 32, 186-193.
80. Kumari A., Kayastha A.M., *J Mol Catal B: Enzym*, **2011**, 69, 8-14.
81. Ashraf H., Husain Q., *Int Biodeter Biodegr*, **2010**, 64, 27-31.
82. Abdel-Naby M.A., *Process Biochem*, **1999**, 34, 399-405.
83. Kahrman M.V., Bayramoglu G., Kayaman-Apohan N., Güngör A., *React Funct Polym*, **2007**, 67, 97-103.

84. Pahujani S., Kawar S.S., Chauhan G., Gupta R., *Bioresour Technol*, **2008**, 99, 2566-2570.
85. Romaskevicius T., Vikantiene E., Budriene S., Ramanaviciene A., Dienys G., *J Mol Catal B: Enzym*, **2010**, 64, 172-176.
86. Xiangli Q., Zhe L., Yinglin Z., Zhengjia Z., *Biochem Eng J*, **2010**, 50, 71-76.
87. Ashly P.C., Joseph M.J., Mohanan P.V., *Food Chem*, **2011**, 127, 1808-1813.
88. Xing G.W., Li X.W., Tian G.L., Ye Y.H., *Tetrahedron*, **2010**, 56, 3517-3522.
89. Magnan E., Catarino I., Paolucci-Jeanjean D., Preziosi-Belloy L., Belleville M.P., *J Membr Sci*, **2004**, 241, 161-166.
90. Huang L., Cheng Z.M., *Chem Eng J*, **2008**, 144, 103-109.
91. Khan A.A., Akhtar S., Husain Q., *J Mol Catal B: Enzym*, **2006**, 40, 58-63.
92. Liu C.H., Lin Y.H., Chen C.Y., Chang J.S., *J Taiwan Inst Chem E*, **2009**, 40, 359-363.
93. Ansari S.A., Husain Q., *Food Bioprod Process*, **2012**, 90, 351-359.
94. Koszelewski D., Muller N., Schrittwieser J.H., Faber K., Kroutil W., *J Mol Catal B: Enzym*, **2010**, 63, 39-44.
95. Dezzot M., Innocentini-Mei L.H., Durán N., *J Biotechnol*, **1995**, 102-103, 303-313.
96. Soleimani M., Khani A., Najafzadeh K., *J Mol Catal B: Enzym*, **2011**, 74, 1-5.
97. Rao M.N., Kembhavi A.A., Pant A., *Biotechnol Lett*, **2000**, 22, 1557-1559.
98. Shioji S., Hanada M., Hayashi Y., Tokami K., Yamamoto H., *Adv Powder Technol*, **2003**, 14, 231-245.
99. Pogorilyi R.P., Siletskaya E.Y., Goncharik V.P., Kozhara L.I., Zub Y.L., *Russ J Appl Chem*, **2007**, 80, 330-334.
100. Kahraman M.V., Bayramoglu G., Kayaman-Apohan N., Güngör A., *React Funct Polym*, **2007**, 67, 97-103.
101. Rosa C.C., Cruz H.J., Vidal M., Oliva A.G., *Biosens Bioelectron*, **2002**, 17, 45-52.
102. Sahney R., Puri B.K., Anand S., *Anal Chim Acta*, **2005**, 542, 157-161.
103. Spahn C., Minter S.D., *Recent Pat Eng*, **2008**, 2, 195-200.
104. Dey G., Nagpal V., Banerjee R., *Appl Biochem Biotechnol*, **2002**, 102-103, 303-313.
105. Hernández M.R., Kispert L., Ramirez E.T., Rosales D.R., Ulloa R.Z., Ferrara J.T., *Biotechnol Lett*, **2007**, 29, 919-924.
106. Karagulyan H.K., Gasparyan V.K., Decker S.R., *Appl Biochem Biotechnol*, **2008**, 146, 39-47.
107. Brígida A.I.S., Calado V.M.A., Goncalves L.R.B., Coelho M.A.Z., *Carbohydr Polym*, **2010**, 79, 832-838.
108. Mitchell S., Ramírez J.P., *Catal Today*, **2011**, 168, 28-37.
109. Diaz F.J. Jr., Balkus K.J., *J Mol Catal B: Enzym*, **1996**, 2, 115-126.
110. Perrson M., Wehtje E., Adlercreut P., *Biotechnol Lett*, **2000**, 22, 1571-1575.
111. Sabbani S., Hedenström E., Nordin O., *J Mol Catal B: Enzym*, **2006**, 42, 1-9.
112. Cunha A.G., Fernández-Lorente G., Bevilacqua J.V., Destain J., Paiva L.M., Freire D.M., Fernández-Lafuente R., Guisan J.M., *Appl Biochem Biotechnol*, **2008**, 146, 49-56.

113. Cabrera-Padilla R.Y., Lisboa M.C., Fricks A.T., Franceschi E., Lima A.S., Silva D.P., Soares C.M., *J Ind Microbiol Biotechnol*, **2012**, 39, 289-298.
114. Mishra N., Pithawala K., Bahadur A., *Appl Biochem Biotechnol*, **2011**, 165, 1568-1576.
115. Dai D., Xia L., *Appl Biochem Biotechnol*, **2006**, 134, 39-49.
116. Kim J., Jia H., Wang P., *Biotechnol Adv*, **2006**, 24, 296-308.
117. Wang Z.G., Wan L.S., Liu Z.M., Huang X.J., Xu Z.K., *J Mol Catal B:Enzym*, **2009**, 56, 189-195.
118. Wen H., Nallathambi V., Chakraborty D., Barton S.C., *Microchim Acta*, **2011**, 175, 283-289.
119. Ispas C., Sokolov I., Andreescu S., *Anal Bioanal Chem*, **2009**, 393, 543-554.
120. Chen S., Song N., Liao X., Shi B., *Chin J Biotechnol*, **2011**, 27, 1076-1081.
121. Erdemir S., Yilmaz M., *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, **2012**, 72, 189-196.
122. Jin W., Brennan J.D., *Anal Chim Acta*, **2002**, 461, 1-36.
123. Jordan J.D., Dunbar R.A., Bright F.V., *Anal Chem*, **1995**, 67 (14), 2436-2443.
124. Das T.K., Khan I., Rousseau D.L., Friedman J.M., *J Am Chem Soc*, **1998**, 120 (39), 10268-10269.
125. Dave B.C., Soyez H., Miller J.M., Dunn B., Valentine J.S., Zink J.I., *Chem Mater*, **1995**, 7 (8), 1431-1434.
126. Edmiston P.L., Wambolt C.L., Smith M.K., Saavedra S.S., *J Colloid Interf Sci*, **1994**, 163 (2), 395-406.
127. Zheng L., Reid W.R., Brennan J.D., *Anal Chem*, **1997**, 69, 3940-3949.
128. Zheng L., Brennan J.D., *Analyst*, **1998**, 123, 1735-1744.
129. Zheng L., Flora K., Brennan J.D., *Chem Mater*, **1998**, 10, 3974-3983.
130. Flora K., Brennan J.D., *Anal Chem*, **1998**, 70, 4505-4513.
131. Ellerby L.M., Nishida C.R., Nishida F., Yamanaka S.A., Dunn B., Valentine J.S., Zink J.I., *Anal Chem*, **1994**, 66, 1120A-1127A.
132. Flora K., Brennan J.D., Baker G.A., Doody M.A., Bright F.V., *Biophys J*, **1998**, 75, 1084-1096.
133. Miller J.M., Dunn B., Valentine J.S., Zink J.I., *J Non-Cryst Solids*, **1996**, 202, 279-289.
134. Lloyd C.R., Eyring E.M., *Langmuir*, **2000**, 16, 9092-9094.
135. Badjic J.D., Kostic N.M., *Chem Mater*, **1999**, 11, 3671-3679.
136. Flora K., Brennan J.D., *Chem Mater*, **2001**, 13, 4170-4179.
137. Altstein M., Segev G., Aharonson N., Ben-Aziz O., Tumiansky A., Avnir D., *J Agric Food Chem*, **1998**, 46, 3318-3324.
138. Kadnikova E.N., Kostic N.M., *J Non-Cryst Solids*, **2001**, 283, 63-68.
139. Shen C.Y., Kostic N.M., *J Am Chem Soc*, **1997**, 119, 1304-1312.
140. Gill I., *Chem Mater*, **2001**, 13, 3404-3421.
141. Brinker C.J., Scherer G.W., *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, **1990**, Editura Taylor&Francis, San Diego.
142. Pierre A.C., *Biocatal Biotransfor*, **2004**, 22 (3), 145-170.
143. Reetz M.T., Zonta A., Sempelkamp J., Rufinska A., Tesche B., *J Sol-Gel Sci Techn*, **1996**, 7, 35-43.

144. Kato K., Gong Y., Saito T., Yokogawa Y., *Biosci Biotechnol Biochem*, **2002**, 66 (1), 221-223.
145. Soares C. M. F., Santos O. A. A., Olivo J. E., de Castro H. F., Mores F. F., Zanin G.M., *J Mol Catal: B Enzym*, **2004**, 29, 69-79.
146. Hara P., Hanefeld U., Kanerva L.T., *J Mol Catal B: Enzym*, **2008**, 50, 80-86.
147. Moniruzzaman M., Nakashima K., Kamiya N., Goto M., *Biochemical Engineering Journal*, **2010**, 48, 295-314.
148. Liu Y., Wang M., Li J., Li Z., He P., Liu H., Li J., *Chem Commun*, **2005**, 1778-170.
149. Reetz M.T., Zonta A., Simpelkamp J., *Angew Chem Int Ed*, **1995**, 34, 301-303.
150. Avnir D., Coradin T., Lev O., Livage J., *J Mater Chem*, **2006**, 16, 1013-1030.
151. Liu Y., Shi L., Wang M., Li Z., Liu H., Li J., *Green Chem*, **2005**, 7, 655-658.
152. Lee S.H., Doan T.T.N., Ha S.H., Koo Y.M., *J Mol Catal B: Enzym*, **2007**, 45, 57-61.
153. Ghanem A., *Tetrahedron*, **2007**, 63, 1721-1754
154. Sih, C. J., Wu, S. H. *Top Stereochem*, **1989**, 19, 63-125.
155. Carrea G., Riva S., *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*, **2008**, Editura Wiley-VCH, Weinheim.
156. Overbeeke P.L.A., Jongejan J.A., Heijnen J.J., *Biotechnol Bioeng*, **2000**, 70 (3), 278-290.
157. Zaks A., Klivanov A.M., *Proc Natl Acad Sci USA*, **1985**, 82, 3192-3196.
158. Wang Y., Li Q., Zhang Z., Ma J., Feng Y., *J Mol Catal B: Enzym*, **2009**, 56, 146-150.
159. Hernandez-Fernandez F. J., de los Rios A. P., Lozano-Blanco L. J., Godinez C., *J Chem Technol Biotechnol*, **2010**, 85, 1423-1435.
160. Matsuda T., *Future Directions in Biocatalysis*, Elsevier, **2007**, Amsterdam, Olanda.
161. Wasserscheid P., Stark A., *Green Solvents, Vol. 6: Ionic Liquids*, **2010**, Editura Wiley-VCH, Weinheim.
162. Wasserscheid P., Welton T., *Ionic Liquids in Synthesis*, **2008**, Editura Wiley-VCH, Weinheim.
163. Cull S.G., Holbrey J.D., Vargas-Mora V., Seddon K.R., Lye G.J., *Biotechnol Bioeng*, **2000**, 69, 227-233.
164. Erbdinger M., Mesiano A.J., Russell A.J., *Biotechnol Prog*, **2000**, **16**, 1129-1131.
165. Lau R.M., van Rantwijk F., Seddon K.R., Sheldon R.A., *Org Lett*, **2000**, 2, 4189-4191.
166. Itoh T., Akasaki E., Kudo K., Shirakami S., *Chem Lett*, **2001**, 262-263.
167. Gorke J., Srienc F., Kazlauskas R., *Biotechnol Bioproc Eng*, **2010**, 15, 40-53.
168. Durand J., Teuma E., Gomez M., *C R Chimie*, **2007**, 10, 152-177.
169. De Diego T., Lozano P., Abad M.A., Steffensky K., Vaultier M., Iborra J.L., *J Biotechnol*, **2009**, 140, 234-241.
170. Lozano P., De Diego T., Carrie D., Vaultier M., Iborra J.L., *Biotech Lett*, **2001**, 23, 1529-1533.

171. Maruyama T., Nagasawa S., Goto M., *Biotechnol Lett*, **2002**, *24*, 1341-1345.
172. Maruyama T., Yamamura H., Kotani T., Kamiya N., Goto M., *Org Biomol Chem*, **2004**, *2*, 1239-1244.
173. Lundell K., Kurki T., Lindroos M., Kanerva L.T., *Adv Synth Catal*, **2005**, *347*, 1110-1118.
174. Park S., Kazlauskas R.J., *Curr Opin Biotechnol*, **2003**, *14*, 432-437.
175. Yang J., Liu L., Cao X., *Enzyme Microb Tech*, **2010**, *46*, 257-261.
176. Bornscheuer U.T., Bessler C., Srinivas R., Krishna S.H., *Trends Biotechnol*, **2002**, *10* (10), 433-437.
177. **Ursoiu A.**, Paul C., Kurtan T., Peter F., *Molecules*, **2012**, *17* (11), 13045-13061.
178. Kazlauskas R.J., Weissfloch A.N.E., Rappaport A.T., Cuccia L.A., *J Org Chem*, **1991**, *56* (8), 2656-2665.
179. Rottici D., Haeffner F., Orrenius C., Norin T., Hult K., *J Mol Catal B: Enzym*, **1998**, *5*, 267-272.
180. Peter F., Zarcu C., Kakasi-Zsurka S., Croitoru R., Davidescu C., Csunderlik C., *J Biotechnol*, **2008**, *136S*, S374.
181. Zarcu C., Corici L., Croitoru R., **Ursoiu A.**, Peter F., *J Mol Catal B: Enzym*, **2010**, *65*, 79-86.
182. Tomin A., Weiser D., Hellner G., Bata Z., Corici L., Peter F., Koczka B., Poppe L., *Process Biochem*, **2011**, *46*, 52-58.
183. Peter F., Paul C., **Ursoiu A.**, "Applications of ionic liquids to increase the efficiency of lipase biocatalysis", in "Ionic Liquids: Applications and Perspectives", edited by Alexander Kokorin, **2011**, ISBN: 978-953-307-248-7.
184. **Ursoiu A.**, Borza P., Paul C., Peter F., *Chem Bull "Politehnica" Univ (Timisoara)*, **2012**, *57* (71), 42-45.
185. Zhao H., Malhotra S.V., *Biotechnol Lett*, **2002**, *24*, 1257-1260.
186. Gorke J.T., Okrasa K., Louwagie A., Kazlauskas R.J., Srienc F., *J Biotechnol*, **2007**, *132*, 306-313.
187. Reichardt C., *Green Chem*, **2005**, *7*, 339-351.
188. Kawakami, K.; Yoshida, S., *J. Ferment. Bioeng.*, **1996**, *82* (3), 239-245.
189. Furukawa S. Y., Kawakami K., *J. Ferment. Bioeng.*, **1998**, *85*, 240-242.
190. **Ursoiu A.**, Paul C., Marcu C., Ungurean M., Peter F., *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **2011**, *76*, 70-74.
191. **Ursoiu A.**, Paul C., Marcu C., Peter T., Peter F., *Annals of West University of Timisoara*, **2010**, *19* (2), 17-22.
192. **Ursoiu A.**, Paul C., Marcu C., Kurtan T., Zamfir A., Peter F., *Annals of West University of Timisoara*, **2011**, *20* (3), 47-52.
193. Zhou Y., Schattka J.H., Antonietti M., *Nano Lett*, **2004**, *4*, 477-481.
194. Meunier S.M., Legge R.L., *J Mol Catal B: Enzym*, **2010**, *62*, 54-58.
195. Noureddini H., Gao X., *J Sol-Gel Techn*, **2007**, *41*, 31-41.
196. Rouquerol J., Avnir D., Fairbridge C.W., Everett D.H., Haynes J.H., Pernicone N., Ramsay J.D.F., Sing K.S.W., Unger K.K., *Pure & Appl Chem*, **1994**, *66* (8), 1739-1758.
197. Klobes P., Meyer K., Munro R.G., *Porosity and Specific Surface Area Measurements for Solid Materials*, **2006**, U.S. Government Printing Office, Washington.

ANEXE

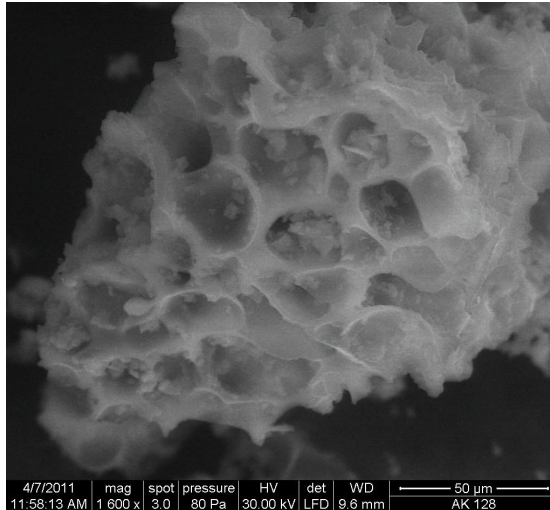


Figura 1. Imaginea SEM la magnificație 1600 a preparatului enzimatic AK128 obținut din precursorii PhTMOS:MeTMOS:TMOS la un raport molar de 1:1:1.

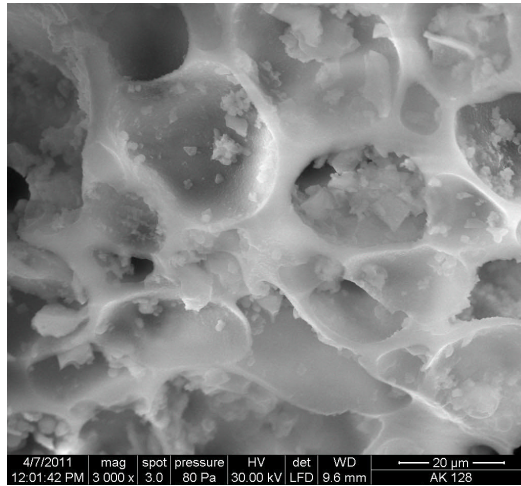


Figura 2. Imaginea SEM la magnificație 3000 a preparatului AK2.

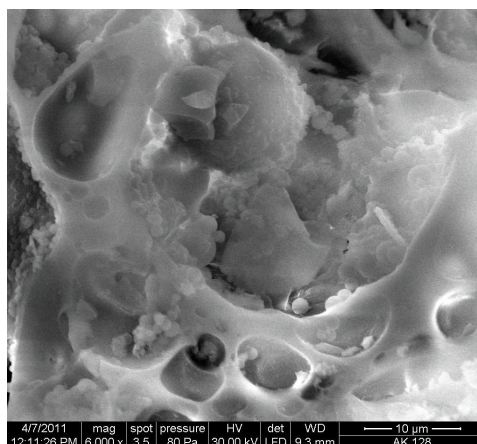


Figura 3. Imaginea SEM la magnificație 6000 a preparatului AK2.

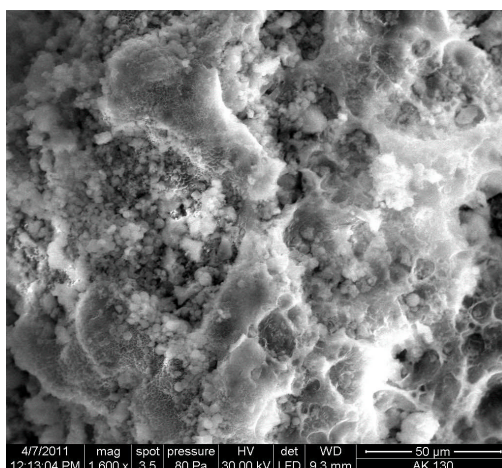


Figura 4. Imaginea SEM la magnificație 1600 a preparatului AK4 obținut din precursorii PhTMOS:MeTMOS:TMOS la un raport molar de 1,6:0,4:1.

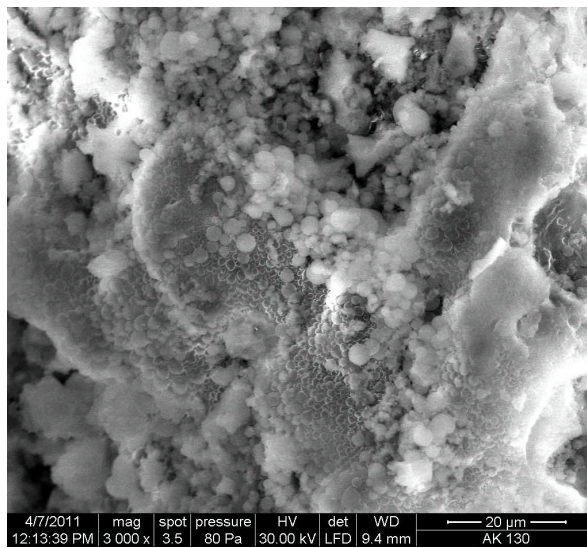


Figura 5. Imaginea SEM la magnificație 3000 a preparatului AK4.

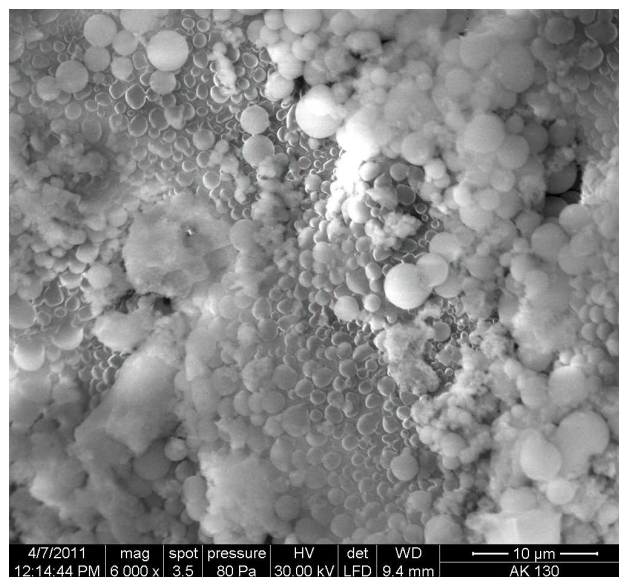


Figura 6. Imaginea SEM la magnificație 6000 a preparatului AK4.

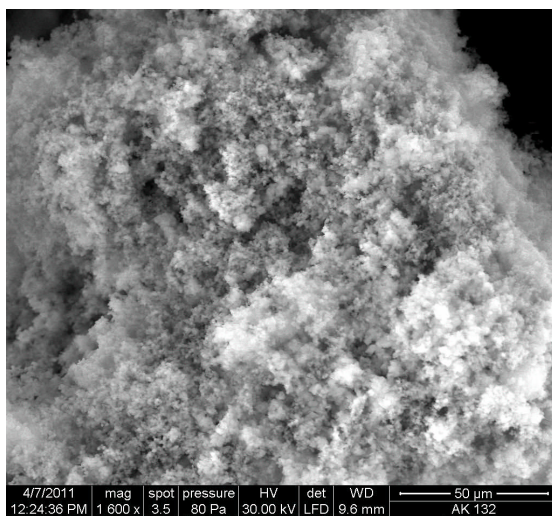


Figura 7. Imaginea SEM la magnificație 1600 a preparatului AK6 obținut din precursorii PhTMOS:MeTMOS:TMOS la un raport molar de 0,4:1,6:1.

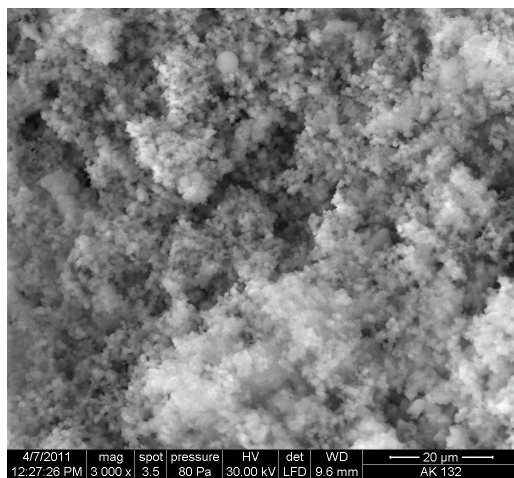


Figura 8. Imaginea SEM la magnificație 3000 a preparatului AK6.

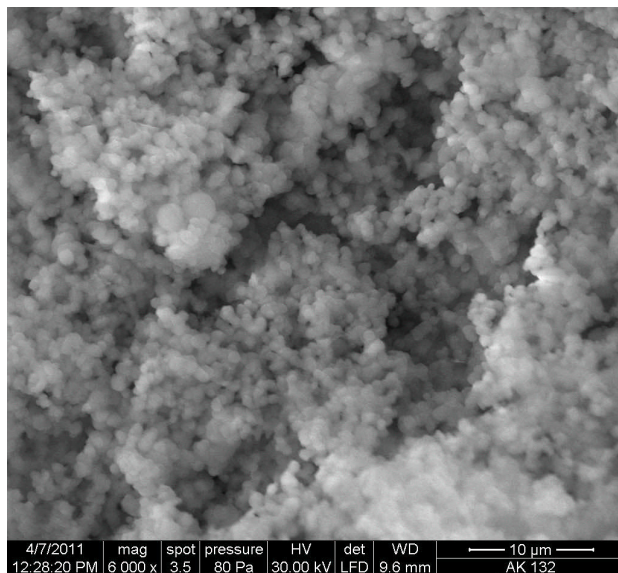


Figura 9. Imaginea SEM la magnificație 6000 a preparatului AK6.

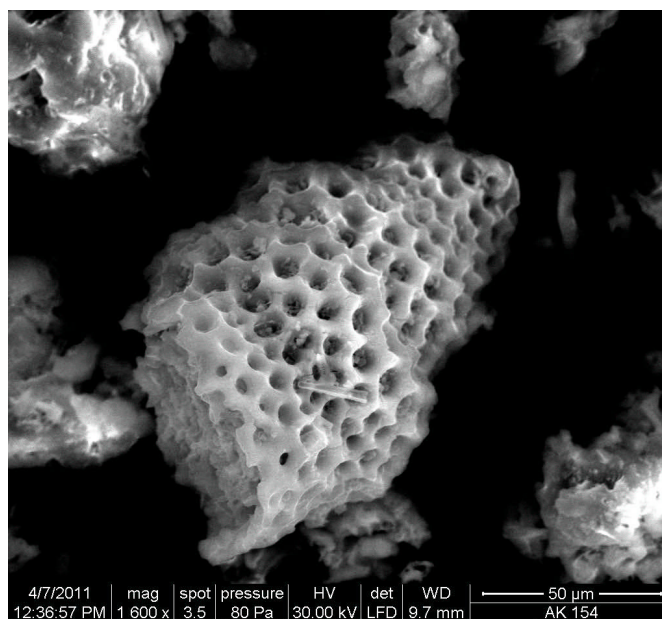


Figura 10. Imaginea SEM la magnificație 1600 a preparatului AK18 obținut prin dublă imobilizare pe Celite 545 (precursorii PhTMOS:MeTMOS:TMOS la un raport molar de 1,6:0,4:1).

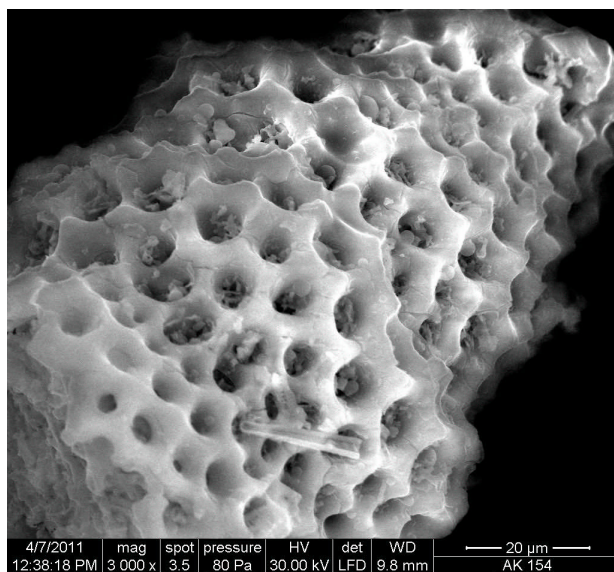


Figura 11. Imaginea SEM la magnificație 3000 a preparatului AK18.

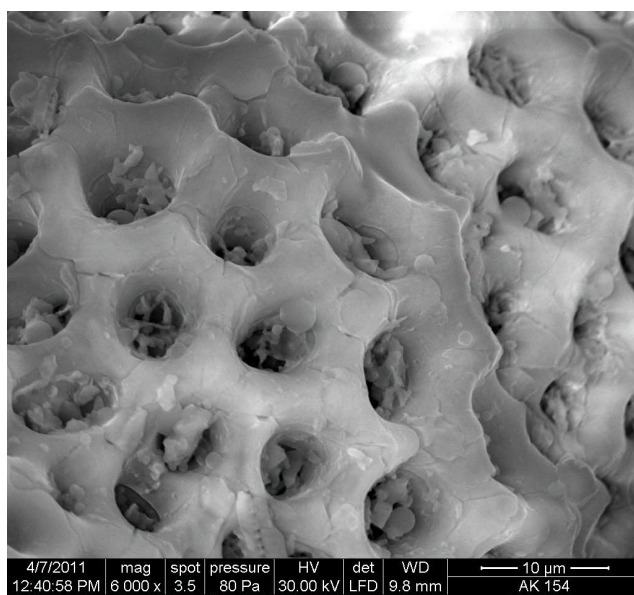


Figura 12. Imaginea SEM la magnificație 6000 a preparatului AK18.

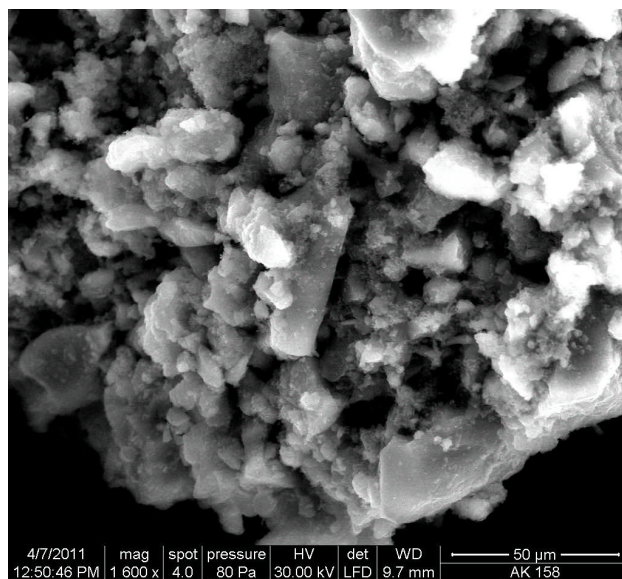


Figura 13. Imaginea SEM la magnificație 1600 a preparatului AK14 obținut cu TMOS (6 mmoli).

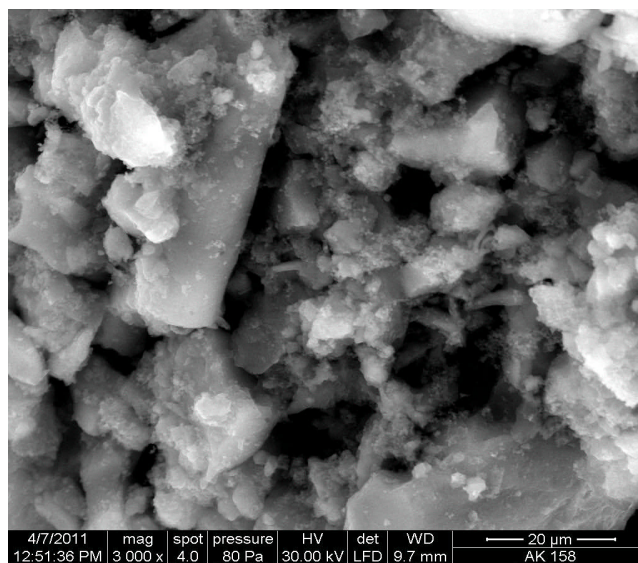


Figura 14. Imaginea SEM la magnificație 3000 a preparatului AK14 obținut cu TMOS (6 mmoli).

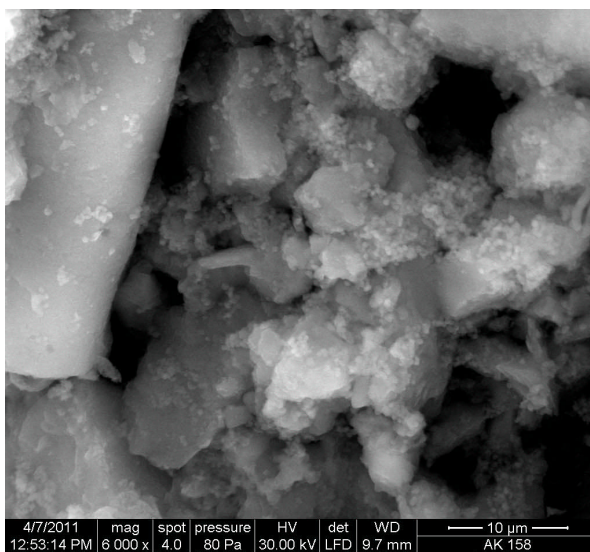


Figura 15. Imaginea SEM la magnificație 6000 a preparatului AK14 obținut cu TMOS (6 mmoli).

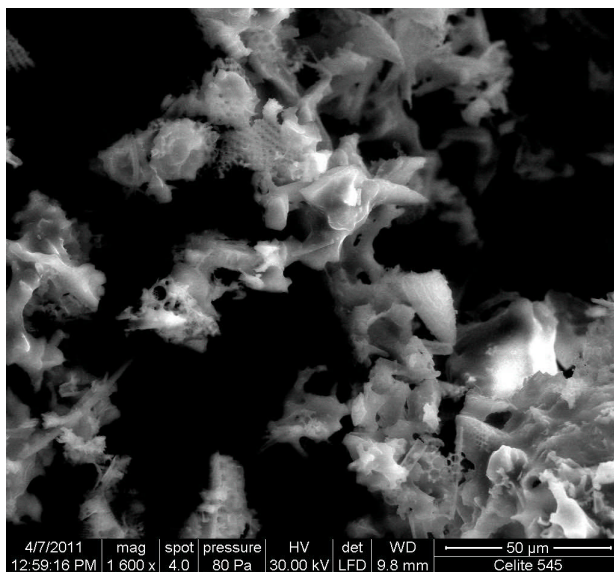


Figura 16. Imaginea SEM la magnificație 1600 a Celitei 545

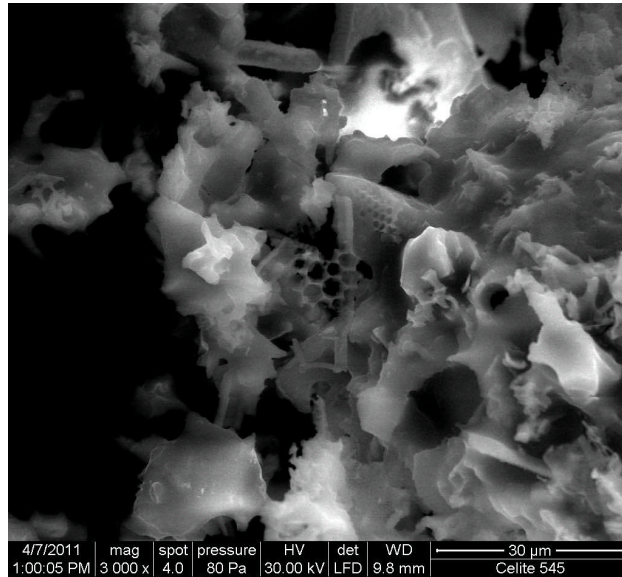


Figura 17. Imaginea SEM la magnificație 3000 a Celitei 545.

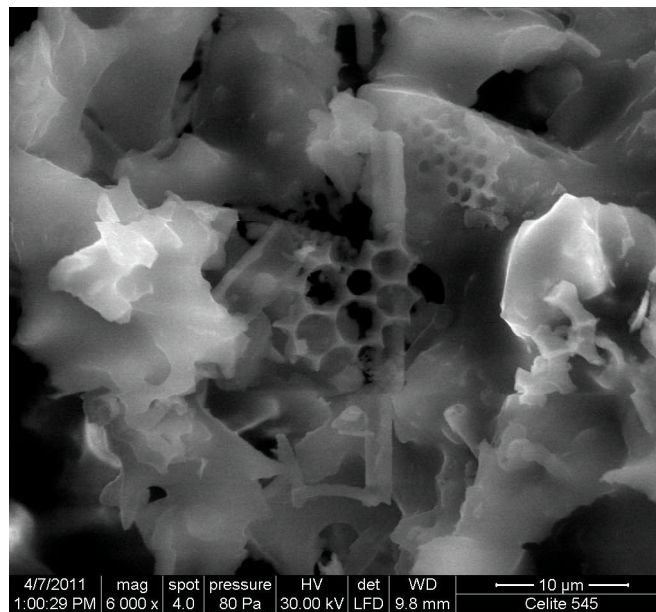


Figura 18. Imaginea SEM la magnificație 6000 a Celitei 545.

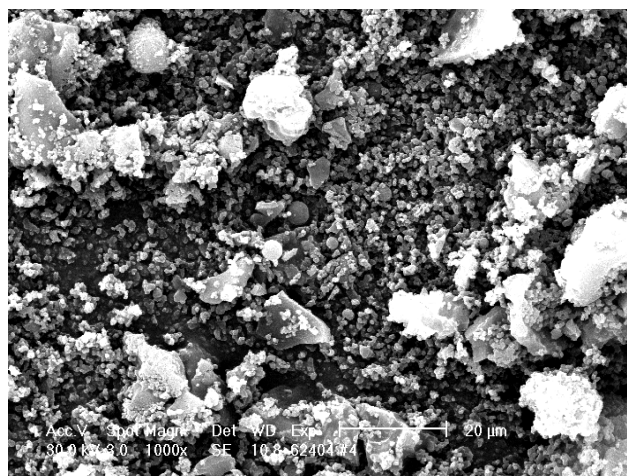


Figura 19. Imaginea SEM la magnificație 1000 a preparatului CAL4 obținut din precursorii PhTMOS:MeTMOS:TMOS la un raport molar de 1,6:0,4:1.

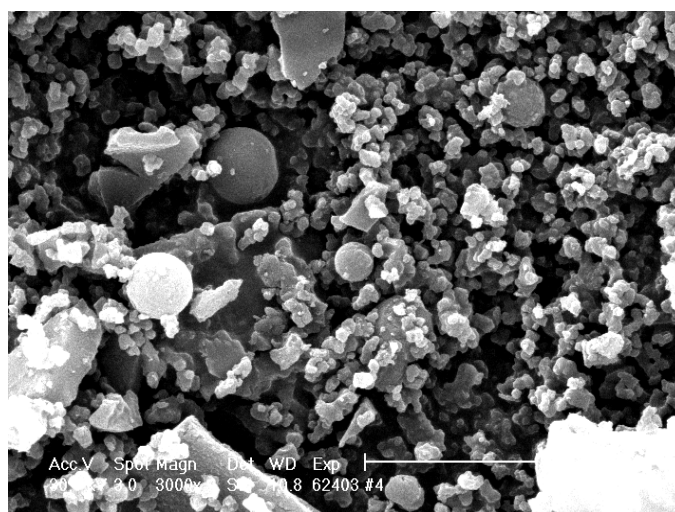


Figura 20. Imaginea SEM la magnificație 3000 a preparatului CAL4.

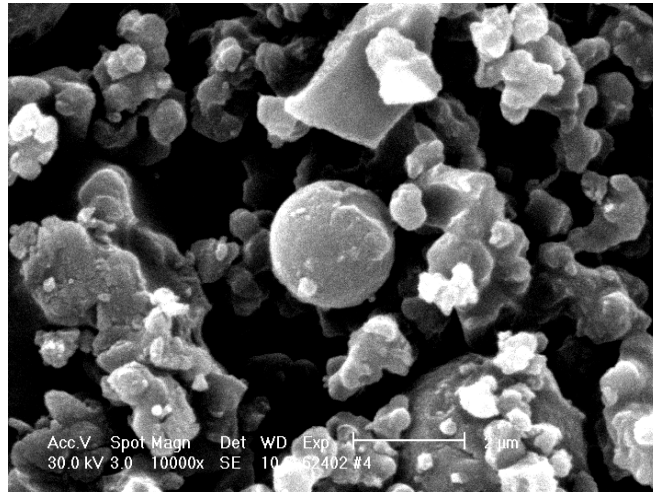


Figura 21. Imaginea SEM la magnificație 10000 a preparatului CAL4.

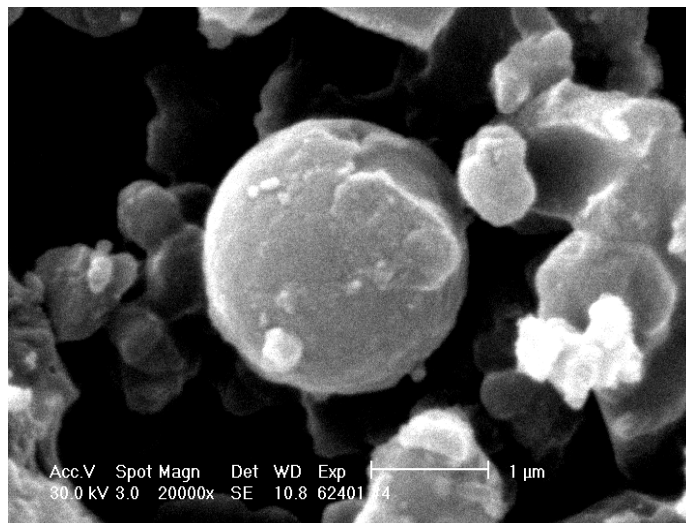


Figura 22. Imaginea SEM la magnificație 20000 a preparatului CAL4.

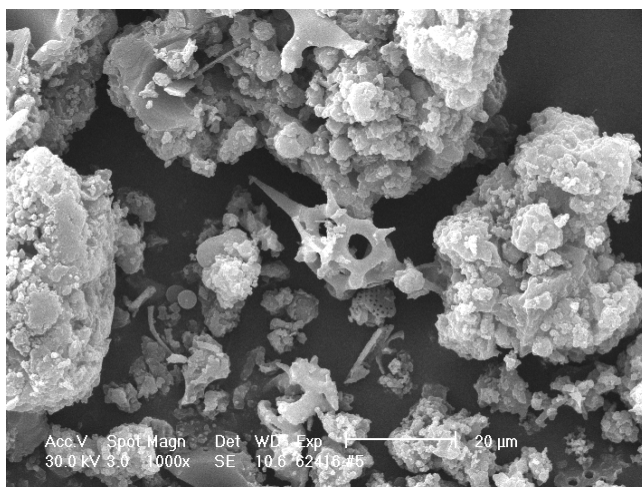


Figura 23. Imaginea SEM la magnificație 1000 a preparatului CAL40 obținut prin dublă imobilizare pe Celite 545 (precursorii PhTMOs:MeTMOs:TMOS la un raport molar de 1,6:0,4:1).

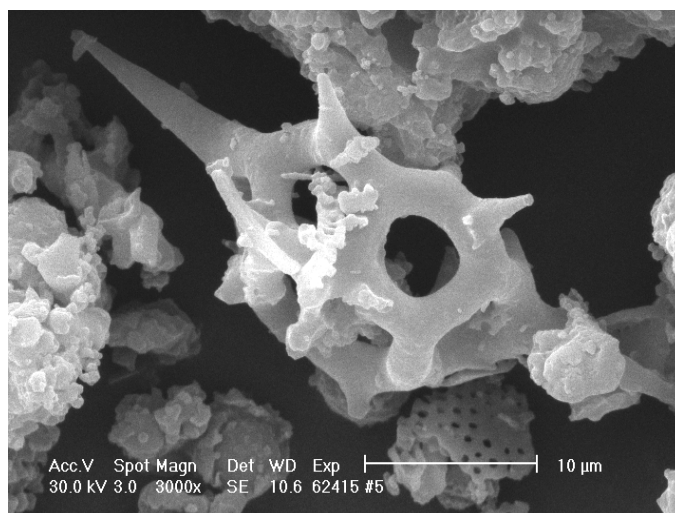


Figura 24. Imaginea SEM la magnificație 3000 a preparatului CAL40

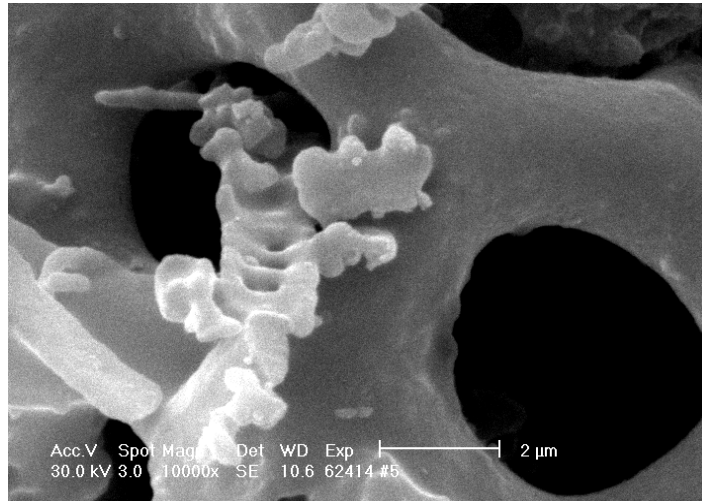


Figura 25. Imaginea SEM la magnificație 10000 a preparatului CAL40.

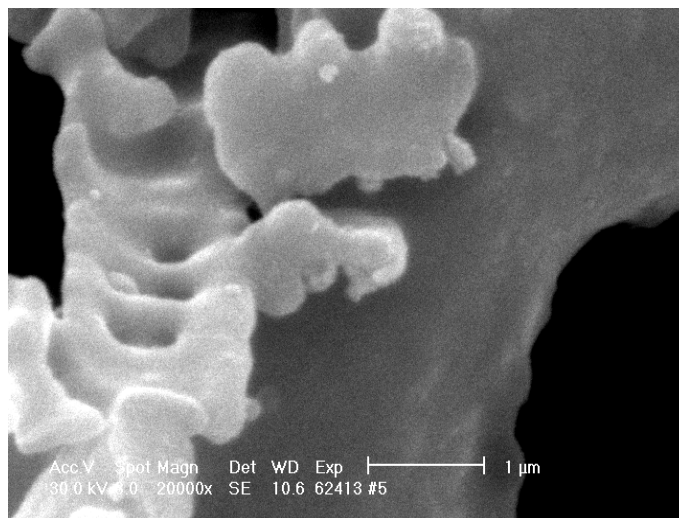


Figura 26. Imaginea SEM la magnificație 20000 a preparatului CAL40.

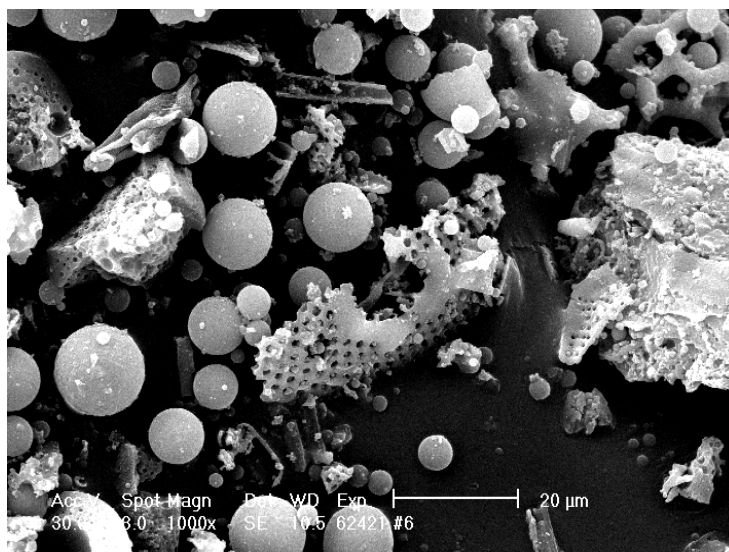


Figura 27. Imaginea SEM la magnificație 1000 a preparatului CAL67 obținut prin dublă imobilizare pe Celite 545 (SOL prepolimer: precursorii PhTMOS:MeTMOS:TMOS la un raport molar de 1,6:0,4:1).

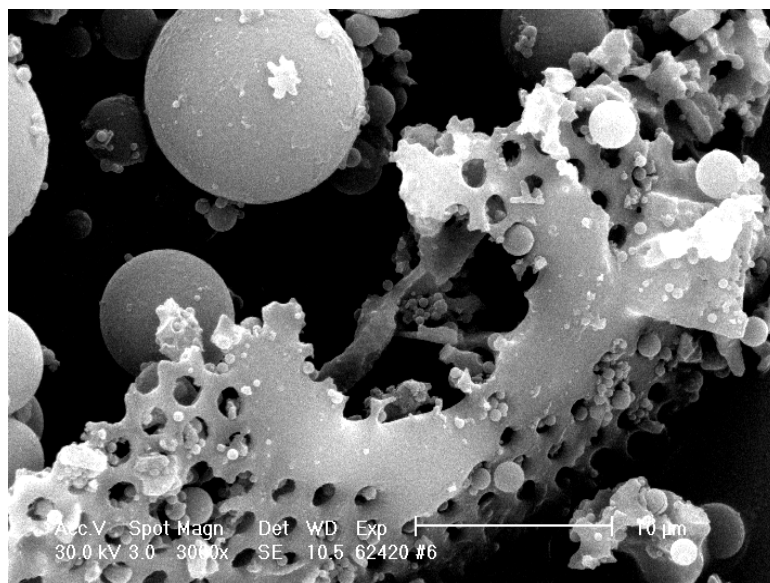


Figura 28. Imaginea SEM la magnificație 3000 a preparatului CAL67.

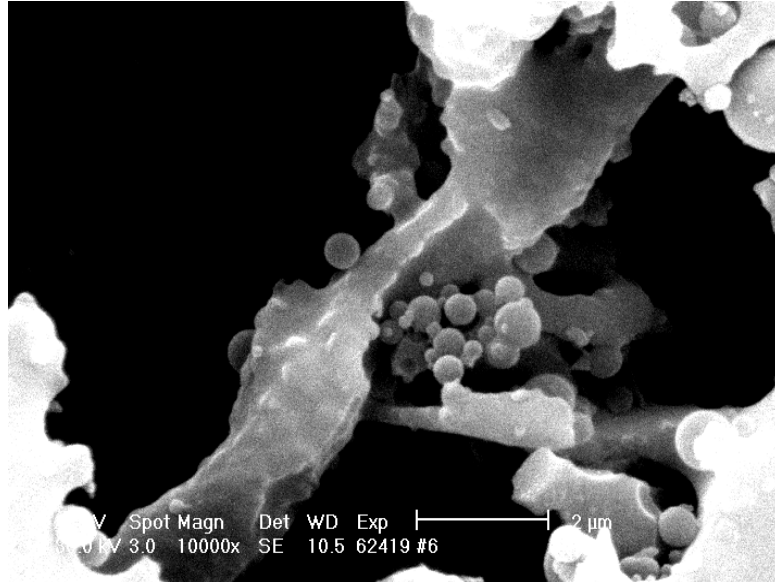


Figura 29. Imaginea SEM la magnificație 10000 a preparatului CAL67.

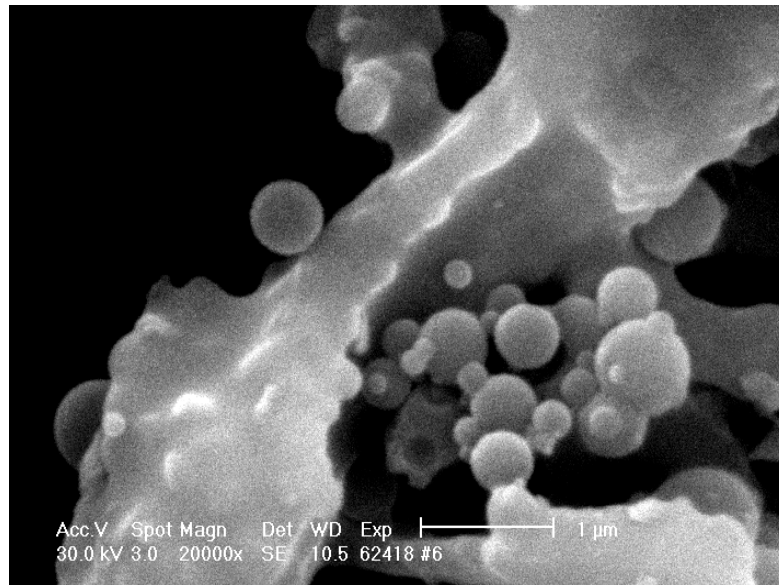


Figura 30. Imaginea SEM la magnificație 20000 a preparatului CAL67

LISTĂ DE LUCRĂRI

Brevete de invenție

Peter F., Paul C., **Ursoiu A.**, Biocatalizator obținut prin metoda de dublă imobilizare cu utilizarea unui lichid ionic ca aditiv, A/01196/26.11.2010, rezumat publicat în **29.06.2012** în Buletinul Oficial de Proprietate Industrială secțiunea Brevete de Invenții **Nr. 6/2012**, pp. 42. <http://www.osim.ro/publicatii/bopi12.htm> (BOPI nr. 6/2012)

Cărți

Peter F., Paul C., **Ursoiu A.**, Applications of ionic liquids to increase the efficiency of lipase biocatalysis – capitol în cartea *Ionic liquids – Applications and perspectives*, InTech, **2011**, pp. 481-498.

Lucrări publicate în reviste naționale și internaționale

Zarcuța C., Corîci L., Croitoru R., **Ursoiu A.**, Peter F., Preparation and properties of xerogels obtained by ionic incorporation during the immobilization of lipase by sol-gel method, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2010**, *65*, pp. 79-86 (factor de impact 2,33).

Ursoiu A., Paul C., Kurtan T., Peter F., Sol-gel entrapped *Candida antarctica* lipase B - A biocatalyst with excellent stability for kinetic resolution of secondary alcohols, *Molecules*, **2012**, *17* (11), 13045-13061 (factor de impact 2,386).

Ursoiu A., Paul C., Marcu C., Ungurean M., Peter F., Double immobilized lipase for the kinetic resolution of secondary alcohols, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **2011**, *76*, pp. 70-74.

Ursoiu A., Paul C., Marcu C., Peter T., Peter F., Binary and ternary silane precursor systems for immobilization of lipases, *Annals of West University of Timișoara*, **2010**, *19* (2), pp. 17-22.

Ursoiu A., Paul C., Marcu C., Kurtan T., Zamfir A., Peter F., Solid-phase immobilized biocatalysts for optical resolution of secondary alcohols, *Annals of West University of Timișoara*, **2011**, *20* (3), pp. 47-52.

Ursoiu A., Borza P., Paul C., Peter F., Influence of silane precursors system composition on the catalytic efficiency of sol-gel immobilized lipases, *Chem Bull "Politehnica" Univ (Timișoara)*, **2012**, *57* (71), 42-45.

Lucrări comunicate

Ursoiu A., Paul C., Marcu C., Peter F., Optimization of secondary alcohols kinetic resolution by sol-gel entrapped lipases, *2nd International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, Timișoara, Romania, **2010**, pp. 43.

Ursoiu A., Paul C., Marcu C., Peter F., Influence of the precursor system composition on catalytic performance and operational stability of sol-gel entrapped lipases, *International Congress on Biocatalysis Hamburg*, Biocat2010, Germania, **2010**, pp. 140.

Ursoiu A., Paul C., Marcu C., Peter F., Creșterea stabilității termice și operaționale a unor lipaze microbiene prin entrapare în sol-gel, *The XXXI-st Romanian Chemistry Conference, Râmnicu Vâlcea, România*, **2010**, pp. 82.

Ursoiu A., Ungurean M., Paul C., Peter F., Optimization of 2-octanol kinetic resolution by selection of sol-gel immobilization precursors and reaction parameters, *14th International Biotechnology Symposium and Exhibition IBS 2010*, Rimini, Italia, *Journal of Biotechnology*, **2010**, 150S, pp. 388-389.

Ursoiu A., Paul C., Marcu C., Ungurean M., Kurtan T., Zamfir A. D., Peter F., Kinetic resolution of secondary alcohols using immobilized lipase from *Candida antarctica* B, *12th Edition of Timisoara's Academic Days, Chemistry*, Timișoara, Romania, **2011**, pp. 114.

Ursoiu A., Ungurean M., Todea A., Corîci L., Croitoru R., Paul C., Boeriu C., Peter F., [Optimization of biocatalytic function of hydrolases entrapped in tailored sol-gel materials](#), *15th European Congress on Biotechnology*, Istanbul, Turcia, *New Biotechnology*, **2012**, 29/S, pp. 566-567.

Alte lucrări

Ungurean M., Fițigău F., Paul C., **Ursoiu A.**, Péter F., Ionic liquid pretreatment and enzymatic hydrolysis of wood biomass, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **2011**, 76, pp. 329-333.

Ungurean M., Fițigău F., Paul C., **Ursoiu A.**, Péter F., Comparison of different pretreatment methods of lignocellulosic biomass: delignification and enzymatic hydrolysis, *The 12th Edition of Timisoara's Academic Days*, Timișoara 26-27 Mai **2011**, 113, ISSN 2065-0760.

Ungurean M., Fițigău F., **Ursoiu A.**, Péter F., Paul C., Immobilization of cellulases by the sol-gel method, *The 7th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries RRB7*, Bruges 8-10 June **2011**, pp. 99.

Leonov S.L., **Ursoiu A.**, Paul C., Peter F., Bahrim G., Boeriu C., The cold-active lipase from *Pseudomonas fluorescens* MP11: Possibly a new valuable biocatalyst, *Euro-Aliment*, Galați, Romania, **2011**, pp. 54.