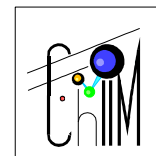


UNIVERSITATEA „POLITEHNICA” DIN TIMIȘOARA
Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului



TEZĂ DE DOCTORAT

REAȚII BIOCATALITICE MEDIATE DE ENZIME HIDROLITICE IMOBILIZATE PRIN METODA SOL-GEL

Conducător științific:
Prof. Dr. CSUNDERLIK CAROL

Doctorand:
Ing. ZARCULA ANA CRISTINA

2009

CUPRINS

	Pag.
Introducere	
Abrevieri	1
1. Studiu documentar	3
1.1. Biocataliză și biocatalizatori	3
1.2. Structura și proprietățile catalitice ale lipazelor	6
1.2.1. Sursele și utilizarea lipazelor	6
1.2.2. Clasificarea lipazelor	9
1.2.3. Plierea α/β hidrolazică	11
1.2.4. Activarea la interfață și rolul capacului elicoidal	12
1.2.5. Influența conformației capacului elicoidal asupra enantioselectivității lipazelor	16
1.2.6. Structura unor lipaze din genul <i>Pseudomonas</i>	20
1.2.7. Structura lipazei din <i>Burkholderia cepacia</i>	23
1.2.8. Mecanismul reacțiilor catalizate de lipaze	26
1.3. Imobilizarea lipazelor	29
1.3.1. Imobilizarea prin adsorbție	31
1.3.2. Imobilizarea prin entrapare în sol-gel	33
1.3.2.1. Tipuri de precursori sol-gel	36
1.3.2.2. Tehnica entrapării enzimelor în sol-gel	37
1.3.2.3. Tipuri de biocompuși derivați de sol-gel	39
1.3.2.4. Factori care influențează activitatea, selectivitatea și stabilitatea enzimelor entrapate	41
1.3.2.4.1. Silanii precursori	41
1.3.2.4.2. Raportul stoechiometric apă/silan	43
1.3.2.4.3. Încărcarea cu enzimă	43
1.3.2.4.4. Imobilizarea în prezență de aditivi (compuși de modelare a structurii)	44
1.3.2.5. Îmbunătățirea proprietăților enzimelor entrapate	49
1.3.2.5.1. Depunerea pe suport a enzimei entrapate	49
1.3.2.5.2. Bioimprimarea cu analogi de substrat	51
1.3.2.5.3. Tratament cu solvenți organici	52
1.3.2.6. Aplicații ale biocatalizatorilor entrapați în sol-gel	53
1.3.2.6.1. Biosenzori optici și electrochimici	53
1.3.2.6.2. Aplicații biocatalitice	53
1.3.2.7. Biocataliză în mediu de solvenți organici	55
1.3.2.8. Biocataliză în mediu de lichide ionice	61
2. Contribuții originale	68
2.1. Studiul reacțiilor de esterificare catalizate de lipaze imobilizate prin adsorbție și entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție	68
2.1.1. Influența naturii suportului solid asupra eficienței catalitice în reacții de esterificare catalizate de PPL imobilizată prin adsorbție	68

2.1.2.	Studiul reacțiilor de esterificare prin biocataliză cu PPL dublu imobilizată	69
2.1.2.1.	Optimizarea metodei de imobilizare	69
2.1.2.2.	Influența naturii suportului solid și a catalizatorului de gelifiere	72
2.1.2.3.	Influența temperaturii de maturare a gelului	74
2.1.2.4.	Imobilizarea prin entraparea enzimei adsorbite	75
2.1.3.	Concluzii	76
2.2.	Studiul acilării enantioselective a unor alcooli secundari alifatici prin biocataliză cu lipaze imobilizate prin metoda sol-gel	77
2.2.1.	Selectarea lipazelor	77
2.2.2.	Studii de acilare enantioselectivă a alcoolilor secundari alifatici cu lipază din <i>Pseudomonas fluorescens</i> imobilizată prin entrapare în sol-gel	79
2.2.2.1.	Optimizarea metodei de imobilizare a lipazei Amano AK folosind precursorii MeTMOS și TMOS	79
2.2.2.2.	Studiul discriminării cinetice dintre izomerii 2-heptanolului și 2-octanolului	81
2.2.2.3.	Studiul influenței naturii grupării nehidrolizabile asupra activității și enantioselectivității lipazei Amano AK imobilizate	83
2.2.3.	Studii de acilare enantioselectivă a alcoolilor secundari alifatici cu lipază din <i>Burkholderia cepacia</i> imobilizată prin entrapare în sol-gel	89
2.2.3.1.	Optimizarea metodei de imobilizare a lipazei Amano PS folosind precursorii MeTMOS și TMOS	89
2.2.3.2.	Studiul influenței naturii grupării nehidrolizabile asupra activității și enantioselectivității lipazei Amano PS imobilizate	90
2.2.4.	Concluzii	95
2.3.	Studiul acilării enantioselective a alcoolilor secundari alifatici prin biocataliză cu lipaza Amano AK dublu imobilizată	96
2.3.1.	Lipază Amano AK dublu imobilizată utilizând derivați metoxisilanici și Celite 545	97
2.3.2.	Lipază Amano AK dublu imobilizată utilizând derivați etoxisilanici și Celite 545	101
2.3.3.	Studiul influenței grupării nehidrolizabile din silanul precursor asupra eficienței biocatalizatorilor	104
2.3.4.	Studiul influenței grupării alchil din alcoolul secundar asupra eficienței biocatalitice	106
2.3.5.	Evaluarea comparativă a metodelor de imobilizare prin adsorbție și entrapare în sol-gel, simplă și combinată	107
2.3.6.	Concluzii	108
2.4.	Studiul utilizării lichidelor ionice ca aditivi la imobilizarea lipazei Amano AK prin metoda sol-gel	109
2.4.1.	Influența naturii lichidului ionic	109
2.4.2.	Optimizarea metodei de imobilizare a lipazei Amano AK folosind precursorii MeTMOS și TMOS și lichid ionic ca aditiv	111
2.4.3.	Influența structurii silanului precursor	112
2.4.4.	Influența structurii substratului și a lichidului ionic	115

2.4.5.	Randamente de imobilizare	117
2.4.6.	Concluzii	118
2.5.	Influența mediului de reacție asupra eficienței catalitice a lipazei Amano AK imobilizată prin metoda sol-gel	119
2.5.1.	Acilarea 2-hexanolului în medii de reacție organice și de lichide ionice	119
2.5.2.	Studiul reacției de acilare a alcoolilor secundari alifatici în medii organice și de lichide ionice	123
2.5.3.	Influența mediului de reacție și a silanului precursor asupra capacității biocatalitice a lipazei Amano AK imobilizată prin metoda combinată	127
2.5.4.	Evaluarea comparativă a capacității biocatalitice în medii organice și de lichide ionice a preparatelor de lipază AK imobilizate prin diferite metode	130
2.5.5.	Concluzii	133
2.6.	Studiul termostabilității lipazei Amano AK nativă sau imobilizată în reacția de acilare a 2-hexanolului	135
2.6.1.	Concluzii	138
2.7.	Studiul reutilizării lipazei imobilizate prin entrapare în sol-gel, simplă sau combinată	138
2.7.1.	Reutilizarea în mediu organic	138
2.7.2.	Reutilizarea în mediu de lichid ionic	141
2.7.3.	Concluzii	143
2.8.	Caracterizarea preparatelor obținute prin metoda sol-gel	143
2.8.1.	Investigarea structurii preparatelor imobilizate cu ajutorul microscopiei electronice de scanare cuplată cu microanaliză prin raze X (SEM-EDX)	143
2.8.2.	Caracterizarea preparatelor imobilizate prin spectroscopie IR	150
2.8.3.	Concluzii	155
3.	Partea experimentală	157
3.1.	Metode de imobilizare a lipazelor	157
3.1.1.	Imobilizarea prin adsorbție	157
3.1.2.	Imobilizarea prin entrapare în sol-gel	158
3.1.3.	Imobilizarea prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție	162
3.1.4.	Imobilizarea prin adsorbție urmată de entrapare în sol-gel	165
3.2.	Metode de analiză	166
3.2.1.	Analiza cantitativă prin cromatografie de gaze	166
3.2.2.	Metoda Lowry de determinare a proteinelor	168
3.2.3.	Microscopie electronică de scanare (SEM) cuplată cu spectrometrie de raze X cu dispersie de energie (EDX)	170
3.2.4.	Spectroscopie de IR	171
3.3.	Rețete de lucru	172
3.3.1.	Reacții de esterificare	172
3.3.2.	Reacții de transesterificare	173
3.3.2.1.	Reutilizarea preparatelor enzimactice în reacții de transesterificare în mediu organic	174

Cuprins

3.3.2.2.	Reutilizarea preparatelor enzimaticice în reacții de transesterificare în mediu de lichid ionic	175
4.	Concluzii finale	177
5.	Bibliografie	185
	Anexă	194

INTRODUCERE

Una dintre principalele provocări pe care trebuie să le rezolve industria chimică în viitorul apropiat este cea a resurselor pe care le utilizează. Atunci când se vorbește despre perspectivele viitoare, acestea sunt tot mai frecvent asociate cu utilizarea unor resurse reînnoibile, deși au fost și vor fi făcute progrese importante și în ce privește creșterea productivității și reducerea consumurilor de energie ale proceselor existente. Pe calea utilizării unor asemenea resurse se situează valorificarea proceselor catalizate de enzime pentru obținerea de produse chimice.

Biocataliza industrială s-a dovedit într-o serie de procese o alternativă viabilă a tehnologiilor chimice clasice. Enzimele prezintă avantajele selectivității ridicate, costurilor de operație și investiții scăzute, cantităților mai mici de produși secundari și consumurilor energetice reduse. Principalul impediment pentru utilizarea industrială este vulnerabilitatea lor în condițiile de proces și în special costul ridicat al enzimelor. În aceste situații, imobilizarea s-a dovedit a fi metoda cea mai valoroasă pentru a crește stabilitatea operațională a enzimelor și a permite separarea lor ușoară din amestecul de reacție în vederea unor utilizări repetate.

Tehnica sol-gel face parte dintre metodele de imobilizare bazate pe închiderea (entraparea) enzimei într-o matrice polimeră poroasă și oferă în acest sens o serie de avantaje, întrucât conformația enzimei nu este modificată și pericolul inactivării în urma imobilizării este mai redus.

Lichidele ionice sunt compuși considerați de mare viitor în calitate de solvenți "curați", care datorită nevolatilității lor și stabilității termice ridicate vor putea înlocui solvenții organici volatili utilizați la ora actuală în majoritatea proceselor. În biocataliza cu enzime imobilizate prin metoda sol-gel a apărut însă posibilitatea de a folosi lichidele ionice în calitate de aditivi în timpul imobilizării, pentru a îmbunătăți proprietățile gelului, în principal printr-un efect de stabilizare, protejând enzima de alcoolul eliberat în timpul procesului de entrapare în sol-gel precum și de efectele contractării gelului în timpul uscării.

Cercetările efectuate în cadrul tezei de doctorat au urmărit elaborarea de noi metode de imobilizare prin entrapare în sol-gel a lipazei din pancreas de porc PPL, *Pseudomonas fluorescens* Amano AK și *Burkholderia cepacia* Amano PS, precum și optimizarea parametrilor de imobilizare în vederea obținerii unei eficiențe catalitice maxime și a unei enantioselectivități ridicate a preparatelor imobilizate, utilizate ca și biocatalizatori în reacții de esterificare și acilare enantioselective, în diferite medii de reacție. Prin utilizarea lichidelor ionice atât ca aditivi în cursul formării rețelei de sol-gel cât și ca mediu de reacție s-a realizat o nouă cale de îmbunătățire a eficienței proceselor biocatalitice, datorită stabilității crescute a biocatalizatorilor imobilizați, separării mai ușoare a produșilor de reacție în etapele de reutilizare, cât și a reducerii poluării prin înlocuirea solvenților organici.

ABREVIERI

[2Pentmim]BF ₄	tetrafluoroborat de 1-(1-metilbutil)-3-metilimidazoliu
[Bmim]BF ₄	tetrafluoroborat de 1-butil-3-metilimidazoliu
[Bmim]lactat	lactat de 1-butil-3-metilimidazoliu
[Bmim]NO ₃	nitrat de 1-butil-3-metilimidazoliu
[Bmim]PF ₆	hexafluorofosfat de 1-butil-3-metilimidazoliu
[Bmim]Tf ₂ N	bis[(trifluorometil)sulfonil] amida de 1-butil-3-metilimidazoliu
[Bmim]TfO	trifluorometilsulfonat de 1-butil-3-metilimidazoliu
[C ₁₀ mim]BF ₄	tetrafluoroborat de 1-decil-3-metilimidazoliu
[C ₁₆ mim]BF ₄	tetrafluoroborat de 1-hexadecil-3-metilimidazoliu
[C ₁₆ mim]Cl	clorura de 1-hexadecil-3-metilimidazoliu
[C ₁₆ mim]Tf ₂ N	bis[(trifluorometil)sulfonil] amida de 1-hexadecil-3-metilimidazoliu
[Emim]BF ₄	tetrafluoroborat de 1-etil-3-metilimidazoliu
[Emim]EtSO ₄	etilsulfat de 1-butil-3-metilimidazoliu
[Emim]OcSO ₄	octilsulfat de 1-butil-3-metilimidazoliu
[Emim]OOCF ₃	trifluoroacetat de 1-etil-3-metilimidazoliu
[Emim]OOCCH ₃	acetat de 1-etil-3-metilimidazoliu
[Emim]PF ₆	hexafluorofosfat de 1-etil-3-metilimidazoliu
[Emim]Tf ₂ N	bis[(trifluorometil)sulfonil] amida de 1-etil-3-metilimidazoliu
[Hmim]BF ₄	tetrafluoroborat de 1-hexil-3-metilimidazoliu
[Mmim]MeSO ₄	metilsulfat de 1,3-dimetilimidazoliu
[Moemim]BF ₄	tetrafluoroborat de 1-metoxietil-3-metilimidazoliu
[Omim]BF ₄	tetrafluoroborat de 1-octil-3-metilimidazoliu
[Omim]PF ₆	hexafluorofosfat de 1-octil-3-metilimidazoliu
[Pmim]BF ₄	tetrafluoroborat de 1-propil-3-metilimidazoliu
AK	lipaza din <i>Pseudomonas fluorescens</i> Amano AK
Ala	alanină
Arg	arginină
Asp	acid aspartic
BcL	lipaza din <i>Burkholderia cepacia</i>
BgL	lipaza din <i>Burkholderia glumae</i>
BuTMOS	butiltrimetoxisilan
CaL-A	lipaza din <i>Candida antarctica</i> A
CaL-B	lipaza din <i>Candida antarctica</i> B
CcL	lipaza din <i>Candida cylindracea</i>
Conv. %	conversie alcool
CrL	lipaza din <i>Candida rugosa</i>
CrI-CLEC	lipaza din <i>Candida rugosa</i> reticulată
Cys	cisteină
DMDMOS	dimetildimetoxisilan
E	raport enantiomeric, enantioselectivitate
e.e.	exces enantiomeric, puritate optică
EtTEOS	etilrietoxisilan
EtTMOS	etiltrimetoxisilan
Glu	acid glutamic
Gly	glicină
HexdITMOS	hexadeciltrimetoxisilan
His	histidină

Abrevieri

<i>i</i> -BuTMOS	<i>i</i> -butiltrimetoxisilan
Ile	izoleucina
<i>i</i> -PrOH	alcool izopropilic
Leu	leucină
MeTEOS	metiltrietoxisilan
MeTMOS	metiltrimetoxisilan
MTBE	metil- <i>terț</i> -butil-eter
OcdlTMOS	octadeciltrimetoxisilan
OctMOS	octiltrimetoxisilan
PDMS	polidimetilsiloxan
PEG	polietilenglicol
<i>PfL</i>	lipaza din <i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>PfragiL</i>	lipaza din <i>Pseudomonas fragi</i>
Phe	fenilalanină
PhTEOS	feniltrietoxisilan
PhTMOS	feniltrimetoxisilan
PPL	lipază din pancreas de porc
Pro	prolină
PrTMOS	propiltrimetoxisilan
PS	lipaza din <i>Burkholderia cepacia</i> Amano PS
PVA	polivinilalcool
Ser	serină
TEOS	tetraetoxisilan
Thr	treonină
TMeMOS	trimetilmetoxisilan
TMMOS	trimetilmetoxisilan
TMOS	tetrametoxisilan
Trp	triptofan
Val	valină
VTEOS	viniltrietoxisilan
β -CD	β -ciclodextrină
η _{ester}	randament de ester
η _{imobilizare}	randament de imobilizare
η _{regăsire}	randament de regăsire a activității enzimaticice

1. STUDIU DOCUMENTAR

1.1. Biocataliză și biocatalizatori

Biocatalizatorii sunt proteine (enzime) sau, în unele cazuri acizi nucleici (ribozime). Enzimele sunt niște biocatalizatori remarcabili de natură proteică, alcătuiți din mii de atomi precis aranjați. Sunt responsabile de o multitudine de reacții chimice care au loc în organismele vii, necesare pentru supraviețuirea și reproducerea acestora – rapid, selectiv și eficient. Enzimele sunt mult mai eficiente decât catalizatorii chimici obișnuiți (Guisan, 2006), sunt capabile să accepte o mare varietate de compuși drept substraturi, manifestând în același timp și o selectivitate deosebită, ce poate fi atât optică (enantioselectivitate) cât și pozițională (regioselectivitate). Specificitatea înaltă și puterea catalitică mare se datorează faptului că geometria situsului activ al enzimelor se potrivește cu cea a substratului, conform așa-numitului model “cheie-lacăt”. Datorită selectivității deosebite, enzimele pot fi utilizate pentru realizarea unor transformări extrem de complexe, fără a fi necesare etapele de protejare și deprotejare care sunt caracteristice sintezelor organice enantio- și regioselective. Această selectivitate ridicată duce și la o cantitate mai mică de produse secundare și deșeuri, recomandând enzimele drept alternative pentru realizarea unor tehnologii mai puțin poluante decât cele realizate cu catalizatori clasici (Péter, 2005).

Denumite la început *fermenți* de la cuvântul latin *ferveo* – a fierbe – datorită aparentei fierberii care însoțește orice proces de fermentație, în realitate produsă de eliminarea unor substanțe gazoase, enzimele au făcut obiectul unor pasionante dispute academice. În 1878, Kühne introduce denumirea de *enzimă* pentru fermenții din celula de drojdie sau din celulele altor organisme. Denumirile de *enzimă* și *ferment* sunt astăzi sinonime, primul termen fiind aproape unanim utilizat.

Intervenția enzimelor în diferite procese (fermentație, respirație, digestie, putrefacție) era cunoscută încă din antichitate (Stryer, 1995), dar explicația acestor procese complexe, rolul și locul enzimelor în secvențele chimice care le compun a rămas mult timp obscur, multe mecanisme fiind neclare și astăzi (Péter, 2005). Astfel, utilizând potențialul biocatalitic al enzimelor se realizează obținerea de produși necesari în toate scopurile umane (alimente, hrană pentru animale, farmaceutice, chimicale, fibre, produse pentru igienă și apă potabilă) cât și în scopuri analitice, în special pentru analize medicale (Buchholz, Kasche și Bornscheuer, 2005).

Enzimele cele mai utilizate până în prezent au fost hidrolazele (Figura 1.1).

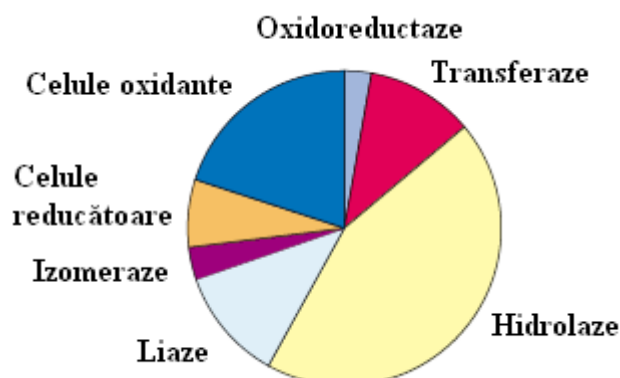


Figura 1.1. Principalele clase de enzime utilizate în procesele industriale (Straathof, Panke și Schmid, 2002).

La ora actuală, o serie de procese, majoritatea aflate în curs de dezvoltare, folosesc enzime din clasa transferazelor, liazelor și oxidoreductazelor (Straathof, Panke și Schmid, 2002).

Principalele avantaje și dezavantaje ale biocatalizatorilor (Buchholz, Kasche și Bornscheuer, 2005) comparativ cu catalizatorii chimici sunt:

Avantaje:

- stereo- și regioselectivitate
- necesită temperaturi scăzute (0-110°C)
- consum scăzut de energie
- activitate la pH 2-12
- lipsa produselor secundare
- nu sunt toxici atunci când se folosesc corect
- pot fi reutilizați (imobilizați)
- pot fi degradați biologic
- pot fi produși în cantități nelimitate

Dezavantaje:

- instabile la temperaturi înalte
- instabile la valori extreme de pH
- instabile în solvenți agresivi
- inhibate de unii ioni metalici
- unele enzime sunt încă foarte scumpe
- sunt potențiali alergeni atunci când sunt inhalate sau înghițite

Procesele biocatalitice sunt definite drept acele procese care realizează transformarea unui substrat dat într-un produs definit, utilizând una sau mai multe etape catalizate de preparate enzimatiche nepurificate sau de enzime purificate (Bommarius și Riebel, 2004). Ele s-au dezvoltat pe o direcție proprie, care a constat în folosirea ca biocatalizatori a enzimelor izolate, cu un grad de puritate mai mult sau mai puțin avansat.

Procesele biocatalitice și biotransformările enzimatiche pot fi considerate derivate din categoria proceselor fermentative, întrucât ele realizează transformarea chimică a unor compuși utilizând potențialul biocatalitic al enzimelor și de multe ori aceste enzime sunt produse (intracelular sau extracelular) prin cultivarea microorganismelor chiar pe substratul a cărei transformare o realizează. Un exemplu în acest sens este oxidarea stereoselectivă a D-sorbitolului la L-sorboză sub acțiunea microorganismului *Acetobacter suboxidans*, care este una dintre etapele fabricării vitaminei C.

Varianta ideală de biocataliză ar fi aceea în care mediul de reacție să fie eterogen, astfel ca enzima să reprezinte o fază distinctă, preferabil solidă. În aceste condiții enzima va putea fi separată ușor și reutilizată, reducându-se costurile de producție și se va evita contaminarea produșilor de reacție cu proteină enzimatică. Încercările de realizare practică a acestui deziderat au dus la elaborarea a trei sisteme de reacție enzimatiche eterogene:

- *Sisteme de reacție bifazice*, în care substratul insolubil în apă este dizolvat într-un solvent organic nemiscibil cu apa sau constituie el însuși faza organică, în timp ce enzima se găsește dizolvată în faza apoasă.

- *Sisteme de reacție în solvenți organici*, în care nu mai există o fază apoasă și enzima este suspendată în mediul organic nemiscibil cu apa. S-a demonstrat că, deși apa este indispensabilă pentru menținerea conformației catalitice active a enzimelor,

cantitatea de apă necesară acestui scop este foarte mică. Astfel, lipaza pancreatică își menține activitatea la o concentrație de apă de numai 0,015% în mediul de reacție, ceea ce înseamnă că poate funcționa în condiții practic anhidre.

- *Sisteme de reacție cu enzime immobilizate*, în majoritatea cazurilor pe suporturi solide, care pot funcționa atât în mediu apos cât și în mediu de solvenți organici.

Cele mai multe aplicații ale biocatalizei sunt în industria alimentară și cea farmaceutică (Figura 1.2). Procesele din industria alimentară sunt relativ simple și unele dintre ele datează cu mult dinainte de a se fi stabilit natura lor enzimatică, de exemplu coagularea laptelui pentru fabricarea brânzeturilor.

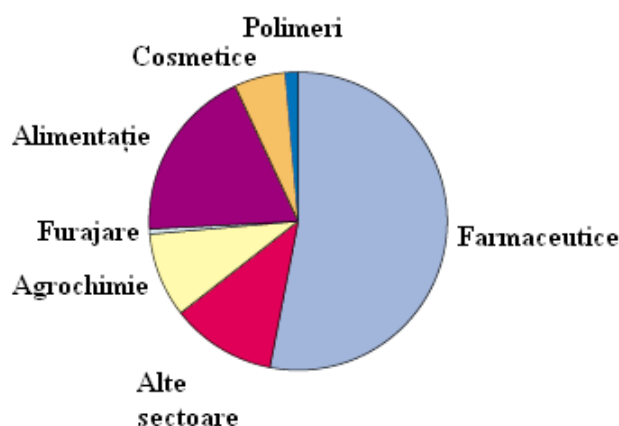


Figura 1.2. Principalele domenii de aplicații ale biocatalizei industriale (Straathof, Panke și Schmid, 2002)

Industria farmaceutică a avut în schimb avantajul că era familiarizată cu tehnologiile fermentative, chiar dacă procesarea produselor rezultate din fermentație se făcea exclusiv pe cale chimică.

Una dintre principalele provocări pe care trebuie să le rezolve industria chimică în viitorul apropiat este cea a resurselor pe care le utilizează. Atunci când se vorbește despre perspectivele viitoare, acestea sunt tot mai frecvent asociate cu utilizarea unor resurse reînnoibile, deși au fost și vor fi făcute progrese importante și în ce privește creșterea productivității și reducerea consumurilor de energie ale proceselor existente. Pe calea utilizării unor asemenea resurse se situează valorificarea proceselor catalizate de enzime pentru obținerea de produse chimice.

Evoluția direcționată a enzimelor este utilizată tot mai mult pentru a obține biocatalizatori care să lucreze mai eficient în condiții nenaturale. O perspectivă extrem de promițătoare este combinarea mai multor enzime într-o singură celulă, de exemplu pentru a realiza simultan cu reacția principală și regenerarea cofactorului. În ce privește enzimele izolate, prețul acestora va scădea în continuare, datorită obținerii lor mai eficiente folosind microorganisme modificate genetic. Distanța dintre cataliza enzimatică și cataliza chimică se va reduce, pe de o parte datorită obținerii unor enzime mai bine adaptate condițiilor industriale, iar pe de altă parte datorită obținerii unor catalizatori sintetici (sinzime) care să imite principiul acțiunii enzimelor (Péter, 2005).

1.2. Structura și proprietățile catalitice ale lipazelor

Lipazele (E.C.3.1.1.3) sunt enzime care fac parte din clasa hidrolazelor, se mai numesc și triacilglicerol hidrolaze, fiind cele mai folosite hidrolaze în chimia organică (Bornscheuer și Kazlauskas, 1999; Schmid și Verger, 1998). Ele hidrolizează grăsimi și uleiuri cu formare de acizi grași liberi, gliceride parțiale și glicerină. Preferențial catalizează hidroliza esterilor insolubili în apă cum sunt trigliceridele, de exemplu hidroliza trioleinei la dioleină (în special acceptă lanțuri lungi de acizi grași în aceste trigliceride). În afară de acestea, lipazele catalizează de asemenea hidroliza unui spectru larg de esteri naturali și nenaturali/sintetici prezentând o înaltă enantio- și regioselectivitate. Această combinație (larga gamă de substraturi asupra cărora acționează și selectivitatea înaltă), face din lipaze un catalizator ideal pentru sintezele organice.

Pe lângă selectivitatea înaltă pe care o manifestă și spectrul larg de substraturi, un alt avantaj important al lipazelor este acela că ele acționează eficient asupra substraturilor insolubile în apă. Lipazele au nevoie de această proprietate deoarece substratul natural al lipazelor – trigliceridele – sunt insolubile în apă. Lipazele se leagă la interfața apă – substrat organic și catalizează hidroliza la această interfață. Această legare nu numai că plasează lipaza în apropierea substratului dar și mărește puterea catalitică a lipazei, fenomen numit **activare interfacială sau activare la interfață**. Majoritatea lipazelor sunt catalizatori slabi în absența unei interfețe (o picătură de grăsime sau o micelă). O schimbare conformațională în structura lipazei determină probabil activarea interfacială. Spre deosebire de aceasta, reacțiile eficiente cu proteaze necesită deseori o modificare chimică a substratului pentru creșterea solubilității în apă (Bornscheuer și Kazlauskas, 1999).

1.2.1. Sursele și utilizarea lipazelor

Lipazele se găsesc în plante, animale și microorganisme unde îndeplinesc un rol important în transformarea biologică a lipidelor. Lipazele sunt necesare ca și enzime digestive pentru a facilita nu numai transferul lipidei dintr-un organism în altul ci și depunerea și mobilitatea grăsimii care este folosită ca și sursă de energie în organism. De asemenea sunt implicate în metabolismul lipidelor intracelulare și prin urmare în funcționalitatea membranelor biologice (Villeneuve și colab., 2000).

Majoritatea biotransformărilor utilizează lipaze comerciale, iar în (Tabelul 1.1) se găsesc cele mai cunoscute dintre acestea (Bornscheuer și Kazlauskas, 1999). Colesterol esteraza pancreatică este inclusă la lipaze deoarece secvența sa și proprietățile biochimice sunt identice cu lipazele activate de sărurile acizilor biliari (Nilsson și colab., 1990; Hui și Kissel, 1990).

Lipazele sunt de obicei numite după microorganismul care le produce. Clasificarea și numele microorganismului se poate modifica pe parcurs ce cercetătorii află mai multe despre el. Astfel, uneori se schimbă și numele lipazei, lucru frustrant pentru chimiștii organicieni obișnuiți cu compușii organici a căror denumire se modifică foarte rar (Bornscheuer și Kazlauskas, 1999).

Tabelul 1.1. Exemple de lipaze disponibile comercial

Abreviere	Originea lipazelor	Altă denumire	Sursă comercială
Lipaze de origine animală			
HPL	lipază din pancreas uman		Amano, Boehringer-Mannheim, Fluka, Sigma
HGL	lipază gastrică umană		Amano, Boehringer-Mannheim, Fluka, Sigma
PPL	lipază din pancreas de porc		Amano, Boehringer-Mannheim, Fluka, Sigma
GPL-RP2	lipază din pancreas de porc de guineea		Amano, Boehringer-Mannheim, Fluka, Sigma
CE (BSSL)	colesterol esteraza pancreatică		Genzyme, Sigma
Lipaze fungice			
CrL	<i>Candida rugosa</i>	<i>Candida cylindracea</i>	Altus Biologics, Amano, Meito Sangyo, Boehringer-Mannheim
GeL	<i>Geotrichum candidum</i>		Amano
HIL	<i>Humicola lanuginosa</i>	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Boehringer-Mannheim, Novo Nordisk
PcamL	<i>Penicillium camembertii</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>	Amano
RjL	<i>Rhizomucor javanicus</i>	<i>Mucor javanicus</i>	Amano
RmL	<i>Rhizomucor miehei</i>	<i>Mucor miehei</i>	Boehringer-Mannheim, Amano, Novo Nordisk, Fluka
RoL	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>R. javanicus</i> , <i>R. delemar</i> , <i>R. niveusa</i>	Amano, Fluka, Sigma, Seikagaku Kogyo Co.
RaL	<i>Rhizopus arrhizus</i>		Amano, Fluka, Sigma, Seikagaku Kogyo Co
CaL-A	<i>Candida antarctica A</i>		Boehringer-Mannheim, Novo Nordisk
CaL-B	<i>Candida antarctica B</i>		Boehringer-Mannheim, Novo Nordisk, Sigma
AnL	<i>Aspergillus niger</i>		Amano, Rohm, Novo Nordisk
AoL	<i>Aspergillus oryzae</i>		Amano, Rohm, Novo Nordisk
CLL	<i>Candida lipolytica</i>		Amano

<i>ProqL</i>	<i>Penicillium roquefortii</i>		Amano
Lipaze bacteriene			
<i>PaL</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Novo Nordisk, Amano Co, Boehringer-Mannheim
<i>PcL</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia (BcL)</i>	Altus Biologics, Amano, Boehring-Mannheim, Fluka, Sigma
<i>PcL-AH</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>		Amano
<i>PgL</i>	<i>Pseudomonas glumae</i>	<i>Burkholderia glumae (BgL)</i>	Sigma, Genzyme, Asahi Chemical, Biocatalysts Lts., Amano
<i>PfL</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Amano, Biocatalysts Ltd., Wako Pure Chemical (Osaka)
<i>PfragiL</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>		
<i>PmL</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>		Novo Nordisk, Amano Co, Boehringer-Mannheim
<i>CvL</i>	<i>Chromobacterim viscosum</i>		Sigma, Genzyme, Asahi Chemical, Biocatalysts Lts.
<i>BtL-2</i>	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>		Boehringer-Mannheim, Meito Sangyo

Așa cum s-a mai spus, funcția biologică a lipazelor este aceea de a cataliza hidroliza esterilor, în special triacilgliceroli care au resturi de acizi grași cu lanț lung, cu formare de acizi grași liberi, di- și monoacilgliceroli și glicerol. Lipazele sunt de asemenea capabile să catalizeze reacția inversă și anume sinteza de esteri (esterificare), dar și alte reacții cum sunt transesterificarea (acidoliza, interesterificarea, alcooliza), aminoliza, oximoliza și tiotransesterificarea în solvenți organici anhidrii (Klibanov, 1989; Gupta, 1992) sisteme bifazice și în soluții de miscele (Martinek și colab., 1986; și Nagao și Kito, 1990).

Se mai utilizează biotransformările catalizate de lipaze pentru obținerea de compuși farmaceutici și intermediari sintetici enantiomeric puri, pentru protejarea și deprotejarea intermediarilor sintetici, pentru modificarea lipidelor naturale (Bornscheuer și Kazlauskas, 1999), precum și în alte scopuri (Tabelul 1.2).

Tabelul 1.2. Exemple de aplicații industriale ale lipazelor (Villeneuve și colab., 2000; Sharma, Christi și Banerjee, 2001).

Domeniul industrial	Acțiune	Produs sau aplicație
Detergenți	Hidroliza grăsimilor	Detergenți pentru uz casnic și industrial
Alimentar (lactate)	Hidroliza grăsimilor din lapte, maturarea brânzeturilor, modificarea grăsimii din unt	Agenți de aromă pentru produse lactate
Alimentar (prelucrarea uleiului)	Hidroliza și transesterificarea uleiurilor și grăsimilor; analiza distribuției acizilor grași în trigliceride	Acizi grași, mono- și digliceride, înlocuitor de unt de cacao, margarina; reactivi pentru analiza lipidelor
Alimentar (carne și pește)	Sinteza produșilor de aromă; îndepărtarea grăsimii	Preparate din carne și pește
Alimentar (băuturi)	Îmbunătățirea aromei	Băuturi
Chimic	Sinteză de esteri	Intermediari chirali, esteri, emulgatori
Medical	Analiza trigliceridelor din sânge	Truse de diagnostic
Farmaceutic	Transesterificare și hidroliză	Lipide speciale, medicamente pentru tulburări digestive
Cosmetic	Sinteze	Emulgatori, agenți de umezire
Hârtie	Hidroliză	Hârtie cu proprietăți îmbunătățite

1.2.2. Clasificarea lipazelor

Clasificarea lipazelor în funcție de sursa microbiană uneori împiedică observarea asemănarilor structurale. O clasificare mai bună utilizează înșiruirea secvențelor de proteine (Tabelul 1.3), care este în concordanță cu structura tridimensională a proteinelor. **Lipazele de origine animală (pancreatică)** formează o grupă, **lipazele de origine fungică** formează două grupe – familia *Candida rugosa* și familia *Rhizomucor*, iar **lipazele bacteriene** de asemenea formează două grupe – familia *Pseudomonas* și familia *Staphylococcus*.

Familia *Candida rugosa* include lipaza din *Candida rugosa* (CrL), lipaza din *Geotrichum candidum* (GcL) și chiar dacă este o lipază de origine animală, colesterol esteraza pancreatică CE (BSSL). Aceste lipaze sunt de dimensiuni mari (60-65 kDa). De reținut că lipaza *Candida antarctica* B nu aparține acestei familii, chiar dacă provine dintr-o drojdie *Candida*.

Familia *Rhizomucor* include lipaze dintr-un domeniu larg de ciuperci/fungi: lipazele *Rhizopus*, lipazele *Rhizomucor*, lipaza din *Penicillium camembertii* (PcamL), lipaza din *Humicola lanuginosa* (HL), CaL-B și sunt de dimensiuni mici (30-35 kDa).

Lipazele *Pseudomonas* sunt de asemenea mici și includ toate lipazele *Pseudomonas* și *Chromobacterium viscosum*.

Lipazele *Staphylococcus* sunt de mărime medie (40-45 kDa) dar nu sunt disponibile comercial. O singură lipază din această grupă, o lipază termostabilă din *Bacillus thermocatenulatus* (*BtL2*), este disponibilă de la Boehringer Mannheim. Câteva dintre lipaze rămân neclasificate. De exemplu, pentru lipaza din *Aspergillus niger* (*AnL*) nu se cunoaște secvența de aminoacizi, pentru *CaL-A*, secvența este cunoscută, dar acestea prezintă doar puține asemănări cu celelalte lipaze.

Cele mai utilizate lipaze în sinteza organică sunt: lipaza din pancreas de porc (PPL), lipaza din *Burkholderia cepacia* (lipazele Amano PS, *BcL*), lipaza din *Candida cylindracea* (*CcL*), și lipaza B din *Candida antarctica* (*CaL-B*), iar pentru modificarea lipidelor cea mai importantă este lipaza din *Rhizomucor miehei* (*RmL*) (Bornscheuer și Kazlauskas, 1999).

Tabelul 1.3. Clasificarea lipazelor comerciale după asemănarea în secvența de proteine (Cygler și colab.,1993; Svendsen, 1994)

Clasificare	Caracteristici	Exemple
Lipaze de origine animală (pancreatică)	50 kDa	PPL
Lipaze fungice		
Familia <i>Candida rugosa</i>	60-65 kDa	<i>CrL</i> , <i>GcL</i> , CE
Familia <i>Rhizomucor</i>	30-35 kDa	<i>CaL-B</i> , <i>RmL</i> , <i>RoL</i> , <i>HIL</i> , <i>PcamL</i>
Neclasificate		<i>AnL</i> , <i>CaL-A</i> , <i>CIL</i>
Lipaze bacteriene		
Familia <i>Pseudomonas</i>	30-35 kDa	<i>PcL</i> , <i>PfL</i> , <i>CvL</i>
Familia <i>Staphylococcus</i>	40-45 kDa	<i>BtL2</i>

1.2.3. Plierea α/β hidrolazică

Structurile tridimensionale ale lipazelor prezintă în interiorul lor, un motiv comun de pliere, cunoscut ca și plierea α/β hidrolazică. Astfel, prin studii de raze X s-a arătat că toate lipazele fac parte din familia α/β hidrolazelor (Brzozowski și colab., 1991; Derewenda și colab., 1992; Ollis și colab., 1992; Grochulski și colab., 1994; Egloff și colab., 1995; Uppenberg și colab., 1995; Schrag și colab., 1997; Pleiss, Fischer și Schmid 1998). Această familie cuprinde pe lângă lipaze și alte enzime: esteraze, proteaze, peroxidaze, liaze și multe altele (Ollis și colab., 1992; Schrag și Cygler, 1997), spre exemplu dienlacton-hidrolaza *Pseudomonas sp.* (Pathak și Ollis, 1990), colinesteraze (Sussman și colab., 1991), tioesteraza *Vibrio harveyi* (Lawson și colab., 1994^a), bromperoxidaza A2 *Streptomyces aureofaciens* (Hecht și colab., 1994) și esteraza *Streptomyces scabies* (Wei și colab., 1995).

Plierea α/β hidrolazică, constă dintr-un miez de opt structuri β -pliate majoritatea paralele, care sunt înconjurate la ambele capete de șase structuri α -elicoidale, și o triadă catalitică (**Ser/Asp/Cys-His-Asp/Glu**) (Ollis și colab., 1992). Modalitățile de combinare a structurilor α -elicoidale cu cele β -pliate sunt aceleași pentru toate α/β hidrolazele (Figura 1.3) (Bornscheuer și Kazlauskas, 1999). Una din cele mai importante trăsături ale enzimelor care fac parte din familia α/β hidrolazelor este curba nucleofilă, unde se găsește un rest nucleofil de serină (specific pentru lipaze, esteraze și proteaze (Bornscheuer și Kazlauskas, 1999), poziționat între o structură β -pliată și una de α -elice (Kim și colab., 1997).

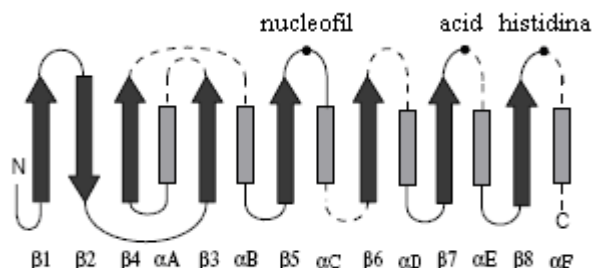


Figura 1.3. Diagrama schematică a plierii α/β hidrolazelor. Structurile de α -elice sunt reprezentate sub formă de dreptunghiuri, cele β -pliate ca săgeți, iar liniile întrerupte indică bucle de lungimi variabile.

1.2.4. Activarea la interfață și rolul capacului elicoidal

În 1958 Sarda și Desnuelle au definit lipazele în termeni cinetici, bazându-se pe fenomenul de “activare la interfață”, sugerând că acțiunea lipazelor trebuie considerată ca având loc la suprafața bidimensională a unui miceliu și nu în volumul tridimensional al unei soluții (Sarda și Desnuelle, 1958). Această proprietate nu a fost găsită printre enzimele care au fost clasificate drept esteraze, ex: acele enzime care acționează numai asupra moleculelor de esteri ai acizilor carboxilici, solubile în apă. De fapt fenomenul de “activare la interfață” a fost pentru prima dată observat în 1936 de Holverda și colaboratorii și mai apoi în 1945 de Schonheyder și Volqvartz (Holverda și colab., 1936; Schonheyder și Volqvartz, 1945). Acesta, se bazează pe faptul că are loc o creștere importantă a activității lipazelor în substraturi insolubile (cum sunt emulsiile) în comparație cu aceleași substraturi în soluții monomere (Verger, 1997).

În 1990 au fost elucidate primele două structuri tridimensionale ale unor lipaze: structura lipazei din pancreas uman (Winkler, D’Arcy și Hunziker, 1990) și a celei fungice din *Rhizomucor miehei* (Brady și colab., 1990). La ambele enzime centrul activ conține o structură asemănătoare numită “triada catalitică” Asp-His-Ser (Figura 1.4), caracteristică serin-proteazelor, care este complet îngropată (ecranată) sub un scurt segment peptidic elicoidal (Brzozowski și colab., 1991).

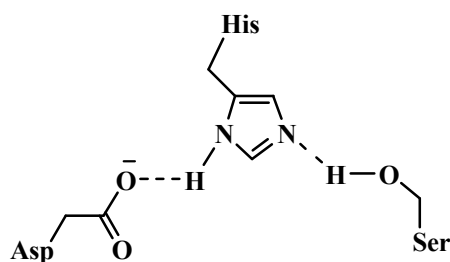


Figura 1.4. Triada catalitică din centrul activ al lipazelor

Determinarea structurilor tridimensionale a acestor lipaze, a sugerat că fenomenul de “activare la interfață” poate fi datorat prezenței capacului elicoidal amfifil care acoperă centrul activ al enzimei (Verger, 1997). Când lipaza este dizolvată în apă capacul elicoidal este închis și partea hidrofilă a acestuia este îndreptată spre solvent, posibil pentru a preveni agregarea enzimei. La contactul cu o interfață lipid-apă are loc o schimbare conformațională (deplasare) a acestui capac (Verger, 1997), partea hidrofobă este expusă interfeței, iar centrul activ al lipazei este dezecranat (Figura 1.5) făcând astfel posibil accesul substratului (intră în centrul activ unde se leagă și este transformat în produs). Structurile din figura 1.5 prezintă modificările conformaționale, ce au loc asupra capacului elicoidal, structurii β5 și colipazei, în timpul activării la interfață (Overbeeke și colab., 2000).

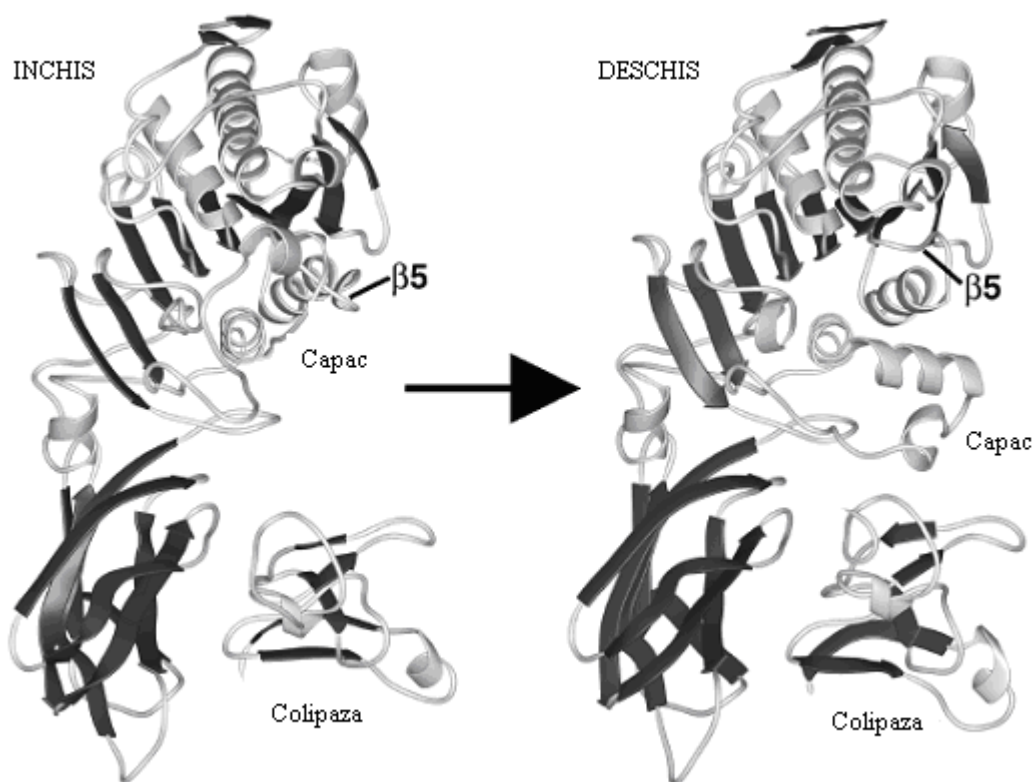
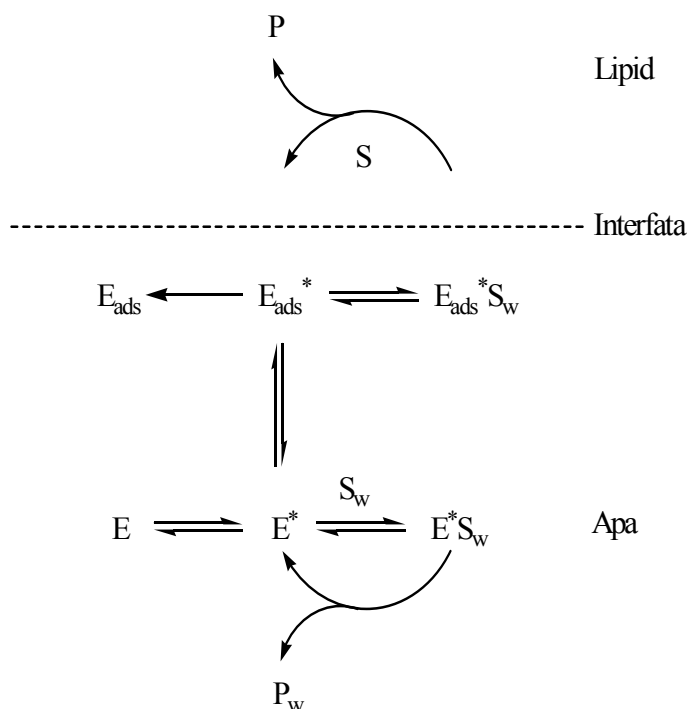


Figura 1.5. Structura lipazei din complexul pancreas uman-colipaza în conformație închisă și deschisă. Structurile de α -elicie sunt reprezentate sub forma unor serpentine, iar cele β -pliate prin săgeți. (Lowe, 2002).

Au fost sugerați o serie de factori care declanșează activarea lipazei la interfața lipid-apă:

- creșterea concentrației de substrat la interfață (Brockman, 1973);
- o mai bună orientare a legăturilor de ester (Wells, 1974);
- reducerea stratului de apă din jurul moleculelor de ester din apă (Brockhoff, 1968);
- o schimbare conformațională în structura enzimei (Sarda și Desnuelle, 1958; Entressangles și Desnuelle, 1974; Brady și colab., 1990).

În ceea ce privește deplasarea capacului elicoidal, nu se știa dacă acesta se desfășoară înainte sau după adsorbția la suprafața picăturii de lipid. În acest sens a fost propusă o dezvoltare a modelului lui Verger, ce sugerează existența unui echilibru între conformația deschisă și închisă a lipazei în soluție. Datorită expunerii centrului activ hidrofob la mediul apos, doar o mică parte din moleculele de lipază se găsesc în conformație deschisă, ceea ce explică activitatea mică la substraturi solubile în apă. Pe măsură ce picăturile de lipid sunt introduse în sistem și astfel lângă lipază este prezentă o suprafață hidrofobă tot mai mare, fracțiunea de lipază deschisă este adsorbită la agregatele de lipid. Conformațiile deschisă și închisă ale lipazei, în soluție, se vor afla în echilibru și astfel lipaza în forma deschisă poate fi adsorbită la interfață (Schema 1.1) (Holmquist, 2000).



Schema 1.1. Modelul acțiunii lipazelor în mediu apos, lipid și la interfața lipid-apă. E reprezintă lipaza inactivă dizolvată în apă, E^* lipaza activă dizolvată în apă, E_{ads}^* lipaza activă adsorbită la interfață, E_{ads} lipaza inactivă adsorbită la interfață, S_w substrat solubil în apă, S substrat insolubil în apă, E^*S_w și $E_{ads}^*S_w$ complexe enzimă-substrat, P_w produsul în faza apoasă și P produsul în faza lipidă (Holmquist, 2000).

Schimbarea conformațională a capacului elicoidal în lipaza din *Rhizomucor miehei* poate fi descrisă ca o mișcare simplă, rigidă, a părții elicoidale (resturile Ile85-Asp91) ce presupune o translație a centrului de gravitate cu aproape 8 Å și o rotație cu 167° față de o axă aproape paralelă cu cea a eliciei. Această mișcare este datorată celor două zone de articulație: tripeptida Ser82-Ser83-Ser84 și tetrapeptida Leu92-Thr93-Phe94-Val95, care se află fiecare de câte o parte a capacului. Pe parcursul deplasării capacului elicoidal, partea hidrofilă (care în enzima nativă este expusă solventului) devine parțial îngropată într-o cavitate polară umplută anterior cu molecule de apă, iar cea hidrofobă ajunge să fie complet expusă, măbind foarte mult suprafața nepolară din jurul centrului activ.

Activarea la interfață este astfel explicată prin stabilizarea acestei suprafețe nepolare de către mediul lipid și de crearea unei enzime competente catalitic, capabilă să atace moleculele de trigliceridă din faza lipidă (Brzozowski și colab., 1991). Un mecanism similar se întâlnește și la lipaza din pancreas uman, unde după examinarea segmentelor lanțului care blochează accesul la centrul activ s-a observat că suprafața situată între resturile 237-261 de aminoacizi, legate printr-o punte disulfidică, ecranează centrul activ printr-un singur pas de α -elicie. Acest pas de α -elicie conține un rest de triptofan Trp252, care se găsește deasupra restului nucleofil de Ser152 ce aparține triadei catalitice (Winkler, D'Arcy și Hunziker, 1990).

Odată cu proiectul European BRIDGE-T-Lipase realizat între 1990-1994 de 24 laboratoare din 8 țări, s-a arătat că nu toate lipazele se supun fenomenului de activare la interfață (Verger, 1997; Schmid și Verger, 1998).

Tabelul 1.4. Caracteristici importante ale lipazelor

Caracteristica	Detalii	Observații
Mecanismul bazat pe “triada catalitică” alcătuită din Ser ca și nucleofil, His și Asp sau Glu	Mecanism găsit la peste 30 de lipaze, inclusiv la cele din microorganisme psihrofile sau termofile; singura excepție este înlocuirea Asp cu Glu. Substituția Ser cu Cys prin mutagenază orientată duce la scăderea activității.	Alte hidrolaze prezintă o mai mare varietate a mecanismului catalitic. În cazul proteazelor, legătura amidică poate fi hidrolizată prin atacul nucleofilic al hidroxilului din Ser sau Thr, al grupărilor tiol din Cys sau prin atacul electrofilic al unei grupe carboxil (Asp sau Glu) sau al unui ion metalic (Zn^{2+}).
Secvență omoloagă la restul de Ser din centrul activ	Secvența omoloagă pentru mai mult de 30 de lipaze clonate este o curbă nucleofilă poziționată între o structură β -pliată și o α -elice și este compusă din -Gly/Ala-X-Ser-X-Gly-.	Alte hidrolaze prezintă o mai mare varietate.
Majoritatea lipazelor prezintă un capac elicoidal	Capacul elicoidal este un segment peptidic amfifil care ecranează centrul activ al enzimei în stare inactivă.	În cazul esterazelor sau proteazelor nu a fost observată prezența acestui capac elicoidal, dar există și unele lipaze care nu au capac sau acesta este foarte mic.
Toate lipazele fac parte din familia α/β hidrolazelor	Structura α/β hidrolazelor constă dintr-un miez cu structuri β -pliate majoritatea paralele, care sunt înconjurate de structuri α -elicoidale. Restul nucleofil de Ser se găsește la curbura dintre o structură β și una α .	Multe alte hidrolaze (esteraze, acetilcolin esteraze, serin-proteaze, carboxipeptidaze, dehidrogenaze) și chiar și haloperoxidaza prezintă un motiv structural similar.

Astfel lipazele din *Burkholderia glumae* (Noble și colab., 1993) și *Pseudomonas aeruginosa* (Jaeger și colab., 1993) nu prezintă fenomenul de activare la interfață, deși ambele au un capac amfifil care acoperă centrul activ. De asemenea, și unele lipazele pancreatice nu prezintă acest fenomen, așa cum este lipaza coypu (Thirstrup, Verger și Carrière, 1994) care prezintă un capac elicoidal cu 23 resturi de aminoacizi și lipaza din pancreas de porc de guineea (Hjorth și colab., 1993) cu un capac elicoidal alcătuit din 5 aminoacizi (Verger, 1997; Schmid și Verger, 1998). Alte lipaze prezintă activare la interfață doar pentru anumite substraturi, de exemplu lipaza din *Staphylococcus hyiscus* (Van Oort, 1989; Verger, 1997) și *Fusarium solani pisi* (Svendsen, 2000). Conform celor spuse, în Tabelul 1.4 sunt prezentate cele mai importante caracteristici ale lipazelor (Schmid și Verger, 1998).

Activarea la interfață în mediu de solvenți organici

Pentru a investiga dacă lipazele în mediu de solvenți organici pot fi activate prin adsorbție la interfață, au fost efectuate numeroase studii pe lipaza din *Rhizomucor miehei* (Louwrier, Drtina și Klibanov, 1996). În mediu apos, s-a arătat că *RmL* prezintă fenomenul de activare la interfața lipid-apă (Brzozowski și colab., 1991), dar când lipaza (liofilizată sau precipitată în apă cu acetona) a fost suspendată într-un solvent organic (etanol sau 2-(2-etoxietoxi)-etanol conținând trioleină), nu s-a observat activarea acesteia, deși a avut loc formarea interfeței. Pentru a testa dacă această lipsă a activării la interfață este datorată insolubilității enzimei în mediu de solvent organic, lipaza a fost modificată covalent cu polietilenglicol. Lipaza astfel modificată tot nu a prezentat activarea la interfață, ceea ce s-a explicat prin faptul că în mediu de solvenți organici nu are loc adsorbția la interfață, probabil datorită absenței efectului hidrofob. Lipsa adsorbției și activării la interfață sugerează că acel capac elicoidal ce acoperă centrul activ al lipazei rămâne predominant închis, contribuind astfel la reducerea activității enzimatice în mediile organice (Louwrier, Drtina și Klibanov, 1996; Verger, 1997).

1.2.5. Influența conformației capacului elicoidal asupra enantioselectivității lipazelor

Într-un articol publicat de Overbeeke și colab. s-a arătat care sunt efectele deplasării capacului elicoidal care ecranează centrul activ al lipazelor (Overbeeke și colab., 2000). Studii anterioare efectuate pe lipazele din *Candida rugosa*, *Mucor miehei*, *Geotrichum candidum*, *Humicola lanuginosa* și pancreas de porc, cristalizate în absența sau prezența analogilor de substrat sau a inhibitorilor, au confirmat importanța deplasării capacului elicoidal.

Adsorbția unei lipaze la interfața lipid-apă mărește activitatea dar poate influența și enantioselectivitatea. Van Tol și colab. au studiat reacția de hidroliză a butiratului de 2,3-epoxi-1-propil catalizată de lipaza din pancreas de porc (PPL), observând că pe lângă creșterea considerabilă a vitezei de reacție atunci când butiratul a depășit limita de solubilitate, a avut loc și o creștere a raportului enantiomeric de la $E=8$ (în sistem monofazic) la $E=16$ (într-un sistem bifazic apă/substrat) (Van Tol, Jongejan și Duine, 1995). O posibilă explicație pentru modificarea enantioselectivității este aceea că deschiderea și închiderea capacului elicoidal influențează valoarea raportului enantiomeric E .

În 1995, Kazlaukas și colab. au prezentat o nouă metodă pentru îmbunătățirea activității hidrolitice și a enantioselectivității CrL în reacții de hidroliză folosind esteri ai acidului 2-aril-propanoic și ai acidului 2-(ariloxi)-propanoic (Colton, Ahmed și Kazlaukas, 1995). Metoda studiată și detaliată de Goto și colab. consta dintr-un pretratament al CrL cu diferite volume de 2-propanol. 2-propanolul a jucat un rol important în activarea lipazei ducând la modificarea conformațională din forma închisă la cea deschisă și prin urmare la creșterea enantioselectivității (Goto și colab., 2003).

Deplasarea capacului elicoidal ce ecranează centrul activ se presupune că afectează bariera energiei de activare necesară pentru formarea complexului Michaelis-Menten. Această ipoteză a fost verificată de Overbeeke și colab. prin măsurarea enantioselectivității pentru lipaza din *Candida antarctica* B ce nu posedă un capac elicoidal și pentru niște preparate de CrL cu capacul fixat în conformație deschisă și închisă.

Prin realizarea unui model termodinamic care să explice modificarea enantioselectivității odată cu deplasarea capacului elicoidal, s-a observat că în conformație deschisă bariera energiei de activare a complexului Michaelis-Menten, este mai mică decât în conformația închisă și nu afectează enantioselectivitatea. Atunci când lipaza se află în conformație închisă, capacul elicoidal trebuie să se deschidă pentru ca substratul să poată să intre în centrul activ și să reacționeze. Deplasarea capacului s-ar putea să crească energia de activare ceea ce duce la complexe Michaelis în cantități egale pentru ambii enantiomeri și implicit la scăderea enantioselectivității.

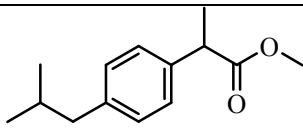
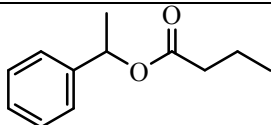
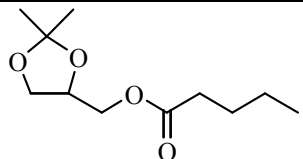
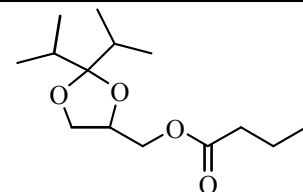
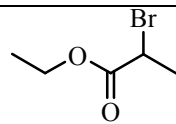
Prin experimente similare cu cele ale lui Van Tol, dar folosind lipaza din *Candida antarctica* B, Overbeeke și colab. au determinat activitatea și enantioselectivitatea acesteia în reacția de hidroliză a butiratului de 2,3-epoxi-1-propil. Din rezultate reiese că CaL-B nu prezintă activare la interfață cu substratul ales și că enantioselectivitatea dintr-un sistem monofazic nu se modifică față de cea dintr-unul bifazic, în ambele cazuri fiind obținută o valoare a $E=3$.

Totodată a fost determinată și enantioselectivitatea unor preparate de lipază din *Candida rugosa*, cu capacul fixat în conformație deschisă și închisă, în reacțiile de hidroliză a unor esteri slab solubili în apă. Fixarea capacului elicoidal nu este posibilă pentru moleculele de lipază dizolvate în apă. În acest scop a fost realizată cristalizarea CrL în prezență de PEG 8000 cu obținerea unei conformații închise și în prezență de 2-metil-2,4-pentadiol când s-a obținut lipaza având centrul activ accesibil solventului. Pentru a păstra aceste conformații la dizolvarea în mediu apos sau organic, cristalele de lipază obținute au fost înrețelate (reticulate), fiind obținute preparatele notate CrL-CLEC cu capacul elicoidal fixat în conformație deschisă și închisă (Margolin, 1996; Overbeeke și colab., 2000).

Rezultatele obținute în reacțiile de hidroliză a unor esteri sunt trecute în Tabelul 1.5. Preparatul comercial CrL este un amestec de mai multe lipaze, izoenzime cu proprietăți biochimice și specificitate de substrat diferite (Brocca și colab., 1995; Rúa și colab., 1993). Acesta a fost fracționat în două izoenzime numite CrL-A și CrL-B, care prezintă enantioselectivități diferite (Allenmark și Ohlsson, 1992; Lundell, Rajjola și Kanerva, 1998). Conform unor studii anterioare, CrL purificată se aseamănă cu CrL-B (Lalonde și colab., 1995) și așa cum se poate observa din Tabelul 1.5 au fost obținute valori ale lui E mai mici cât și mai mari decât cele ale preparatului comercial de CrL (Overbeeke și colab., 2000; Lundell, Rajjola și Kanerva, 1998).

Influența pe care o are mișcarea capacului elicoidal asupra enantioselectivității depinde de energia de activare a etapelor de deschidere a capacului, lucru menționat înainte. Dacă considerăm deschiderea capacului o etapă de reacție nediscriminatorie, activitatea și enantioselectivitatea *CrL*-CLEC închisă pot doar să fie mai mici sau egale cu cele ale formei deschise. Cu toate acestea, pentru toate substraturile folosite activitatea *CrL*-CLEC deschisă a fost mai mare decât a *CrL*-CLEC închisă, lucru confirmat și de studii anterioare (Lalonde și colab., 1995).

Tabelul 1.5. Raportul enantiomeric E a patru preparate cu lipază din *Candida rugosa* în reacția de hidroliză a unor esteri în soluție apoasă. Lipaza purificată este aceeași cu cea folosită la prepararea *CrL*-CLEC.

	T (°C)	preparat comercial de <i>CrL</i>	<i>CrL</i> purificată	<i>CrL</i> - CLEC deschisă	<i>CrL</i> - CLEC închisă
 2-(4-Izobutil-fenil)-propionat de metil	39	160 ^a	37	186	142
		(-13,16) ^b	(-9,37)	(-13,56)	(-12,86)
 Butirat de 1-fenil-etil	35	8	14	3	14
		(-5,32)	(-6,76)	(-2,81)	(-6,76)
 Pentanoat de 2,2-dimetil-[1,3]-dioxolan- 4-metil	30	4,4	5,9	1,6	2,5
		(-3,73)	(-4,47)	(-1,18)	(-2,31)
 Butirat de 2,2-diizopropil-[1,3]-dioxolan- 4-metil	30	1,3	4	2,1	2,9
		(-0,66)	(-3,49)	(-1,87)	(-2,68)
 2-Bromo-propionat de etil	30	7	-	3	19
		(-4,90)	-	(-2,77)	(-7,42)

^a valorile raportului enantiomeric E

^b diferența de energie liberă (kJ/mol)

În ceea ce privește enantioselectivitatea, doar în cazul folosirii 2-(4-izobutil-fenil)-propionatului de metil s-au obținut valori mai mici pentru CrL-CLEC închisă, rezultate similare fiind raportate și de alți cercetători (Holmquist și colab., 1993). CrL purificată se presupune a fi adsorbită la interfață în conformație deschisă, dar în mod surprinzător enantioselectivitatea acesteia nu este egală cu cea a lipazei CrL-CLEC deschisă, pentru nici unul din substraturile folosite. O explicație posibilă este că capacul CrL purificate se deplasează doar la interacțiunea cu un substrat, în timp ce la lipaza CrL- CLEC în conformație deschisă acesta este întotdeauna deschis.

Așa cum s-a spus, deplasarea capacului elicoidal sau diferențele în vitezele de difuzie ar putea să ridice bariera energiei de activare pentru formarea complexelor Michaelis-Menten. Aceste modificări nu trebuie să fie egale pentru CrL-CLEC deschisă și CrL purificată, rezultând astfel diferențele în valorile enantioselectivității.

În concluzie, se poate spune că există două efecte ale deplasării capacului elicoidal ce ecranează centrul activ al lipazelor. În primul rând bariera energiei de activare ce duce la complexul Michaelis-Menten poate fi afectată, iar în al doilea rând deschiderea capacului induce mici modificări în structura centrului activ influențând astfel enantioselectivitatea. Această idee a fost susținută și de observațiile făcute de Peters și colab., care au găsit că substituția Ser din centrul activ al lipazei din *Humicola lanuginosa* cu Ala a influențat proprietățile dinamice ale capacului elicoidal (Peters și colab., 1998). Modificările în centrul activ sunt astfel cuplate cu deplasarea capacului elicoidal, iar creșterea sau scăderea valorilor lui E depinde printre altele și de tipul substratului folosit în reacție (Overbeeke și colab., 2000).

1.2.6. Structura unor lipaze din genul *Pseudomonas*

Lipaza din *Pseudomonas aeruginosa* face parte din familia lipazelor bacteriene I.1 și are o formă aproximativ globulară, cu dimensiunile $35\text{\AA} \times 40\text{\AA} \times 50\text{\AA}$. Structura sa constă dintr-un „miez” (resturile de aminoacizi 1-108 și 164-285) ce prezintă caracteristicile plierii α/β hidrolazice și un „capac” format din resturile 109-163 cu patru structuri α -elicoidale ($\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ și $\alpha 8$) (Figura 1.6).

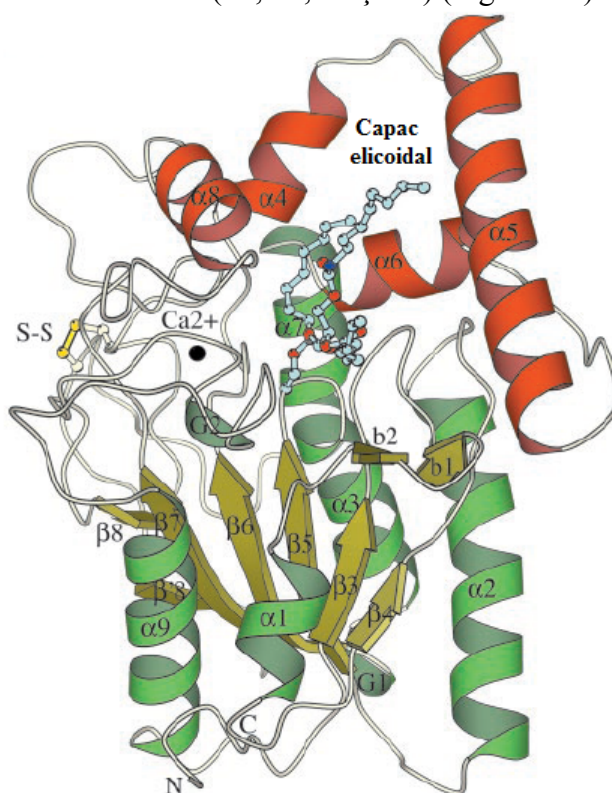
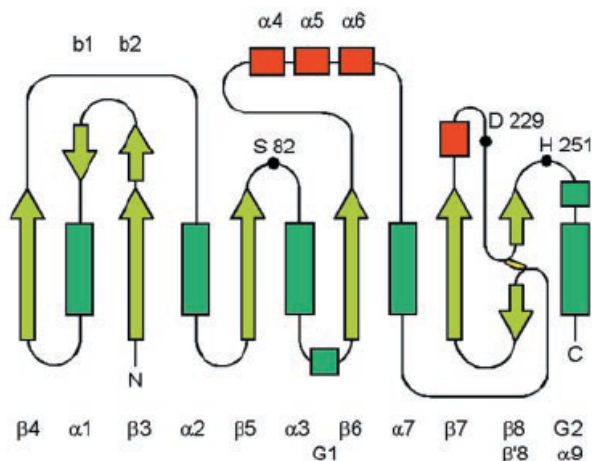


Figura 1.6. Reprezentarea schematică a elementelor structurii secundare a lipazei din *Pseudomonas aeruginosa*. Structurile de α -elicie sunt reprezentate sub forma unor serpentine, iar cele β -pliate prin săgeți (Nardini și colab., 2000).

Comparând structura lipazei din *Pseudomonas aeruginosa* cu cea a plierii α/β hidrolazelor (Figura 1.7) se poate observa că primele două structuri β -pliate $\beta 1$ și $\beta 2$ lipsesc și astfel numerotarea începe cu $\beta 3$, de asemenea lipsește și structura elicoidală corespunzătoare la αE . În plus, apar două structuri β -pliate antiparalele mici ($b 1$ și $b 2$) situate între structura $\beta 3$ și elicea $\alpha 1$ și încă o structură β -pliată ($\beta' 8$) orientată în sens opus cu $\beta 8$ (Figura 1.7).



Lipaza din *Pseudomonas aeruginosa*

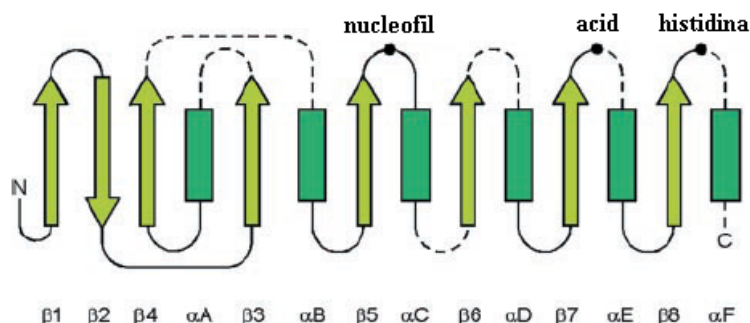


Diagrama schematică a plierii α/β hidrolazelor

Figura 1.7. Diagrama schematică a structurii secundare a lipazei din *Pseudomonas aeruginosa* în comparație cu cea a plierii α/β hidrolazelor. Structurile de α -elice sunt reprezentate prin dreptunghiuri, cele β -pliate prin săgeți, iar G1, G2 și elicea 3_{10} sunt reprezentate prin pătrate. Resturile triadei catalitice (Ser82, Asp229 și His251) sunt notate cu S82, D229 și H251. Liniile întrerupte din diagrama plierii α/β hidrolazelor indică bucle de lungimi variabile (Nardini și colab., 2000).

Lipazele bacteriene din familia I.2 și anume lipazele din *Burkholderia glumae* (Noble și colab., 1993), *Burkholderia cepacia* (Kim și colab., 1997; Schrag și colab., 1997; Lang și colab., 1998; Lang și Dijkstra, 1998) și *Chromobacterium viscosum* (Lang și colab., 1996), au secvența de aminoacizi asemănătoare în proporție de 42% cu cea a PaL. Cu toate acestea există diferențe majore în regiunea ce urmează structurii $\beta 7$, unde PaL nu prezintă structuri b3 și b4 (Figura 1.7). În consecință, elicea $\alpha 8$ se găsește în poziția lui $\alpha 9$ de la celelalte lipaze din familia I.2.

Absența structurii elicoidale $\alpha 10$, corespunzătoare la αE din familia α/β hidrolazelor, permite formarea unei punți disulfidice intramoleculare între resturile Cys235 și Cys183, care stabilizează structurile $\beta 8$ și $\beta' 8$ (Figura 1.7).

Triada catalitică este alcătuită din resturile Ser82, Asp229 și His251, care se găsesc în poziție și orientare similare cu cele din familia α/β hidrolazelor (Ollis și colab., 1992) și familia lipazelor bacteriene I.2. Ser82 este situată în vârful curbei nucleofile dintre structurile $\beta 5$ și $\alpha 3$, identificată prin secvența omoloagă Gly-X-Ser-X-Gly (X= His).

Structura ce conține restul de His251 este stabilizată de centrul de legare al ionului de Ca^{2+} , care se găsește la aproximativ 15Å de nucleofilul Ser 82. Ionul de calciu este octacoordinat și are ca liganzi două grupe carboxil din resturile Asp209 și Asp253, doi atomi de oxigen carbonilic din Gln257 și Leu261 și două molecule de apă. Ionul de calciu realizează o legătură între elicea $\alpha 8$, ce formează o parte a peretelui centrului activ și structura ce conține restul catalitic de histidină, contribuind astfel la menținerea în poziție corectă a His251 în centrul activ (Nardini și colab., 2000).

Enzimele din microorganisme psicrotrofe și psicrofile prezintă tot mai multă atenție datorită relevanței studiilor efectuate și a faptului că aceste enzime sunt adaptate la temperaturi mici. Acest lucru ar putea oferi noi oportunități pentru exploatarea biotehnologică bazată pe înalta lor activitate catalitică la temperaturi scăzute, termostabilitate mică și specificitate neobișnuită.

O asemenea lipază este lipaza din *Pseudomonas fragi*, care datorită secvenței sale asemănătoare cu lipazele *Pseudomonas*, oferă un model de studiu al adaptării lipazelor la temperaturi scăzute. Prin comparație cu lipazele din *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia glumae* și *Pseudomonas aeruginosa*, lipaza din *Pseudomonas fragi* prezintă secvențe similare de aminoacizi, excepție fiind regiunea 177-213. Amino-acizii ce formează centrul catalitic în *PaL* și *BcL* se regăsesc și în *PfragiL* și corespund la Ser83, Asp238 și His260. Spre deosebire de celelalte lipaze, în structura centrului activ al *PfragiL* se găsește o legătură de hidrogen între Asp259 și His260, acidul carboxilic apropiat (Glu289 în *BcL*), care se presupune că funcționează ca și un acceptor de protoni alternativ și nu este prezent nici un alt rest de glutamat sau aspartat.

Una dintre cele mai izbitoare diferențe între *PfragiL* și lipazele menționate, se referă la numărul de resturi de arginină: 11 resturi în *PaL*, 9 resturi în *BcL* și 24 în *PfragiL*. În *PfragiL* 20 din cele 24 de resturi de Arg sunt distribuite în mod uniform pe suprafața proteinei și doar două sunt implicate în legături intramoleculare (Alquati și colab., 2002).

Astfel se poate spune că *PfragiL* este caracterizată de o abundență în resturi încărcate pozitiv, ceea ce mărește flexibilitatea și abilitatea de a interacționa cu solventul (Narinx, Baise și Gerday, 1997), important pentru activitatea lipazei la temperaturi mici.

Alți factori cheie ce determină flexibilitatea moleculei de enzimă și activitatea catalitică la diferite temperaturi sunt numărul de punți disulfidice, locația resturilor de Pro și Arg și interacțiunile din miezul hidrofob. Numărul mare de punți disulfidice crește rigiditatea structurii proteinei și astfel și termostabilitatea ei (Aghajari și colab., 1998). Analiza structurii tridimensionale a *PfragiL* a arătat că în structura acesteia nu se găsește nici o punte disulfidică (este prezent doar un rest de Cys), ci doar o legătură între două resturi de aminoacizi aromatici (Trp184 și Phe244) implicate într-o ușoară stabilizare a proteinei. A fost demonstrat că resturile de Pro din structura lipazelor măresc rigiditatea și scad eficiența catalitică la temperaturi mici (Aghajari și colab., 1998), lucru care nu se întâlnește la *PfragiL*.

Astfel lipaza din *Pseudomonas fragi* poate fi clasificată într-un grup de lipaze omoloage bine caracterizate din punct de vedere biochimic și structural și spre deosebire de acestea, prezintă o bună adaptare la temperaturi scăzute datorită flexibilității ridicate a structurii sale (Alquati și colab., 2002).

1.2.7. Structura lipazei din *Burkholderia cepacia*

Una dintre cele mai folosite lipaze în sinteza organică este lipaza din *Burkholderia cepacia* (denumirea mai veche *Pseudomonas cepacia*) de la Amano Pharmaceutical Co., Ltd (Nagoya, Japonia) numită și Amano PS. Înainte de reidentificarea sursei bacteriene se numea lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (lipaza P). Datorită flexibilității centrelor de legare, BcL acceptă o gamă largă de substraturi, fiind folosită în reacții de hidroliză (Klempier, Faber și Griengl, 1989; Foelsche și colab., 1990; Georgens și Schneider, 1991; Chenevert și Gagnon, 1993; Hirose și colab., 1995; Tanaka și colab., 1995), alcooliză (Bianchi și Cesti, 1990; Bianchi și colab., 1992; Koichi, Suginaka și Yamamoto, 1995) regio- și stereoselective ale esterilor carboxilici și ale anhidridelor (Yamamoto și colab., 1988; Ozegowski, Kunath și Schick, 1993) și în reacții de transesterificare regio- și stereoselective a alcoolilor (Klempier, Faber și Griengl, 1989; Foelsche și colab., 1990; Georgens și Schneider, 1991; Kim și Choi, 1992; Moris și Gotor, 1992; Bovara și colab., 1993; Takano și colab., 1994; Chadha și Manohar, 1995; Ema și colab., 1996). Se poate spune că BcL aproape nu prezintă restricții cu privire la structura compușilor care sunt acceptați ca și substrat. Pentru a înțelege și a prezice reactivitatea și selectivitatea biotransformărilor catalizate de lipaze este necesar o aprofundare a studiilor asupra centrelor active, mecanismului, formei și dimensiunilor centrelor de legare ale lipazelor (Lemke, Lemke și Theil, 1997).



Figura 1.8. Reprezentarea schematică a elementelor structurii secundare a lipazei din *Burkholderia cepacia*. Structurile de α -elice sunt reprezentate sub forma unor serpentine, iar cele β -pliate prin săgeți. Domeniul C este colorat cu maro și verde, U1 cu albastru, iar U2 cu mov. Resturile de aminoacizi din centrul catalitic sunt notate S87, H286 și D264. Ionul de Ca^{2+} este reprezentat sub forma unei sfere albastre (Kim și colab., 1997).

Lipaza din *Burkholderia cepacia* este o enzimă globulară, cu dimensiunile $30\text{Å} \times 40\text{Å} \times 50\text{Å}$, structura sa primară este formată dintr-un lanț de polipeptidă cu 320 resturi de aminoacizi, ce corespunde unei mase moleculare a enzimei de 33 kDa. Secvența de aminoacizi este asemănătoare cu cea a lipazelor din *Burkholderia glumae* ($\approx 84\%$), *Pseudomonas fragi* ($\approx 33\%$) și *Pseudomonas fluorescens* ($\approx 22\%$).

Din structura cristalină se poate observa că enzima poate fi împărțită în trei domenii. Domeniul cel mai larg (domeniul C) conține pliarea caracteristică α/β hidrolazelor și un centru de legare al ionului de calciu (Noble și colab., 1993). Este alcătuit din resturile de aminoacizi 1-117, 167-214 și 262-320 și constă din șase structuri β -pliate paralele ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ și $\beta 6$) mărginite pe o parte de două α -elice ($\alpha 1$ și $\alpha 11$) și de patru α -elice ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 7$ și $\alpha 10$) pe cealaltă parte (Figura 1.8 și 1.9). Prin comparație cu pliarea α/β hidrolazelor se poate observa că în structura BcL primele două structuri β -pliate lipsesc ($\beta 1$ fiind echivalentă cu $\beta 3$ din pliarea α/β hidrolazelor), în plus apare o structură β -pliată ($\beta 6'$) în sens opus cu $\beta 6$, iar elicea $\alpha 10$ (ce corespunde la αE) este foarte mică (Figura 1.9). Între resturile Cys190 și Cys270 se găsește o punte disulfidică ce leagă elicea $\alpha 10$ de capătul N-terminal al structurii $\beta 6'$.

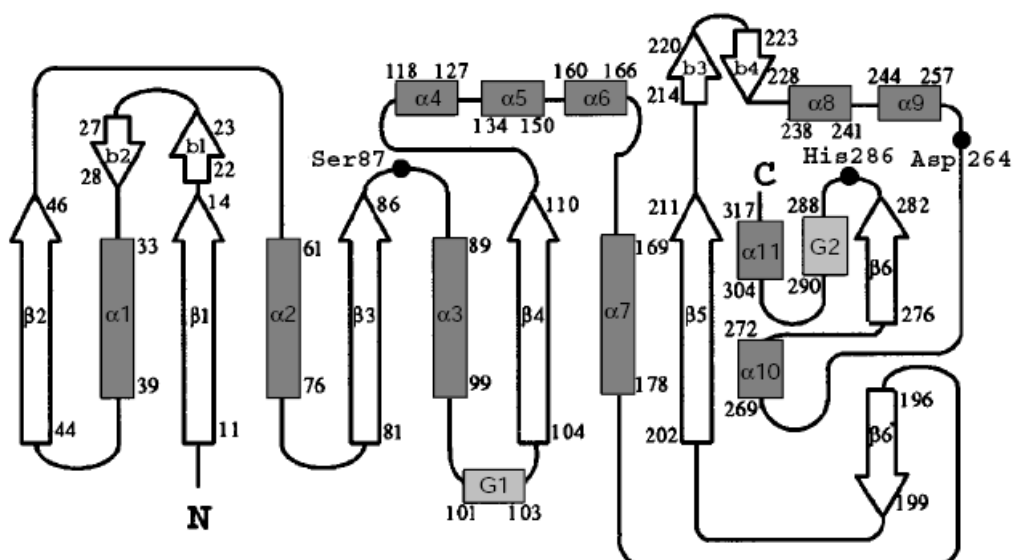


Figura 1.9. Diagrama schematică a structurii secundare a lipazei din *Burkholderia cepacia*. Structurile β -pliate sunt reprezentate prin săgeți, iar cele de α -elice, G_1 și G_2 sunt reprezentate prin dreptunghiuri. Resturile triadei catalitice (Ser87, Asp264 și His286) sunt marcate cu cercuri negre (Kim și colab., 1997).

Al doilea domeniu (domeniul U1) alcătuit din resturile 118-166 este alcătuit din trei structuri de α -elice ($\alpha 4$, $\alpha 5$ și $\alpha 6$) și se găsește între structurile $\beta 4$ și $\alpha 7$ ale domeniului C, iar al treilea (domeniul U2) alcătuit din resturile 213-261, constă din două structuri β -pliate antiparalele mici ($\beta 3'$ și $\beta 4'$) și două structuri de α -elice ($\alpha 8$ și $\alpha 9$) aflate între $\beta 5$ și $\alpha 10$ (Figura 1.9). Aceste două domenii sunt echivalente cu cele dintre $\beta 6$ și αD , respectiv $\beta 7$ și αE din pliarea α/β hidrolazelor (Kim și colab., 1997).

Triada catalitică a lipazei din *Burkholderia cepacia* este alcătuită din resturile Ser87, His286 și Asp264 localizate la capătul C-terminal al structurii β -pliate principale (Kim și colab., 1997), având aceeași ordine secvențială ca cea a familiei α/β hidrolazelor (Ollis și Goldman, 1992). Nucleofilul Ser87 este situat în vârful curbei dintre $\beta 3$ și $\alpha 3$, identificată prin secvența omoloagă Gly-X-Ser-X-Gly ce se găsește în multe serin-hidrolaze.

S-a arătat că această configurație specială a nucleofilului din centrul activ este esențială pentru hidroliza substratului (Ollis și Goldman, 1992).

Centrul de legare al ionului de calciu a fost localizat în poziție similară cu cel al lipazei din *Burkholderia glumae*. Liganzii ionului de calciu sunt două grupe carboxil din resturile Asp242 și Asp288, două grupe carbonil din Gln292 și Val296 și două molecule de apă. Restul catalitic His286, poziționat lângă trei liganzi ai ionului de calciu (Asp288, Gln292 și Val 296) este stabilizat de acest centru de legare.

Puntea disulfidică dintre resturile Cys190 și Cys270, ce stabilizează elicea $\alpha 10$, contribuie la rigiditatea restului de Asp264 din triada catalitică.

O caracteristică interesantă a centrului activ al BcL este prezența unei rețele de resturi polare (Ser87, His286, Asp264, Glu289 și His 86) în jurul triadei catalitice, și care interacționează între ele.

Prin studii biochimice și cristalografice anterioare s-a arătat că mecanismul hidrolizei catalizate de lipaze este similar cu cel al serin-proteazelor. În ambele cazuri un oxianion, creat în timpul hidrolizei, este localizat în așa numita **cavitate oxianionică** și este stabilizat prin interacțiune cu unii electrofili. Cavitatea oxianionă în BcL se formează atunci când restul Leu17, aflat între structurile $\beta 1$ și $\alpha 1$, se mută într-o poziție apropiată de cea a nucleofilului Ser87 și alături de Gln88 formează legături de hidrogen cu o moleculă de apă. Asemănător cu lipaza din *Rhizomucor miehei* (Derewenda și colab., 1992), *Humicola lanuginoza* (Derewenda și colab., 1994) și din complexul pancreas uman-colipaza din pancreas de porc (Egloff și colab., 1995), cavitatea oxianionică din structura BcL nu este preformată ci se generează la deplasarea capacului elicoidal de pe centrul activ. În conformația parțial deschisă a lipazei din *Chromobacterium viscosum* cu capacul ce începe să se deplaseze de pe centrul activ, cavitatea oxianionică este deja formată de atomii de azot ai Leu17 și Gln88. Un caz aparte îl reprezintă cutinaza, o enzimă lipolitică fără capac și fără activare la interfață, dar care are o cavitate oxianionică preformată (Martinez și colab., 1994).

Comparație cu structura unor lipaze omoloage

Prima structură determinată a unei lipaze bacteriene a fost aceea a lipazei din *Burkholderia glumae* (Noble și colab., 1993). La compararea secvențelor de aminoacizi ale BcL și BgL se observă că cele două enzime diferă prin cizeci de resturi de aminoacizi și o inserție (Val235), restul structurii secundare fiind foarte asemănătoare. În ciuda acestui fapt, structura terțiară a celor două lipaze prezintă diferențe semnificative și aceasta datorită conformațiilor diferite adoptate de acestea în medii cristaline. O asemenea diferență este observată pentru resturile de aminoacizi 130-166 care cuprind cele două structuri de α -elice $\alpha 5$ și $\alpha 6$ (Kim și colab., 1997).

Comparație cu structura unor lipaze neomoloage

Lipaza din *Burkholderia cepacia* prezintă în domeniul C o pliere tipică cu cea din familia α/β hidrolazelor, pliere ce constă din șase structuri β -pliate paralele, șase α -elice și două domenii mai mici (U1 și U2). Prin comparație cu lipaza din *Geotricum candidum* și *Candida rugosa*, se observă că BcL prezintă aceea parte esențială din plierea α/β hidrolazelor necesară pentru activitatea catalitică. Cu toate acestea restul catalitic Asp264 în BcL este localizat între $\alpha 9$ și $\alpha 10$ (Ollis și colab., 1992) și nu acolo unde se găsește în mod obișnuit în familia α/β hidrolazelor adică la capătul C-terminal al structurii $\beta 7$.

În plus în *BcL* și *BgL* se observă că un număr relativ mare de aminoacizi, 37 (resturile 130-166) din 320, sunt implicați în deplasarea capacului elicoidal, spre deosebire de 29 (resturile 65-93) din 525 cât se găsesc în lipaza din *Candida rugosa* și 14 (resturile 82-95) din 269 în lipaza din *Rhizomucor miehei*. Ca o consecință a acestui fapt, centrul activ al *BcL* devine ușor accesibil solventului. Concluzionând, se poate spune că centrul activ, triada catalitică precum și caracteristicile structurale obținute prin deplasarea capacului elicoidal (formarea cavității oxianionice și expunerea centrului de legare al substratului) al *BcL* se regăsesc și în structura multor lipaze din *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei* și *Candida antarctica* (Grochulski și colab., 1994; Uppengerg și colab., 1995; Ghosh și colab., 1995; Kim și colab., 1997).

1.2.8. Mecanismul reacțiilor catalizate de lipaze

Mecanismul reacțiilor catalizate de lipaze poate fi împărțit în următoarele etape:

1. adsorbția lipazei la interfața lipid-apă, etapă numită și activare la interfață
2. legarea substratului de enzimă
3. reacția enzimatică
4. eliberarea produsului sau a produșilor

1. Activarea la interfață

Structurile cristaline ale lipazelor din pancreas uman și *Candida rugosa* complexate cu inhibitori prezintă modificări conformaționale. Comparativ cu lipazele în stare nativă, la acestea capacul care acoperă centrul activ este deschis, rezultând astfel un centru activ liber și un centru hidrofob de legare al lipidelor. În *CrL*, modificările conformaționale duc la o suprafață hidrofobă extinsă, de aproape 800 Å². Determinarea structurii conformațiilor închise și deschise susține ipoteza enzimei în două stări: în conformație închisă (inactivă), stabilă în apă și una deschisă (activă), stabilă la interfața lipid-apă sau în solvenți organici. Comparând structurile cristaline ale lipazei fungice și a cele din pancreas uman, care evident au o istorie evoluționară diferită, s-au observat următoarele:

- Ambele enzime prezintă o triadă catalitică Asp-His-Ser, aceeași ca și în serin-proteaze. În aceste lipaze atomii activi din triada catalitică au stereochemie identică cu cei din serin-proteaze deși aminoacizii au conformații și orientări puțin diferite.
- În ambele enzime grupele catalitice sunt acoperite de un capac elicoidal, situat deasupra centrului activ, făcându-le astfel inaccesibile mediului de solvent.
- În ambele enzime capacul elicoidal prezintă o parte nepolară îndreptată spre centrul activ și o parte polară spre suprafața enzimei. Deși capacele celor două lipaze sunt foarte asemănătoare ca și structură ele se găsesc în poziții diferite ale lanțului polipeptidic.
- Chiar dacă secvența de aminoacizi nu este identică, cele două lipaze prezintă un cadru arhitectural asemănător ce constă în cinci structuri β-plate paralele între care sunt poziționate grupele catalitice.

2. Legarea substratului și triada catalitică

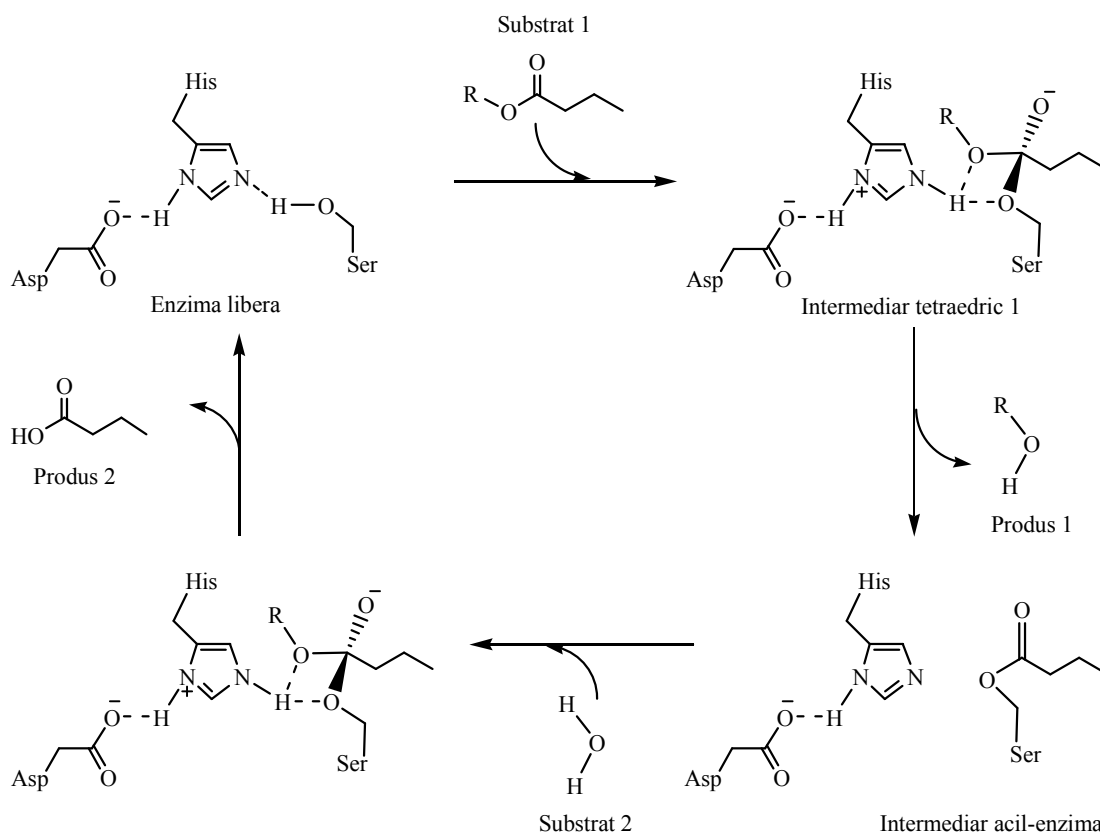
Legarea substratului de enzimă implică interacțiunea grupării carbonil cu triada catalitică dar și a lanțului acil cu enzima. Din moment ce grupa carbonil trebuie să fie foarte aproape de centrul catalitic, de asemenea lanțul acil trebuie să fie lângă suprafața enzimei. Din cauza mărimii sale, locația lanțului acil este foarte importantă în procesul de legare. Datorită mișcării de deplasare a capacului din timpul activării la interfață, se formează un canal hidrofob între acesta și suprafața enzimei. Dimensiunea canalului este ideală pentru cuplarea cu lanțul acil, cuplare care este stabilizată de interacțiunea dintre resturile nepolare ale acestora. A fost demonstrat că configurația canalului hidrofob este responsabilă pentru specificitatea de substrat. Această ipoteză pare plauzibilă din moment ce lipazele prezintă de obicei preferințe pentru anumite lungimi ale lanțului acil, grade de nesaturare și locații ale dublelor legături. Oricare dintre acești factori pot să afecteze interacțiunea dintre lanțul acil și canalul hidrofob.

Grupa carbonil se leagă de enzimă în apropierea centrului activ. Pentru această legare aici este creată o “cavitate” de dimensiune potrivită grupei carbonil. Aceasta este atacată, de un rest de lângă centrul activ, în scopul formării unei legături de hidrogen. Când grupa carbonil se află în poziția ideală lângă centrul activ, reacția chimică poate avea loc.

3. Reacția enzimatică

Reacția catalizată enzimatic are loc în zona așa numitei triade catalitice alcătuite din aminoacizii Ser, His și Asp/Glu și câteva resturi care au drept scop stabilizarea oxianionului. Aceste resturi apar în aceeași ordine în toate secvențele de aminoacizi din lipaze și au aceeași orientare spațială în toate structurile.

Triada catalitică, care funcționează ca un sistem de acceptare-cedare a sarcinilor, are rolul principal în mecanismul hidrolizei biocatalitice ce implică formarea unui intermediar acil-enzimă și a doi întremieri tetraedrici diferiți. Grupa carboxil din Asp este legată printr-o legătură de hidrogen de His, iar azotul His este legat tot printr-o legătură de hidrogen de hidroxilul Ser. Prima etapă de reacție este aceea de a face ca hidroxilul Ser să fie un nucleofil mai puternic. Acest lucru este realizat de His, care smulge complet protonul din hidroxilul serinic, formând astfel un oxianion. Oxianionul serinic atacă carbonilul substratului conducând la formarea primului intermediar tetraedric (Schema 1.2) ce este stabilizat prin legături de hidrogen cu atomii de azot ai aminoacizilor ce aparțin așa numitei “cavități oxianionice” (aranjamente de aminoacizi ce au un rol important în stabilizarea intermediarului tetraedric prin legături de hidrogen) (Ollis și colab., 1992). În continuare electronii oxianionului sunt cedați înapoi carbonului carbonilic, iar protonul His este transferat digliceridei (alcool), care este eliberată.



Schema 1.2. Mecanismul reacției de hidroliză catalizată de lipaze

4. Eliberarea produsului

Pentru a se termina hidroliza, esterul serinic format trebuie să reacționeze cu o moleculă apă, care trebuie să fie transformată într-un nucleofil mai puternic, așa cum s-a făcut cu hidroxilul serinic (intermediarului acil-enzimă Schema 1.2). În acest scop, atomul de azot al His smulge un hidrogen al moleculei de apă, formând un hidroxianion. Acesta atacă carbonul carbonilic al grupării esterice, formându-se astfel al doilea intermediar tetraedric, stabilizat prin legături de hidrogen. În continuare electronii oxianionului sunt cedați înapoi carbonului carbonilic, iar acidul gras este eliberat. Pentru a restabili rețeaua de legături de hidrogen, oxigenul serinic își reia înapoi hidrogenul de la His. Dacă enzima acționează într-un mediu cu conținut redus de apă orice alt nucleofil poate concura cu apa în atacul asupra intermediarului acil-enzimă conducând la o serie de transformări posibile (Bommarius și Riebel, 2004).

1.3. Imobilizarea lipazelor

Enzimele sunt catalizatori ce prezintă câteva proprietăți excelente (activitate ridicată, selectivitate și specificitate), ce le permite să realizeze cele mai complexe procese chimice în diferite condiții experimentale (Mateo și colab., 2007). Aceste avantaje indiscutabile pot fi diminuate datorită costului ridicat, instabilității termice și chimice, dificultății de a fi recuperate din mediul de reacție, mai ales atunci când sunt utilizate în soluții, ceea ce limitează utilizarea lor în procesele industriale. În aceste condiții, imobilizarea s-a dovedit a fi metoda cea mai valoroasă pentru a crește stabilitatea operațională a enzimelor, a evita contaminarea cu produsul de reacție și de a permite separarea lor ușoară din amestecul de reacție în vederea unor utilizări repetate. În plus, utilizarea unei enzime imobilizate permite simplificarea proiectării reactorului și a controlului reacției. Astfel se poate spune că imobilizarea este o cerință a utilizării enzimelor ca și biocatalizatori industriali și este cea mai simplă soluție de eficientizare a acestora (Mateo și colab., 2007; Sheldon, 2007).

Termenul de **“enzime imobilizate”** se referă la enzime care sunt mărginite fizic sau localizate într-o regiune definită din spațiu, cu menținerea activității lor catalitice și care pot fi folosite în mod repetat și continuu (Katchalski-Katzir, 1993). Acest termen se folosește începând din anul 1971, fiind o recomandare a primului Congres de Ingineria Enzimelor, care s-a ținut în acel an.

Prima încercare de imobilizare a fost prin adsorbția invertazei pe cărbune, descrisă încă de la începutul secolului trecut (1915) de Hedin, dar preparatul obținut s-a dovedit a fi foarte instabil. Istoria modernă a imobilizării începe cu sfârșitul anilor 40, atunci când câteva grupuri de cercetători (Michel și Evers în 1947, Grubhofer și Schleith în 1954, Manacke în 1955) au imobilizat enzime și pe alte suporturi (Silman și Katchalski, 1966). Georg Manacke a fost primul care a reușit să realizeze preparate stabile de enzime imobilizate folosind drept suport polimeri, dar în ciuda acestui fapt nu a avut succes în a convinge industria de importanța acestei descoperiri.

Începând cu anii 1960 a avut loc o dezvoltare însemnată a cercetărilor privind enzimele imobilizate, cu scopul de a le utiliza drept catalizatori industriali în procese continue. Tot în acea perioadă a fost pusă baza multora dintre tehnologiile folosite și astăzi, fapt datorat creșterii explozive a publicațiilor în acest domeniu (Tosa și colab., 1966).

Primele aplicații industriale ale enzimelor imobilizate au fost: obținerea aminoacizilor optic puri din amestecuri racemice cu aminoacilază fungică din *Aspergillus oryzae* imobilizată prin legare ionică, conform studiilor realizate de Chibata și colaboratorii în 1967 (Tosa și colab., 1966) și hidroliza penicilinei G (Carleymith și Lilly, 1979, împreună cu Beecham Pharmaceuticals, UK și Schmidt-Kastner, Bayer, Germania) (Buchholz, Kasche și Bornscheuer, 2005). Inițial se folosea numai o singură enzimă imobilizată, dar începând cu anii 70 a avut loc dezvoltarea unor sisteme mai complexe ce includeau reacții cu mai multe enzime imobilizate și reacții cu celule imobilizate.

Cea mai mare cantitate de enzimă imobilizată produsă a fost și este *glucozizomeraza*, având o productivitate de 500 kg izosiroop/kg enzimă imobilizată în 1975, iar în 1997 de aproximativ 15.000 kg izosiroop /kg enzimă imobilizată, creștere datorată noilor tehnici de imobilizare (Buchholz și Poulson, 2000).

Folosirea biocatalizatorilor imobilizați a dus, în unele cazuri, la îmbunătățirea performanțelor tehnice și economice a proceselor industriale (Tabelul 1.6).

Tabelul 1.6. Proprietățile tehnologice ale sistemelor cu enzime imobilizate

Avantaje	Dezavantaje
Reutilizarea catalizatorului	Pierderea sau reducerea activității
Separarea ușoară a produsului – nu mai apare problema impurificării cu enzimă	Limitări difuzionale
Transformarea substratului se poate opri la un moment dat prin separarea catalizatorului	Costuri adiționale
Operarea ușoară a reactorului	
Numeroase posibilități de alegere a reactorului	

Enzimele imobilizate pot fi folosite ca:

- biocatalizatori heterogeni regenerabili - cu scopul de a reduce costurile de producție prin reutilizare și control eficient al procesului;
- catalizatori stabili și reutilizabili în aplicații analitice și medicale;
- adsorbânți selectivi pentru purificarea proteinelor și a enzimelor;
- instrumente esențiale în chimia proteinelor;
- microechipamente pentru controlul medicamentelor (Cao, 2005).

Metode de imobilizare a enzimelor

Metodele de imobilizare a enzimelor pot fi clasificate în metode ireversibile și reversibile.

Conceptul de imobilizare ireversibilă presupune că odată ce biocatalizatorul este imobilizat nu mai poate fi readus în starea nativă decât cu pierderea activității biologice sau cu distrugerea suportului, în schimb metodele reversibile de imobilizare permit enzimei să poată fi detașată de pe suport în condiții blânde. Astfel, utilizarea metodelor reversibile pentru imobilizarea enzimelor este mai atractivă din punct de vedere economic, deoarece atunci când activitatea enzimei scade suportul poate fi regenerat și reîncărcat cu enzimă proaspătă.

Metode de imobilizare ireversibilă a enzimelor (Figura 1.10)

- a. legare covalentă
- b. entrapare (în gel sau fibre)
- c. microîncapsulare
- d. înrețelare (reticulare)

Metode de imobilizare reversibilă a enzimelor (Figura 1.11)

- a. adsorbția
- b. legare ionică
- c. legare biospecifică
- d. legare prin chelatare
- e. legare prin legături disulfidice (Guisan, 2006)

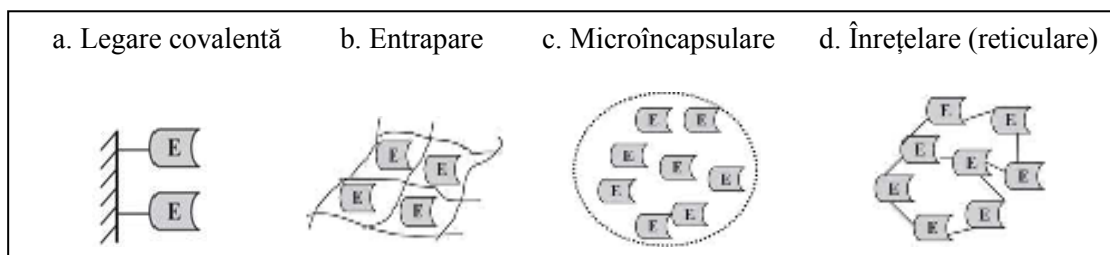


Figura 1.10. Metode de imobilizare ireversibilă a enzimelor

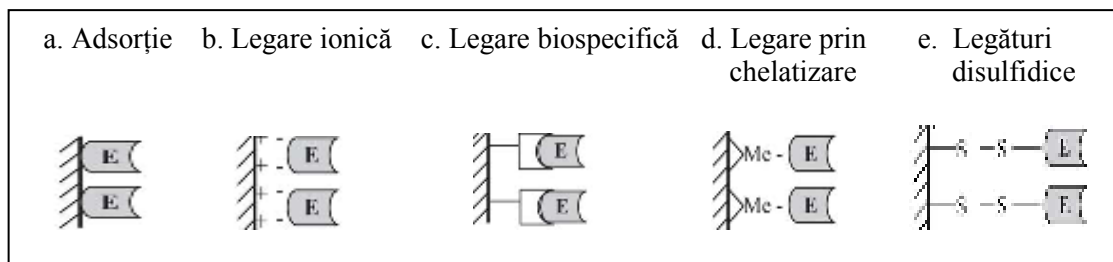


Figura 1.11. Metode de imobilizare reversibilă a enzimelor

1.3.1. Imobilizarea prin adsorbție

Este cea mai veche și cea mai folosită metodă de imobilizare a enzimelor. Presupune adsorbția fizică a enzimei pe suprafața suportului insolubil (Figura 1.12.a) și formarea unor legături slabe (Van der Waals, legături de hidrogen, interacțiuni hidrofobe) între enzimă și suprafața materialului solid, acest material nefiind în general funcționalizat specific.

Adsorbția fizică nu determină în general modificări conformaționale ale proteinei enzimatică sau distrugerea centrului activ. Așadar, cu condiția găsirii unui suport adecvat, această metodă este simplă și eficientă.

Inițial se foloseau suporturile minerale: cărbunele activ, sticla poroasă (Marlot și colab., 1985; Omar și colab., 1988), pământ de diatomee (kisergur) (Macrae și colab., 1985), silicagelul (Wisdom, Dunnill și Lilly, 1985; Brady și colab., 1988), alumina (Brady, 1986), hidroxiapatita, bentonita. Cele mai folosite suporturi sunt rășinile schimbătoare de ioni, celita (Svensson, Adlercreutz și Mattiasson, 1990) și biopolimerii (Garcia și colab., 1992; Villeneuve și colab., 2000).

Deoarece, cantitatea de enzimă fixată pe suport și activitatea după imobilizare depind în mare măsură de natura suportului, alegerea acestuia trebuie efectuată ținând cont de următoarele caracteristici:

- porozitatea și mărimea particulelor suportului
- distribuția particulelor pe suport
- suprafața specifică
- compoziția chimică
- raportul molar dintre grupările hidrofile și cele hidrofobe

În mod evident natura suportului este foarte importantă pentru eficiența imobilizării, dovadă fiind numeroasele studii făcute în scopul stabilirii cerințelor fizice și chimice ideale ale suportului. S-a observat că suporturile cu dimensiuni ale porilor >100 nm sunt necesare pentru ca activitatea să nu fie dependentă de diametrul porilor și astfel să se evite limitările difuzionale care ar putea apărea (Bosley, 1997).

În general materialele hidrofobe sunt suporturi mai bune pentru imobilizarea enzimelor. Cantitatea de enzimă adsorbită pe asemenea suporturi este în general mai mare și astfel sunt obținute activități enzimatică mari. Suporturile hidrofile tind să concureze cu enzima pentru apa disponibilă în reacție. Atunci când lipaza și suportul sunt complet hidratate, suporturile hidrofile duc la o concentrație mare de apă în jurul enzimei favorizând reacțiile de hidroliză (Marlot și colab., 1985; Pronk și colab., 1988; Gonçalves și colab., 1997).

Stabilitatea enzimelor este dictată de structura lor tridimensională, care la rândul ei este determinată de structura primară și de factorii de mediu cum este imobilizarea. Imobilizarea pe suporturi potrivite a arătat o creștere a stabilității și activității enzimelor, devenind un factor important în producerea biocatalizatorilor economici și competitivi industrial. Prin urmare, se fac cercetări în găsirea și utilizarea de noi suporturi pentru imobilizarea lipazelor.

Adsorbția enzimei depinde de următorii parametri:

- pH-ul
- natura solventului
- tăria ionică
- concentrația enzimei și a suportului solid
- temperatura

Dintre aceștia o importanță majoră o are concentrația de enzimă raportată la unitatea de suprafață a suportului solid, activitatea enzimei imobilizate crescând cu creșterea concentrației enzimei până la o valoare de saturație, după care scade.

Temperatura are un rol important, mai ales în cazul structurilor poroase, când difuzia devine un factor esențial. Timpul de imobilizare este mai scurt dacă temperatura este mai ridicată, însă o temperatură mult prea mare poate duce la denaturarea enzimei. Majoritatea lipazelor imobilizate prezintă valori mai mari ale temperaturilor lor optime comparativ cu lipazele native. Această observație este atribuită faptului că enzimele imobilizate sunt mai puțin sensibile la dezactivarea termică deoarece structura lor este mult mai rigidă după imobilizare. De exemplu, Montero și colab. au comparat stabilitatea termică a lipazei din *Candida rugosa* imobilizată pe polipropilenă microporoasă cu cea a lipazei native în soluție. La valori ale temperaturii de peste 40°C ambele forme ale lipazei au fost mai puțin active, dar cea imobilizată și-a menținut o mare parte din activitatea sa inițială. În plus, lipaza solubilă a prezentat activitate maximă la 37°C pe când cea imobilizată în jurul valorii de 45°C (Montero și colab., 1993).

În ceea ce privește domeniul de pH, în general s-a observat că pH-ul optim este ușor îndreptat spre valori alcaline.

În mod interesant, imobilizarea poate uneori să împiedice dezactivarea lipazei de către produșii care se formează în timpul reacției catalizate de aceasta. Un exemplu foarte cunoscut este efectul dezactivant al acetaldehidei asupra unor lipaze native, efect datorat sensibilității lizinei din structura lipazelor (Kaga și colab., 1994).

Numeroase articole descriu folosirea de noi suporturi pentru imobilizarea lipazelor. De exemplu, Ruckenstein și Wang au studiat imobilizarea prin adsorbție a lipazei din *Candida cylindracea* pe un suport microporos de poli(stiren-divinilbenzen) (Ruckenstein și Wang, 1993). Tantakulsiri și colab., la imobilizarea aceleiași lipaze prin adsorbție fizică, au folosit ca suport cenușa din boabe de orez, obținând astfel o îmbunătățire a termostabilității enzimei (Tantakulsiri, Jeyashole și Krisanangkura, 1997).

Adăugarea unor aditivi sau solvenți în timpul procesului de imobilizare a dus la o îmbunătățire a eficienței acesteia. Ca de exemplu, lipaza din *Pseudomonas fluorescens* a fost adsorbită pe o rășină schimbătoare de ioni Dowex 66 pretrată cu un solvent polar (etanol sau izopropanol) ceea ce a dus la o creștere a randamentului de imobilizare de până la 96-97% (Kogusi, Takahashi și Lopez, 1995). Se presupune că solvenții organici polari adsorb moleculele de apă din suport favorizând astfel adsorbția proteinelor.

De asemenea, în scopul îmbunătățirii eficienței imobilizării au fost testați un număr mare de aditivi cum sunt: albumina, gelatina, cazeina, PEG, amino-acizi ce s-au dovedit a fi foarte eficienți, dar cel mai utilizat este glutaraldehida, care se pare că stabilizează interacțiunea enzimei cu suportul (Wehjte, Adlercreutz și Mattiasson, 1992).

Un caz interesant, ce reprezintă o alternativă a imobilizării, îl reprezintă o plantă numită *Carica papaya latex*, care pe lângă activitatea sa proteolitică cunoscută prezintă caracteristicile unei lipaze. A fost demonstrat că lipaza din această plantă, poate fi considerată ca fiind "self-immobilized" din moment ce ea este natural legată de polizaharide (Giordani, Muolin și Verger, 1991). Specificitatea acestei lipaze a fost intens studiată (Villeneuve și colab., 1995; Mukherjee și Kiewitt, 1996), iar datorită costului ei foarte scăzut a fost folosită ca și catalizator în sinteza unor trigliceride (Foglia și Villeneuve, 1997; Villeneuve și colab., 2000).

Cu toate acestea metoda de imobilizare prin adsorbție fizică are ca și principal dezavantaj forțe de legătură slabe dintre enzimă și suport, care face ca enzima să fie afectată de condițiile de mediu și drept urmare poate duce la desorbția ușoară a acesteia de pe suport.

1.3.2. Imobilizarea prin entrapare în sol-gel

Dintre numeroasele tehnici de imobilizare existente, entraparea biomoleculelor se remarcă datorită simplității și reproductibilității metodei. Procesul de entrapare constă în închiderea enzimei în interiorul rețelei unui polimer sau unei microcapsule mărginite de o membrană semipermeabilă, ceea ce limitează mișcările de rotație și depliere precum și desprinderea ei, permițând însă difuzia substratului și a produșilor de reacție (Guisan, 2006). Spre deosebire de alte metode clasice de imobilizare (legare covalentă sau înrețelare), în acest caz enzima nu este legată prin legături covalente de gel sau de membrană (Edmison și colab., 1994; Dave și colab., 1995; Gottfried și colab., 1999; Hartnett și colab., 1999), iar dezactivarea enzimei, în general, este redusă. Totuși, dacă pentru entrapare se utilizează o reacție chimică de polimerizare, condițiile de reacție pot fi destul de severe și în unele cazuri se înregistrează pierderea activității enzimatică.

Imobilizarea prin entrapare poate fi utilizată cu succes pentru imobilizarea unui număr mare număr de biomolecule: enzime, proteine, anticorpi, microorganisme și celule vii (Cartura și colab., 1989; Inama și colab., 1993; Avnir și colab., 1996; Armon și colab., 1996; Roux și colab., 1997), cu numeroase aplicații în biocataliză, cromatografia de bioafinitate, bioelectronică și bioprocese (Guisan, 2006).

Biocatalizatorii imobilizați prin entrapare pot fi:

- entrapați în matricea unui gel înrețelat cu structură de polizaharidă, proteină sau polimer sintetic;
- entrapați în fibre tubulare;

- microîncapsulați: entrapați în microcapsule ale unor polimeri sintetici;
- entrapați în membrane lichide (de ex. membrane obținute pe bază de fosfolipide);
- entrapați în membrane de ultrafiltrare;
- entrapați în materiale de tip sol-gel

În ultimii ani, un interes deosebit a fost acordat imobilizării biomoleculelor prin tehnica de entrapare în matrici anorganic-organice hibride, aceasta devenind un instrument puternic pentru îmbunătățirea tuturor proprietăților biocatalizatorului (Noureddini și Gao, 2007). Procesul de producere a sol-gelului, ca o cale de-a forma sticle organice a fost cunoscut de mai bine de un secol, atunci când Ebelman (în 1846) a sintetizat primul precursor alcoxic. Totuși, primul document demonstrând folosirea materialelor de tip silicați pentru entraparea unei componente biologice nu a apărut decât la mijlocul anilor 1950, când Dickey a demonstrat că mai multe enzime pot fi entrapate în derivați de acid silicic de tip sticle, cu reținerea parțială a activității biologice (Dickey, 1955). Din păcate importanța acestei descoperiri nu a fost realizată la acel moment și în decursul a trei decenii dezvoltarea biomaterialelor derivate de sol-gel a fost foarte puțin abordată (Janczarski și colab., 1976; Glad și colab., 1985).

În 1990 Avnir și colab. au publicat o lucrare științifică cheie, descriind entraparea proteinelor în sticle de tip silicați, derivați ai alcoxisilanilor. Prin metoda sol-gelului acest grup a demonstrat că o serie de enzime, incluzând aspartaza și fosfataza alcalină pot fi entrapate în sticle provenite din tetraetil ortosilicat (TEOS), cu reținerea activității enzimatică (Braun și colab., 1990). Acest raport a fost urmat de lucrarea grupului lui Zink în 1992, care a demonstrat că alte proteine cum ar fi citocromul C și mioglobina ar putea fi entrapate în ortosilicat silicați derivați de tetrametil ortosilicat (TMOS), cu menținerea abilității de reținere a O₂ (Ellerby și colab., 1992). Din acest moment au apărut multe lucrări descriind entraparea unei mari varietăți de specii biologice incluzând enzime, anticorpi, proteine reglatoare, proteine legate de membrană, acizi nucleici și chiar celulele întregi într-un număr mare de materiale compozite derivate de sol-gel (Avnir și colab., 1994; Reetz și colab., 2003; Pierre, 2004; Dragomirescu și colab., 2005; Gill și Ballesteros, 2000; Lee și colab., 2007; Noureddini și Gao, 2007).

Cele mai importante avantaje ale materialelor silicate derivate de sol-gel pentru imobilizarea proteinelor sunt:

- Pot fi realizate transparente din punct de vedere optic, fiind ideale pentru dezvoltarea senzorilor chimici și biochimici care se bazează pe modificarea unui semnal de adsorbție sau fluorescență.
- Permit o mare varietate de modificări chimice bazate pe includerea mai multor aditivi de polimeri, modificatori redox și silani modificați organic, rezultând materiale ce conduc electricitatea, potrivite pentru senzori electrochimici.
- Au o mărime și distribuție potrivită a porilor care permite moleculelor mici și ionilor să difuzeze în matrice, în timp ce biomoleculele mari rămân închise în pori făcând posibilă bioanaliza dependentă de mărimea moleculei (Jin și Brennan, 2002).

Totuși asemenea materiale pot fi fragile sau pot să crape din cauza hidratării excesive și în unele cazuri pot bloca accesibilitatea substratului către biomoleculele entrapate. Mai mult, interacțiunile proteină-silicat și analit-silicat, care pot apărea în timpul procesului de entrapare, pot duce la denaturarea enzimei (Flora și Brennan, 2001; Jin și Brennan, 2002), deci probabil că va fi nevoie de materiale nanocompozite organice-anorganice îmbunătățite pentru a depăși astfel de probleme (Figura 1.12).

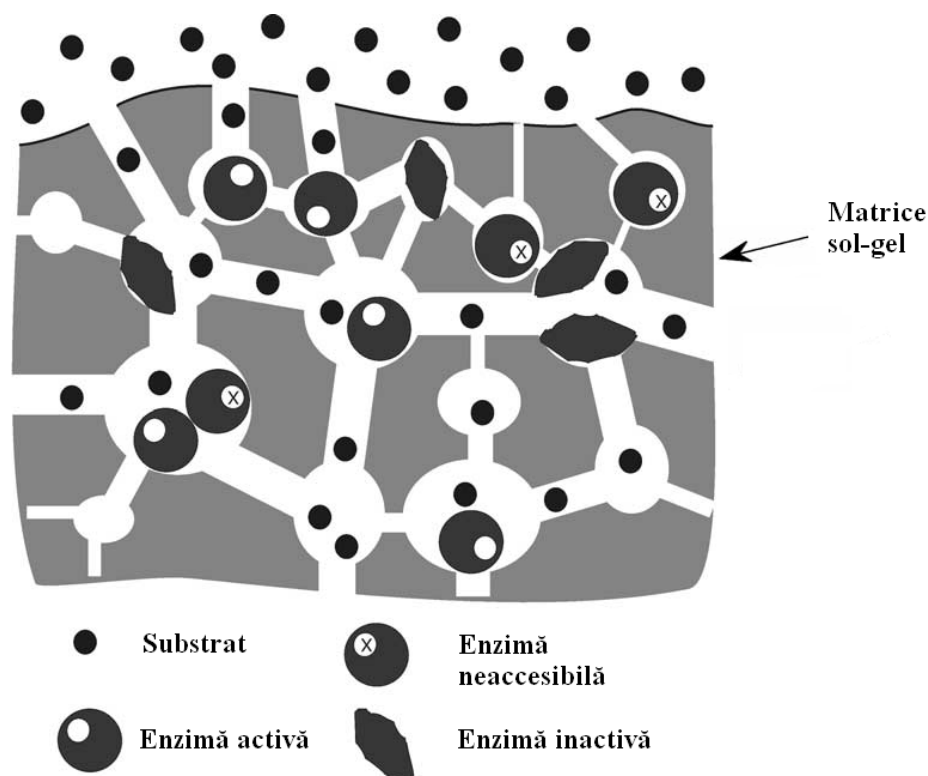


Figura 1.12. Accesibilitatea moleculară a enzimelor entrapate în matricea sol-gel (Jin și Brennan, 2002).

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

- Metoda trebuie să fie aplicabilă soluțiilor apoase, deoarece în general acestea sunt necesare pentru a menține funcția biologică a biomoleculelor.
- Reacția de polimerizare trebuie să fie compatibilă cu domeniile de pH și cele de tărie ionică necesare pentru funcționarea proteinei (pH 4-10, domeniul de tărie ionică 0,01-1,00 M).
- Procesul trebuie să aibă loc la temperatura apropiată temperaturii camerei pentru a menține proteinele în conformația lor nativă.
- Materialele trebuie să aibă o mărime a porilor suficient de mică pentru a preveni antrenarea biomoleculelor în soluție, dar destul de mare pentru a permite compușilor cu molecule mai mici să pătrundă în matrice cu ușurință.
- Proprietățile materialului ar trebui să fie potrivite în așa fel încât să permită modificarea mediului intern pentru a maximaliza activitatea biomoleculelor entrapate.

- Atunci când este folosit drept componentă a unui senzor, materialul final trebuie să fie transparent din punct de vedere optic sau conducător de electricitate, pentru a permite măsurători spectroscopice sau electrochimice.
- Fabricarea materialului trebuie să fie simplă, directă și reproductibilă permițând obținerea unei varietăți de formate ce includ sticla groasă, filme subțiri, coloane, fibre, pudră și rețele (Jin și Brennan, 2002).

1.3.2.1. Tipuri de precursori sol-gel

Procesele sol-gel au fost intens studiate în știința materialelor și au fost împărțite în două clase în funcție de natura precursorilor: **precursori anorganici** și **precursori alcoxidici**.

Precursori anorganici pot fi practic toți oxizii importanți MO_n (unde M este un metal sau semimetal și n nu este neapărat număr întreg) dar și mulți alți oxizi micști. Multe dintre studii au fost concentrate asupra SiO_2 ca și model, deși pentru multe aplicații nu acesta este matricea optimă și astfel trebuie luate în considerare și TiO_2 , ZrO_2 și Al_2O_3 , amestecuri cum ar fi SiO_2/ZrO_2 dar și materiale hibrid organice-anorganice (numite ormosil) (Avnir, 1995).

Precursorii alcoxidici pot fi: tetraalcoxisilani, alchiltrialcoxisilani, trialcoxisilani funcționalizați și alcoximetalizați. Calea alcoxică implică transformarea acestor precursori într-un polimer anorganic extrem de reticulat prin hidroliză și reacții de condensare.

Cei mai utilizați precursori alcoxidici în procesul sol-gel sunt în general de forma: $(RO)_4Si$ (de ex: tetrametoxisilan TMOS sau tetraetoxisilan TEOS) și $R''(R'O)_3Si$ (Figura 1.13) și pot fi clasificați în următoarele grupe:

Grupa I: tetraalcoxisilani

Grupa II: alchil-trialcoxisilani, gruparea alchil fiind metil, etil, propil, butil, pentil sau ciclohexil

Grupa III: aril- sau alchil-trialcoxisilani cu R'' =grupare aril (fenil, benzil) sau grupare alchil cu lanț lung (C_nH_{2n+1} , $n=6, 8, 10, 12, 14, 18$)

Grupa IV: trialcoxisilani cu grupări funcționale inerte purtătoare de grupe γ -amino (3-aminopropil, 3-carboxipropil, 3-mercaptopropil, etc.) care pot fi cu ușurință activate pentru legarea covalentă a enzimei sau folosite ca și adsorbent ionic.

Grupa V: trialcoxisilani cu grupări funcționale active (izociano, epoxi, duble legături active)

Grupa VI: trialcoxisilani cu grupări funcționale inerte, care sunt de obicei utilizate pentru a modifica rețeaua de gel

Grupa VII: poli(alcoxisilani) și derivații lor, cu diferite grupări funcționale

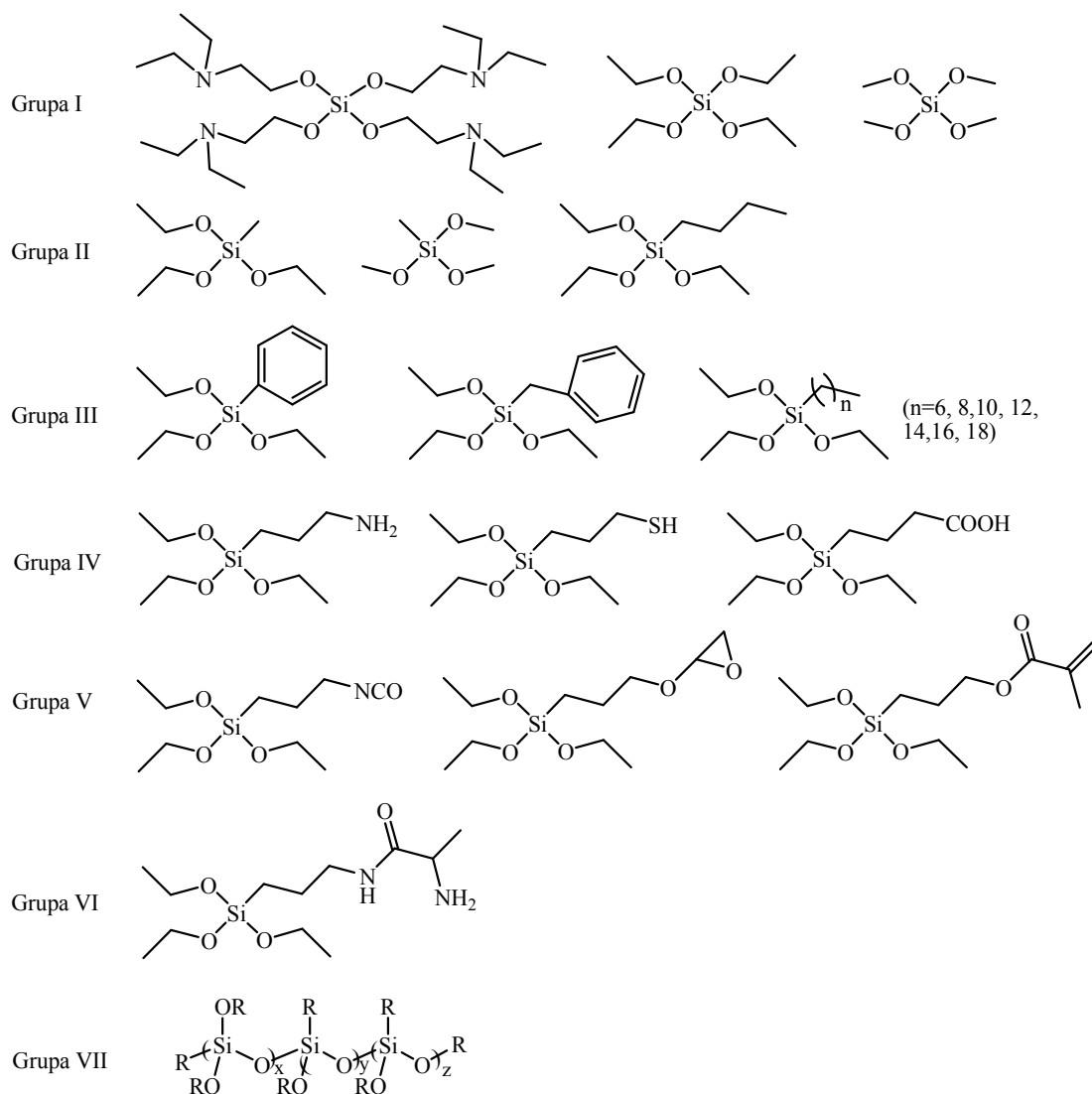


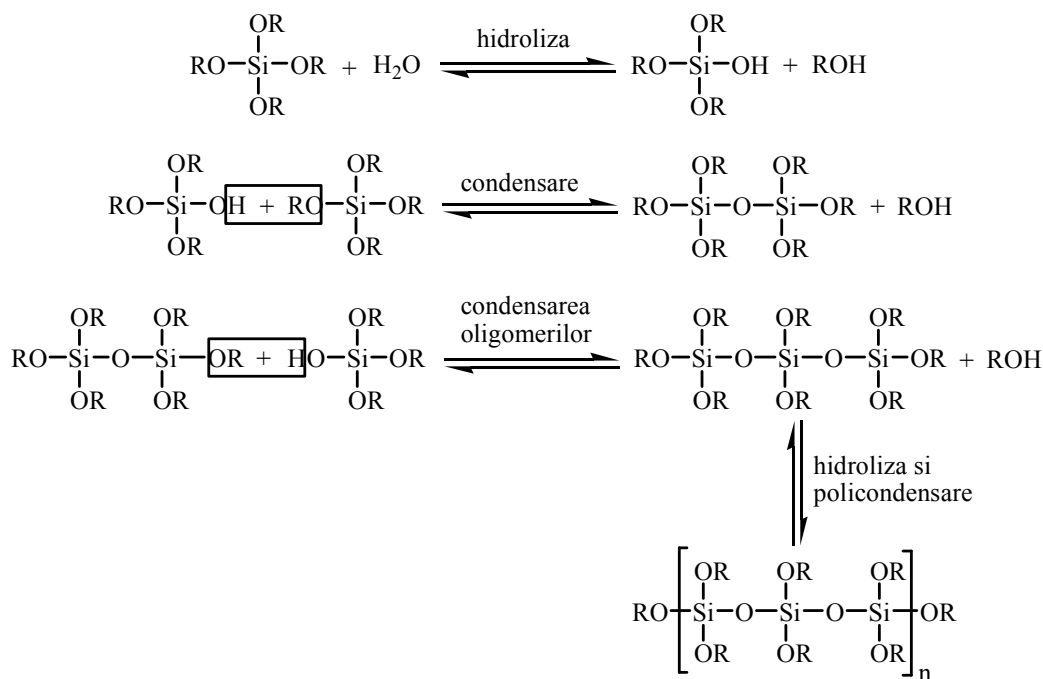
Figura 1.13. Precursorii alcoxicici cel mai des utilizați în procesul sol-gel

Pentru a obține enzime immobilizate cu proprietăți dorite, de exemplu cu reținerea activității, stabilității și selectivității, este adesea necesar să fie selectați precursorii potriviți și de asemenea să se optimizeze raportul lor molar. Ca și în cazul altor tehnici de immobilizare, condițiile optime pentru entrapare diferă de la o enzimă la alta și de la o aplicație la alta. Un mod unic de a modifica proprietățile enzimei se poate realiza doar prin simpla schimbare a precursorilor, care pot să fie hidrofilii, hidrofobi, încărcăți negativ sau cu grupări funcționale active/inerte (Cao, 2005).

1.3.2.2. Tehnica entrapării enzimelor în sol-gel

Formarea unui biocompozit sol-gel începe cu hidroliza parțială sau completă a unui precursor potrivit într-un solvent organic, de exemplu alcoolii, pentru a forma un sol apos (dispersie coloidală a particulelor într-un lichid). Precursorii pot fi alcătuiți din tetraalcoxisilani, mono-, di-, tri-alchilalcoxisilani sau pot conține grupări funcționale de tip alchil, aril, amino-carboxil, tiol sau alte grupări (resturi redox active, flavine sau chinone), precum și alte centre metalice: Al, Ti, V sau Ce.

Reacția de hidroliză implică un atac nucleofil al apei la centrul de siliciu. Mecanismul detaliat este dependent de catalizatorul folosit. Sunt posibile trei tipuri de catalize: acidă, bazică (ioni OH⁻) și nucleofilă (F⁻, *N*-metilimidazol, etc.). Hidroliza poate fi urmată de transesterificare cu aditivi cu compuși conținând grupe hidroxilice, cum ar fi glicerina pentru a forma poli(gliceril silicați) care sunt mult mai biocompatibili decât alcoxisilanii tipici (Gill, 2001; Jin și Brennan, 2002).



Schema 1.3.

După hidroliză, solul poate fi folosit imediat sau poate fi păstrat un anumit timp (până la câteva săptămâni) pentru a permite modificarea continuă a particulelor de sol. În tot acest timp se produc reacții de condensare și continuă hidroliza rezultând un mare număr de polisilicați liniari, ramificați și coloidal. Precursorul hidrolizat este apoi amestecat cu o soluție tampon apoasă ce conține biomoleculele, alături de catalizatori, aditivi pentru controlul uscării, polimeri, agenți de modelare, specii redox sau materiale de umplură, care sunt necesari pentru modificarea proprietăților materialului finit. În mod uzual reacția de polimerizare este inițiată printr-o schimbare a pH-ului și de prezența catalizatorilor și poate dura o perioadă de timp de la minute la ore, rezultând un gel (un schelet/o structură solidă continuă ce înglobează o fază lichidă continuă). Gelifierea precursorului de sol este însoțită de entraparea biomoleculei (Schema 1.3).

Gelurile inițiale sunt moi, ușoare și conțin o cantitate mare de apă (50-80%) și pori mari (până la 200 nm diametru). Maturarea rețelei de silicat umed timp de câteva zile până la câteva săptămâni determină continuarea reacțiilor de condensare și face rețeaua mai puternică. În timpul acestei etape, alcoolul entrapat și apa rezultată din hidroliza inițială și din reacția de condensare vor fi îndepărtate din matrice, făcând ca aceasta să se micșoreze cu 10-30%, diametrul porilor să scadă cu aproximativ 25% și proporția relativă a grupărilor siloxan față de grupările de silanol să crească (Brinker și Scherer, 1990).

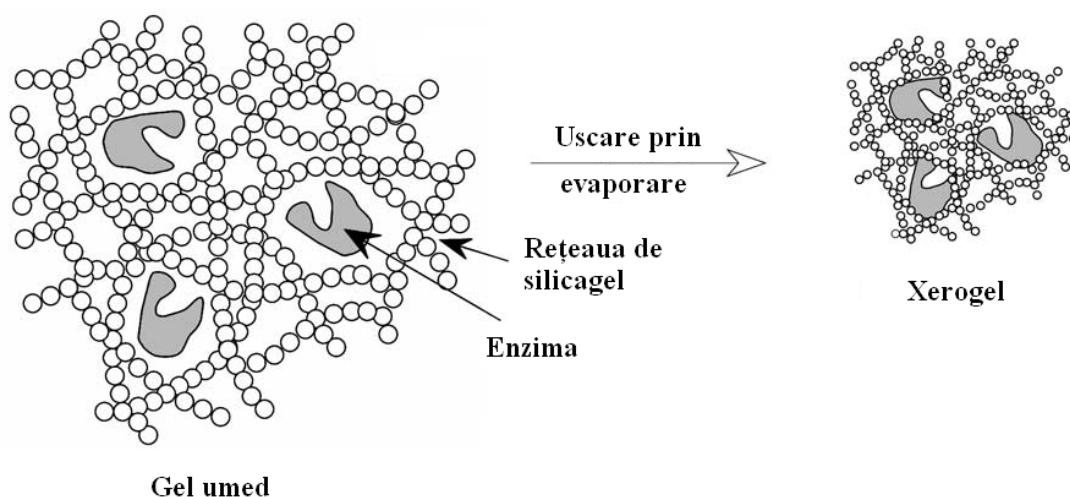


Figura 1.14. Imaginea schematică a unei rețele sol-gel (Xerogel) cu enzima entrapată (Pierre, 2004).

În final, materialul îmbătrânit este uscat, rezultând totodată evaporarea celei mai mari părți din apa interstițială, au loc continuarea reacțiilor de înrețelare din matrice, micșorarea porilor până la 2-20 nm și o contractare globală a materialului cu până la 85% din volumul său inițial. Gelul uscat se numește **xerogel** (Figura 1.14). Xerogelurile sunt materiale interesante datorită porozității lor și ariei mari a suprafeței lor. Ele pot fi de asemenea transformate în ceramică prin sinterizare, ceea ce nu este cazul când matricea de siliciu se folosește pentru entraparea enzimelor sau a altor biomolecule (Jin și Brennan, 2002).

Mecanismul formării sol-gel este foarte complex și numai prima etapă a fost investigată din punct de vedere cinetic. Deși au fost făcute multe simulări pentru a prezice forma solidelor obținute, ele au rămas empirice. A fost demonstrat că o modificare cât de mică a condițiilor experimentale (temperatură, solvent, concentrații, natura și concentrația catalizatorului, cât și a unor factori externi (ultrasonare sau presiune) modifică în mod drastic textura (aria suprafeței specifice, mărimea și distribuția porilor, densitatea, etc.) solidului obținut (Furukawa și colab., 2001; Maury, Buisson și Pierre., 2002; Soares și colab., 2004). Prin urmare este necesar ca protocolul de imobilizare să fie optimizat pentru fiecare aplicație în parte.

1.3.2.3. Tipuri de biocompuși derivați de sol-gel

În funcție de precursorii și aditivii folosiți pot fi preparate sticle anorganice, sticle modificate organic sau materiale nanocompozite organice sau anorganice.

Materialele anorganice sunt în general derivate din tetraetoxisilan (TEOS) sau tetrametoxisilan (TMOS) și ca atare ele pot elibera o mare cantitate de alcool în timpul hidrolizei, care trebuie îndepărtată cel puțin parțial pentru a reduce denaturarea proteinei în timpul entrapării. Această problemă poate fi depășită prin folosirea altor materiale inițiale: silicat de sodiu (Bhatia și colab., 2000) și acid silicic, sau prin folosirea derivaților silanilor cu glicerina ca și precursori ai materialului de sol-gel (Gill și Ballesteros, 1998). Fiecare din acești precursori duce la obținerea unor materialele finale care sunt polare, grele, fragile și transparente din punct de vedere optic.

Totuși materialele prezintă grad înalt de contractare (până la 80%), au diametre mici ale porilor (2-10 nm) și posedă un număr restrâns de posibilități în ceea ce privește morfologia porilor și polaritatea, ceea ce duce la un număr limitat de biomolecule care pot fi entrapate cu succes. Materialele tind de asemenea să aibă o proporție mare de grupări silanol, din care majoritatea sunt deprotonate, ducând la interacțiuni electrostatice fie între silicați și substraturi, fie între silicați și proteinele entrapate. Aceste probleme duc la dificultăți în utilizarea lor în domeniul analitic, cum ar fi:

- timpul de răspuns mare;
- dificultăți în analizarea unor compuși cu încărcare electrică datorită interacțiunilor dintre matrice și compusul analizat;
- posibilitatea unor mecanisme nedorite de retenție în cromatografia de afinitate;
- abateri față de calibrare după o durată mai lungă datorită schimbării proprietăților materialului în timp și dezactivării biomoleculelor entrapate.

Silicații modificați organic (Ormosil), care se obțin prin adăugarea de silani cu grupări funcționale organice la tetraetoxisilan sau tetrametoxisilan duc la o mare varietate de proprietăți ale materialului. Pot fi folosite pentru a conferi materialului proprietăți hidrofile, hidrofobe, ionice, posibilitatea formării de legături de hidrogen sau alte caracteristici (Keeling-Tucker și Brennan, 2001). Asemenea caracteristici pot fi folosite pentru a spori stabilitatea unor anumite proteine, în special proteine hidrofobe și lipofile. De exemplu, lipaza a fost de 88 ori mai activă în silicați modificați organic decât în materiale pure derivate din tetraetoxisilan, datorită deplasării “capacului” ce îi acoperă centrul activ, ca rezultat al asocierii proteinei la interfața dintre fazele hidrofobe și hidrofile (Reetz, Zonta și Simpelkamp, 1996). Alt avantaj al materialelor de tip Ormosil în aplicații analitice este că permit o preconcentrare a compușilor analizați prin metoda extracției pe fază solidă (SPE), ducând la o sensibilitate analitică crescută chiar dacă recuperarea analitului depinde de tăria interacțiunilor dintre matrice și analit, care trebuie să fie controlată cu grijă pentru a evita problemele legate de calibrare. Un potențial dezavantaj al sticlelor organo-silicatică este că prezența grupărilor alchil reduce gradul de înrețelare, ducând la materiale mai puțin robuste. În plus funcțiunea organică poate fi adăugată numai până la un anumit nivel înainte să aibă loc separarea fazelor, determinând transparența optică mai slabă și crăparea materialului. Aplicabilitatea acestor materiale pentru biosenzori este deci limitată.

Materialele nanocompozite constau în general dintr-un precursor de silicat organic sau anorganic în combinație cu aditivi cum ar fi polimeri hidrofobi și hidrofilii, siliconi, surfactanți ionici sau amfoteri, micelii, lipozomi, emulsii, cristale lichide, zaharide, coloranți, specii redox sau materiale de umplură: grafit, silicați fumurii sau cleiuri. În multe cazuri materialele obținute pot fi rigide, semirigide sau flexibile, cu proprietăți hidrofile sau hidrofobe dorite, cu o distribuție a porilor pe un domeniu larg și cu un anumit control asupra proprietăților optice și electrochimice. În plus, materialul poate fi controlat în așa fel încât diferitele faze să fie miscibile sau separate, depinzând de polaritatea și masa moleculară a aditivului, rezultând structuri unice cum ar fi rețelele de polimeri intercalate.

În general materialele nanocompozite oferă funcționalitate sporită sticlelor modificate organic și anorganic, incluzând stabilitate mecanică îmbunătățită, un control electrostatic al suprafețelor, o mai bună biocompatibilitate a speciilor labile, pori mai mari și mai uniformi și un control mai bun asupra polarității materialului. În plus, studiile asupra dinamicii entrapării compușilor fluorofori și a proteinelor indică faptul că adăugarea de polimeri cum ar fi polietilenglicol (PEG), polivinilimidazol (PVI) sau polietilenimină (PEI) poate reduce adsorbția de proteine pe silice, probabil datorită legării preferențiale a silicei cu polimerul și deci oferă o activitate globală mai mare pentru moleculele entrapate (Keeling-Tucker și Brennan, 2001; Chen, Kenausis și Heller, 1998). Asemenea aditivi pot reduce contractarea materialului funcționând ca material de “umplut porii” care previne colapsarea acestora (Wambolt și Saavedra, 1996; Baker, Jordan și Bright, 1998).

1.3.2.4. Factori care influențează activitatea, selectivitatea și stabilitatea enzimelor entrapate

1.3.2.4.1. Silanii precursori

În multe dintre studiile efectuate a fost observată o influență a naturii silanului precursor asupra activității enzimei entrapate în sol-gel.

O lucrare importantă în această privință aparține grupului Reetz (Reetz, Zonta și Simpelkamp, 1995). Ei au pus la punct procedura de încapsulare a lipazelor în silicați modificați organic (Ormosil), preparați prin hidroliza compușilor silanici alchil-substituiți $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$ în prezența enzimei, studiind influența naturii și a raportului molar a acestor silani precursori asupra activității preparatelor obținute.

Astfel de precursori alchilsilanici pot fi: metiltrimetoxisilan (MeTMOS), etiltrimetoxisilan (EtTMOS), propiltrimetoxisilan (PrTMOS), *n*-butiltrimetoxisilan (BTMOS), *i*-butiltrimetoxisilan (*i*-BuTMOS), dimetildimetoxisilan (DMDMOS), trimetilmtoxisilan (TMMOS), polidimetilsiloxan (PDMS). De regulă acești alchilsilani sunt utilizați în combinație cu tetrametoxisilan (TMOS).

Pentru a testa posibilul efect al lungimii lanțului alchil în $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$, lipaza din *Burkholderia cepacia* (Amano PS) a fost imobilizată prin entrapare în sol-gel folosind ca și silani precursori TMOS și $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$ în raport molar de 1:1. A fost observat un “efect alchil” la creșterea activității lipazei în ordinea metil<etil<n-propil<n-butil, obținându-se valori ale activității de peste 100% prin simpla modificare a grupării alchil. Explicația pentru această creștere de activitate poate fi corelată cu creșterea hidrofobității matricei sol-gel prin prezența unor grupe alchil hidrofobe, ce poate declanșa un efect similar cu cel al activării la interfață. Interacțiunile dintre părțile hidrofobe ale gelului și lipază, din timpul procesului sol-gel, pot fixa enzima entrapată în conformație deschisă și astfel în forma sa activă.

Astfel, activitatea și stabilitatea ridicată a lipazei au fost puse pe seama interacțiunilor necovalente dintre matrice și lipază (Figura 1.15): legături de hidrogen, legături ionice și interacțiuni hidrofobe (van der Waals) (Reetz, 1997; Reetz și colab., 2003).

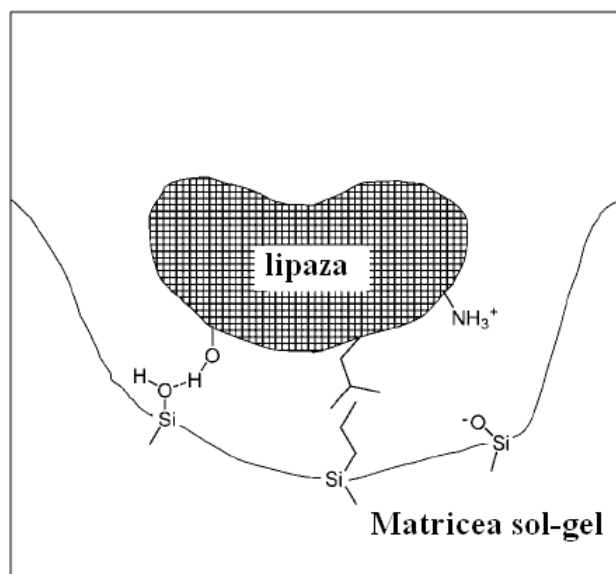


Figura 1.15. Imaginea schematică a interacțiunilor necovalente dintre matricea sol-gel și lipază (Reetz și colab., 2003).

Aceași lipază din *Burkholderia cepacia* a fost imobilizată prin entrapare în sol-gel de Nouredini și colab., utilizând ca și silani precursori TMOS și MeTMOS, BuTMOS sau i-BuTMOS în diferite rapoarte molare (Tabelul 1.7). Pentru testarea activității și a stabilității, preparatele obținute au fost utilizate în reacția de hidroliză a uleiului de soia. În cazul preparatelor cu MeTMOS/TMOS, rezultatele optime au fost obținute la un raport al silanilor precursori de 5,2, 1 ml NaF (catalizator), randamentul de formare a acizilor grași liberi a fost de 24%, iar activitatea relativă la reacția de hidroliză cu lipaza naivă a fost de 55%. Pentru preparatele cu BuTMOS sau i-BuTMOS/TMOS, cele mai bune rezultate au fost obținute la un raport molar de 39, raport apă/silan 10,34:1, randamentul de formare a acizilor grași liberi 55,9-61,2, iar activitatea relativă de 100-110%.

Tabelul 1.7. Condițiile de imobilizare prin entrapare în sol-gel a lipazei din *Burkholderia cepacia* și rezultatele hidrolizei uleiului de soia (Nouredini și colab., 2002).

Silanii precursori	Raport molar al precursorilor	Raport molar apă/silan	NaF (ml)	$\eta_{\text{acizi grași liberi}}$ (%)
MeTMOS/TMOS	2,9	8,12:1	1	8,0
MeTMOS/TMOS	5,2	8,12:1	1	11,0
MeTMOS/TMOS	10,2	8,12:1	1	10,0
MeTMOS/TMOS	5,2	8,12:1	2	6,5
MeTMOS/TMOS	5,2	8,12:1	3	7,0
MeTMOS/TMOS	5,2	9,56:1	3	6,5
MeTMOS/TMOS	5,2	8,12:1	1	24,0
BuTMOS/TMOS	3,9	10,34:1	1	55,9
i-BuTMOS/TMOS	3,9	10,34:1	1	61,2
i-BuTMOS/TMOS	6,2	7,36:1	1	-
i-BuTMOS	-	12,82:1	1	-

1.3.2.4.2. Raportul stoechiometric apă/silan

Un parametru important care influențează activitatea enzimelor încapsulate este raportul stoechiometric apă/silan în amestecul care formează gelul. În cazul lipazelor, la valori mai scăzute ale acestui raport (1-6), activitatea enzimatică a fost scăzută, posibil din cauza agregării lipazei la concentrații ridicate și a dispersiei scăzute în matricea gelului. Pentru lipaza Amano PS din *Burkholderia cepacia* raportul apă/silan cel mai favorabil a fost între 8-10. Un conținut mai ridicat de apă a dus la modificări ale procesului de gelificare, cu cantități tot mai mari de lipază rămânând în faza apoasă (Reetz, Zonta și Simpelkamp, 1996).

1.3.2.4.3. Încărcarea cu enzimă

Un alt parametru important este încărcarea cu enzimă, exprimată ca și cantitatea de enzimă raportată la unitatea de silan utilizat în procesul sol-gel. În primele încercări de entrapare a lipazelor în sol-gel acest parametru nu a fost optimizat, utilizându-se cantități mici de proteină (1-5 mg) raportat la 1 g de silan.

Un studiu realizat de Reetz și colab. pe mai multe lipaze din diferite surse a arătat că prin utilizarea tehnicii de entrapare în sol-gel, în toate cazurile activitățile lipazelor imobilizate în sol-gel au fost mai ridicate decât cele ale enzimelor native disponibile comercial. (Tabelul 1.8). Încărcarea cu enzimă a variat de la 0,2 mg la 80 mg de proteină/g gel obținut. Activitățile au fost determinate pentru hidroliza uleiului de măsline emulsionat (Reetz, Zonta și Simpelkamp, 1996).

Tabelul 1.8. Entraparea lipazelor din diferite surse în sol-geluri hidrofobe hibride derivate din TMOS/ *n*-PrTMOS (1:5) (Reetz, Zonta și Simpelkamp, 1996).

Sursa lipazei	Conținut de proteină (%)	Gradul de imobilizare	Activitate specifică ($\mu\text{moli}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Activitate relativă
<i>Aspergillus niger</i>	91	0,96	5,4	16,4
<i>Candida antarctica</i>	25	0,36	10,5	3,2
Pancreas de porc	11	0,57	7,5	1,1
<i>Penicillium roqueforti</i>	28	0,83	5,6	8,8
<i>Rhizopus arrhizus</i>	26	0,45	1,2	7,1
<i>Rhizomucor miehei</i>	64	0,75	3,1	5,4
SP 523 (Novo)	76	0,91	36,8	87,6

S-a observat că gradul de imobilizare este dependent de cantitatea de proteină imobilizată și prin creșterea încărcării cu enzimă dincolo de o valoare critică s-a obținut o scădere a activității specifice a enzimei. Explicația poate fi legată de limitări difuzionale sau fenomene de agregare a enzimei, ceea ce duce la o dispersie scăzută în matricea gelului. Această valoare critică trebuie determinată pentru fiecare enzimă în condiții specifice (Reetz, Zonta și Simpelkamp, 1996).

1.3.2.4.4. Imobilizarea în prezență de aditivi (compuși de modelare a structurii)

Enzimele imobilizate prin entrapare în sol gel prezintă valori ale activității și stabilității mai bune decât cele ale enzimelor libere. Totuși există câteva probleme care apar în timpul proceselor sol-gel, cum ar fi contractarea gelului în timpul reacției de condensare și a procesului de uscare, iar acestea pot determina denaturarea parțială a enzimei. De asemenea, alcoolul eliberat în timpul reacției de hidroliză poate dezactiva enzima (Avnir și colab., 2006), iar viteza mică de difuzie a substratului în matricea de silice poate reduce activitatea enzimei (Gill și Ballesteros, 1998).

Un mod de a depăși aceste probleme este utilizarea aditivilor cum sunt: zaharurile, aminoacizii, polioli (PEG, PVA), poliamide, poliacriilați, sau proteine ca albumina sau gelatina (Reetz și colab., 2003; Péter și colab., 2005; Brennan și colab., 2003; Lee și colab., 2007, Gupta și Chaudhury, 2007). Au fost studiați și aditivi adiționali cum ar fi eteri coroană (18-coroană-6), derivați de β -ciclodextrină (metil- β -ciclodextrină), săruri (KCl) și surfactanți (Tween 80) (Engbersen și colab., 1996; van Unen și colab., 2002; Griebenow și colab., 1999; Altreuter, Dordick și Clark, 2002; Liu, Xu și Hu, 2000). Acești aditivi au fost folosiți cu succes, obținându-se enzime imobilizate cu activitate, stabilitate și enantioselectivitate crescută.

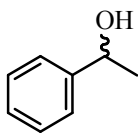
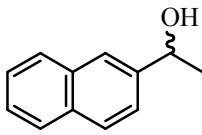
O posibilă explicație a creșterii activității enzimatică poate fi:

- protecția enzimei față de agregare sau de efectele de denaturare ale silanilor utilizați în timpul formării matricei de silice;
- aditivii pot schimba în sens pozitiv unele proprietăți ale gelului ca porozitatea sau diametrul porilor;
- stabilizarea enzimei în timpul reacției în mediu de solvenți organici.

Rezultatele publicate de grupul Reetz demonstrează activități și enantioselectivități ridicate ale lipazelor din *Burkholderia cepacia* și *Pseudomonas fluorescens* entrapate în sol-gel în prezență de aditivi (Reetz și colab., 2003). Precursorii au fost amestecuri de BuTMOS sau *i*-BuTMOS și TMOS în raport de 5:1. PVA și *i*-PrOH au fost utilizați ca aditivi, iar fluorura de sodiu ca și catalizator. Uneori au fost utilizați aditivi adiționali, un eter coroană (18-coroană-6) și un surfactant (Tween 80). Lipazele imobilizate au arătat enantioselectivități mari ($E > 100$) față de substraturi racemice. În tabelul 1.9 sunt prezentate activitățile relative și enantioselectivitățile în reacția de acilare în izooctan a unor alcooli racemici folosind acetat de vinil ca agent de acilare.

De asemenea, a fost arătat că prezența unei cantități mici de *i*-PrOH este favorabilă pentru activitatea lipazei imobilizate (Colton, Ahmed și Kazlauskas, 1995). Pentru lipază rezultate bune au fost obținute și atunci când s-a folosit PVA deoarece efectul de activare a rămas constant la un nivel înalt într-un domeniu larg al concentrației de PVA.

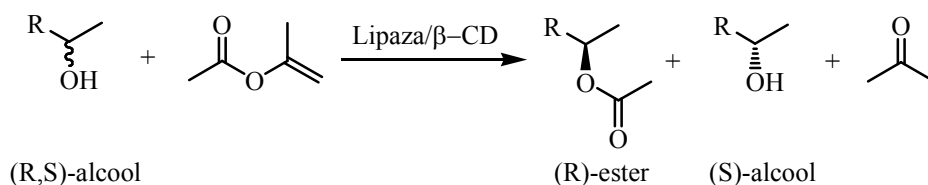
Tabelul 1.9. Rezoluția cinetică a unor alcooli racemici utilizând ca și catalizatori lipazele din *Burkholderia cepacia* (BcL) și *Pseudomonas fluorescens* (Pfl) native și încapsulate în sol-gel (Reetz și colab., 2003).

Substrat	Tipul lipazei	Aditiv	Activitate relativă	E
 solvent: izooctan	BcL (nativă)	-	1	> 100
	BcL (sol-gel)	-	11,1	> 100
	BcL (sol-gel)	18-coroană-6	16,8	> 100
	BcL (sol-gel)	Tween 80	22,2	> 100
	Pfl (nativă)	-	1	> 100
	Pfl (sol-gel)	-	5,3	> 100
	Pfl (sol-gel)	18-coroană-6	26,1	> 100
 solvent: toluen	BcL (nativă)	-	1	> 100
	BcL (sol-gel)	-	22,9	> 100
	BcL (sol-gel)	18-coroană-6	15,1	> 100
	BcL (sol-gel)	Tween 80	15,2	> 100
	Pfl (nativă)	-	1	> 100
	Pfl (sol-gel)	-	2,8	> 100
	Pfl (sol-gel)	18-coroană-6	7,1	> 100

Adăugarea unor aditivi cu masă moleculară mică ca sorbitol sau N-metilglicină, în timpul imobilizării enzimelor în sol-gel, a dus la creșterea stabilității termice și a activității enzimatică a preparatelor obținute datorită modificării hidratării enzimei entrapate și a creșterii dimensiunii porilor matricii sol-gel (Brennan și colab., 2003).

Lipaza din *Candida rugosa* entrapată în sol-gel în prezența PEG a prezentat, comparativ cu lipaza nativă, o modificare a temperaturii optime de la 36°C la 60°C precum și a pH-ului optim de la 7,8 la 6,7. De asemenea, preparatul enzimatic obținut a avut o stabilitate mărită pe intervalul de temperatură 37- 45°C, fiind inactivat abia de la 50-60°C după 7 cicluri de utilizare. Prin păstrarea preparatului la temperatura camerei, abia după 94 de zile activitatea hidrolitică a scăzut la 50% (Soares și colab., 2006).

Ghanem și Schuring au utilizat ciclodextrină ca și aditiv macrociclic la imobilizarea lipazelor în sol-gel în scopul îmbunătățirii vitezei de reacție și a enantioselectivității (E) în reacții de acetilare a unor alcooli secundari racemici cu acetat de izopropenil în solvenți organici (Ghanem și Schurig, 2003), catalizate de lipaza din *Burkholderia cepacia* co-liofilizată cu β-ciclodextrină peracetilată entrapată în sol-gel (Schema 1.4).



Schema 1.4.

Deoarece gradul de activare al enzimei depinde de raportul dintre enzimă și aditiv, au fost investigate trei rapoarte enzimă/ciclodextrină: 1:1; 1:2 și 1:6. Atunci când s-a utilizat la imobilizarea în sol-gel enzimă și β -ciclodextrină peracetilată în raport de 1:6, a fost obținută o activare semnificativă a BcL comparativ cu rezultatele obținute doar cu lipaza liofilizată fără aditiv.

În toate reacțiile de transesterificare urmărite a fost obținută o îmbunătățire a vitezei de reacție și a enantioselectivității E în ordinea raportului BcL/ β -CD 1:6>1:2>1:1. O explicație posibilă ar fi abilitatea ciclodextrinei de a proteja enzima de fenomenele de agregare sau denaturare.

O creștere importantă a activității lipazei din *Candida rugosa* imobilizată prin sol-gel a fost observată în prezența unor săruri cum sunt: LiCl, NaCl și KCl și atribuită îmbunătățirii difuziei enzimei în solventul organic (Ru și colab., 1999).

Utilizarea compușilor șablon pentru formarea materialelor de sol-gel mezoporoase

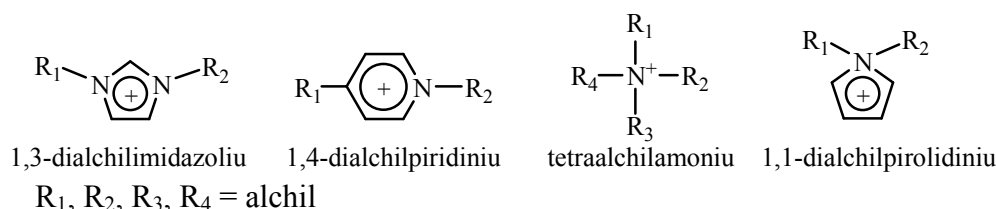
Materialele de sol-gel microporoase tipice, derivate din tetraalcoxisilani, au diametre ale porilor $\leq 15 \text{ \AA}$ și volumul porilor $\leq 0,25 \text{ cm}^3/\text{g}$, iar activitatea catalitică a enzimelor entrapate este micșorată de vitezele de difuzie scăzute ale moleculelor de substrat și accesibilitatea slabă a enzimelor din interiorul materialelor. O altă posibilitate de a depăși această problemă este obținerea de materiale mezoporoase prin matrițarea cu molecule organice netensioactive ca D-glucoză, D-maltoză, acid dibenzoiltartric etc (Wei și colab., 2000). După imobilizare șablonul de glucoză este îndepărtat prin extracție cu apă. Aceste materiale au diametru și volum ale porilor mai mari ($\sim 30 \text{ \AA}$ și respectiv $\sim 0,6 \text{ cm}^3/\text{g}$) și o activitate enzimatică semnificativ mai mare (de 2-10 ori).

Lichide ionice cu rol de aditivi în imobilizările sol-gel

O nouă clasă de aditivi raportată în ultimii ani sunt lichidele ionice, ce pot fi utilizate pentru a îmbunătăți proprietățile gelului, în principal printr-un efect de stabilizare în timpul procesului de imobilizare prin entrapare în sol-gel a lipazelor (Lee și colab., 2007^a).

Lichidele ionice sunt săruri organice alcătuite în totalitate din ioni (Seddon, 1997), nu cristalizează la temperatura camerei (Welton, 1999), sunt nevolatile, neinflamabile, stabile chimic și termic și sunt foarte polare. Au puncte de topire scăzute $< 100^\circ\text{C}$ și rămân lichide până la o temperatură $< 300^\circ\text{C}$. Structurile pentru cele mai utilizate lichide ionice sunt prezentate mai jos (Yang și Pan, 2005).

Cationi:



Anioni:

Anion	Denumire	Abreviere
BF_4^-	tetrafluoroborat	$[\text{BF}_4]$
PF_6^-	hexafluorofosfat	$[\text{PF}_6]$
NO_3^-	nitrat	$[\text{NO}_3]$
CH_3CO_2^-	acetat	$[\text{Ac}]$
CF_3CO_2^-	trifluoroacetat	$[\text{TFA}]$
CH_3SO_4^-	metilsulfat	$[\text{MeSO}_4]$
$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{SO}_4^-$	octilsulfat	$[\text{OcSO}_4]$
$(\text{CN})_2\text{N}^-$	dicianamida	$[\text{DCA}]$
CF_3SO_3^-	trifluorometilsulfonat	$[\text{TfO}]$
$(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$	bis[(trifluorometil)sulfonil] amida	$[\text{Tf}_2\text{N}]$

O proprietate importantă a lichidelor ionice ca și aditivi în procesul de imobilizare în sol-gel o reprezintă insolubilitatea în solvenți organici hidrofobi. De asemenea, lichidele ionice protejează enzima de alcoolul eliberat în timpul procesului sol-gel precum și de efectele contractării gelului în timpul uscării (Lee și colab., 2007^a).

Există câteva explicații posibile pentru activitatea specifică ridicată a enzimelor imobilizate în cazul utilizării de lichide ionice ca și aditivi la imobilizare.

- În timpul reacțiilor de condensare a precursorilor precum și în timpul uscării gelului apare o contractare a acestuia, ceea ce poate cauza denaturarea parțială a enzimei. Lichidele ionice pot proteja stuctura gelului prin umplerea porilor, obținându-se astfel o structură mezoporoasă și foarte ordonată de silice. Deoarece majoritatea lichidelor ionice posedă un capăt hidrofil și un lanț organic hidrofob, în unele studii ele au fost folosite ca și compuși de modelare pentru a obține materiale micro- și mesoporoase (Zhu și colab., 2006). Liu și colab. au arătat că la imobilizarea în sol-gel în prezență de lichid ionic, activitatea peroxidazei din hrean este de 30 de ori mai mare decât atunci când nu s-a utilizat lichid ionic, sugerându-se astfel că lichidele ionice acționează atât ca și compus șablon pentru formarea matricii cât și ca stabilizator, protejând enzima în timpul imobilizării (Liu și colab., 2005).

- Deplasarea capacului elicoidal ce acoperă centrul activ al lipazei co-imobilizată cu lichid ionic duce la valori ridicate ale activității în reacții de hidroliză, atât în mediu apos cât și în mediu de solvenți organici (Chamorro și colab., 1998). A fost arătat că activitatea hidrolitică și de esterificare a lipazei din *Candida rugosa* a crescut odată cu creșterea valorii polarității exprimată prin log P a lichidelor ionice $[\text{Omin}]^+[\text{anion}]^-$ în ordinea: $[\text{BF}_4]^- < [\text{PF}_6]^- < [\text{Tf}_2\text{N}]^-$ (Lee și colab., 2007^a).

- Eliberarea alcoolului în timpul reacțiilor de hidroliză și condensare a precurosilor alcoxidici ce au loc în timpul procesului sol-gel reprezintă un dezavantaj datorită posibilității de denaturare a enzimei entrapate (Avnir și colab., 2006). S-a demonstrat că lichidele ionice pot fi utilizate cu succes ca și stabilizatori pentru a proteja lipaza de inactivarea datorată alcoolului în cursul imobilizării prin metoda sol-gel (Lee și colab., 2007^b).

De exemplu, lipaza din *Candida rugosa* entrapată în sol-gel în prezență de [Emim]BF₄ a prezentat o activitate de 10 ori mai mare decât lipaza imobilizată printr-un protocol de imobilizare fără lichid ionic. Lipazele co-imobilizate cu lichide ionice care conțin ca anion BF₄⁻ au arătat activități semnificativ mărite față de lipazele co-imobilizate cu alte lichide ionice. În mod particular s-a arătat că lichidele ionice care conțin anionul BF₄⁻ sunt bune modele pentru obținerea de silice mezoporoasă (Lee și colab., 2007^b). Un alt grup de cercetători utilizând ca aditiv lichidul ionic [Emim]BF₄, au constatat că formarea legăturilor de hidrogen între BF₄⁻ și gruparea silanică joacă un rol crucial pentru obținerea de silice mezoporoasă (Zhou, Schattka și Antonietti, 2004). Formarea unui număr suficient de legături de hidrogen, după o lungă incubare a precursorilor silanici cu lichide ionice, poate duce la o matrice sol-gel foarte ordonată, ceea ce este benefic pentru activitatea lipazei (Lee și colab., 2007^b).

Structura lichidului ionic poate avea o influență importantă asupra activității lipazei imobilizate. Astfel, imobilizarea lipazei din *Candida rugosa* în prezență de 20 g lichid ionic/ 100 ml TEOS a dus la obținerea de valori ridicate ale activității specifice. Activitatea lipazei co-imobilizate cu lichide ionice care conțin cationi formați din grupări alchil scurte a scăzut după reutilizare, în timp ce lipazele co-imobilizate cu lichide ionice conținând grupări alchil lungi au arătat activitate reziduală mai mare (Lee și colab., 2007^b). Shi și colab. au raportat că lichidele ionice cu dimensiuni moleculare mari, de exemplu, [C₁₀mim]BF₄ sau [C₁₆mim]BF₄, pot fi puternic prinse în nanoporii sol-gelului, pe când cele cu dimensiuni mai mici, cum sunt [Emim]BF₄ și [Bmim]BF₄ ar putea fi complet îndepărtate prin spălare din matricea de silicagel (Shi și colab., 2005).

Preparatele obținute cu lipaza din *Candida rugosa* co-imobilizată cu [Emim]BF₄, respectiv [C₁₆mim]Tf₂N au prezentat cele mai mari valori ale activității specifice și reziduale după reutilizare în reacția de hidroliză a p-nitrofenilbutiratului (Tabelul 1.10). Structura poroasă și ordonată a sol-gel-ului obținut cu [Emim]BF₄ poate fi cauza creșterii activității lipazei.

Tabelul 1.10. Influența structurii lichidelor ionice asupra activității hidrolitice a lipazei din *Candida rugosa* (Lee și colab., 2007^b).

Aditiv (Lichid ionic)	Activitate specifică ($\mu\text{moli}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Activitate relativă	Activitate reziduală (%)
Control (fără aditiv)	8,51	1,0	47,2
[Emim]BF ₄	267,37	31,4	57,1
[C ₁₆ mim]BF ₄	163,39	19,2	76,4
[C ₁₆ mim]Cl	73,02	8,6	62,3
[Emim]PF ₆	5,95	0,7	80,0
[Omim]PF ₆	17,0	2,0	71,4
[Emim]Tf ₂ N	7,66	0,9	80,0
[C ₁₆ mim]Tf ₂ N	39,45	4,6	96,7

Într-un studiu din 2004, Zhou și colab. au raportat că lichidele ionice care conțin anionul BF_4^- ar putea da matrice mesoporoasă foarte ordonată, în timp ce folosirea lichidelor ionice ce conțin Tf_2N^- duce la aerogeluri cu dimensiuni mari ale porilor (Zhou, Schattka și Antonietti, 2004). Pe de altă parte, stabilitatea ridicată (exprimată ca și activitate reziduală după reutilizare) a lipazei immobilizate cu $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Tf}_2\text{N}$ poate fi înțeleasă prin prisma hidrofobicității lichidului ionic (Lee și colab., 2007^a). Se presupune că lichidele ionice hidrofobe ce conțin anionul Tf_2N^- păstrează lipaza flexibilă și conformația activă, în timp ce lichidele ionice hidrofile cu anionul BF_4^- scot moleculele esențiale de apă din enzimă ceea ce duce la o depliere a acesteia.

Conținutul de lichide ionice poate influența activitatea specifică a lipazei immobilizate. Activitățile specifice ale lipazelor co-immobilizate cu $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{BF}_4$, respectiv $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$ au scăzut cu creșterea conținutului de lichide ionice, în timp ce lipaza co-immobilizată cu $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Tf}_2\text{N}$ a avut cea mai mare activitate la un conținut de 30 g lichid ionic/100 ml TEOS (Lee și colab., 2007^b).

Lipazele immobilizate prin metoda sol-gel folosind doar TMOS sau TEOS fără aditivi, în general au avut activități extrem de scăzute, așa cum au arătat Reetz și colab. în cazul esterificării acidului lauric cu octanol în izooctan (Reetz, Zonta și Simpelkamp, 1995). Prin urmare, pentru prepararea matricei hidrofobe au fost utilizați precursorii silanici alchil-substituiți ai acestora, ceea ce a dus la creșterea activității enzimei immobilizate. Când $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Tf}_2\text{N}$ a fost folosit ca aditiv, activitatea hidrolitică a lipazei immobilizate a crescut mult prin folosirea amestecului de TMOS și MeTMOS, în comparație cu lipaza immobilizată doar cu TMOS. Oricum, activitatea hidrolitică a lipazei co-immobilizate cu $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{BF}_4$ a scăzut prin adăugarea MeTMOS. (Lee și colab., 2007^b).

1.3.2.5. Îmbunătățirea proprietăților enzimelor entrapate

1.3.2.5.1. Depunerea pe suport a enzimei entrapate

Stabilitatea termică este esențială pentru aplicațiile sintetice ale enzimelor. Entraparea lipazelor în geluri hibride derivate din metiltrimetoxisilan și tetrametoxisilan a condus la o stabilitate termică mărită. O metodă interesantă de creștere a stabilității termice și a proprietăților catalitice ale enzimelor entrapate în sol-gel este depunerea enzimei entrapate pe un material de suport (Guisan, 2005; Sheldon, 2007). Adsorbția enzimelor pe suporturi anorganice este larg utilizată în biocataliză. Avantajele principale ale immobilizării prin adsorbție sunt tehnica simplă și activitatea inițială înaltă a enzimei immobilizate. În același timp, interacțiunile slabe dintre enzimă și particulele suportului duc la o scădere a activității enzimatică și o stabilitate operațională redusă.

Metoda de entrapare și depunere a fost realizată prin amestecarea complexului coloidal proteină-macromer format în faza inițială de gelificare cu materialul de suport corespunzător, de obicei Celite 545. S-a presupus că acest suport a servit ca mediu dispers pentru a preveni agregarea tridimensională a particulelor fine de gel. Folosind suporturi poroase gelul s-a format în interiorul porilor și enzima a fost mai limitată în porii mai mici, conducând la o suprimare a activității. Folosind Celite 545 un suport practic neporos (kieselguhr), gelul s-a format numai pe suprafața exterioară a materialului și lipaza entrapată a prezentat activitate ridicată.

Aceasta s-ar putea datorată repartizării enzimei pe suprafața specifică mare a suportului, ceea ce asigură un acces mai ușor al substratului la centrul activ al enzimei, scăzând astfel posibilitatea inactivării datorate transferului de masă (Kawakami, 1996; Kawakami și Yoshida, 1996).

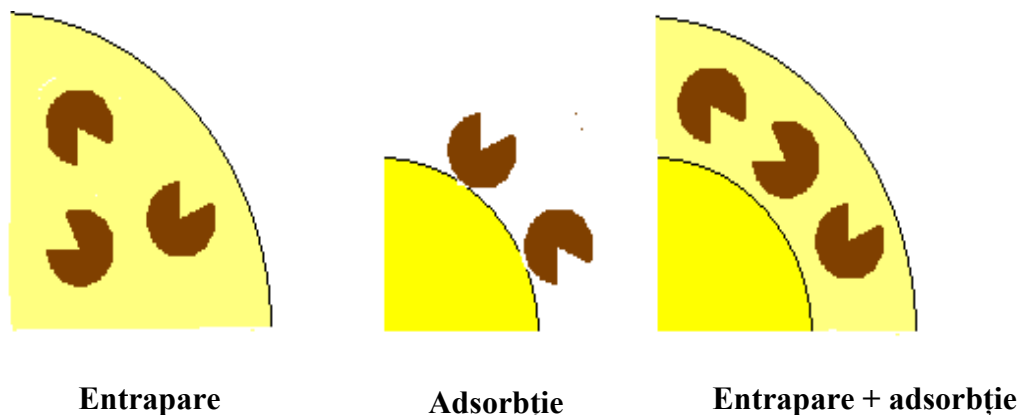


Figura 1.6. Reprezentarea schematică a metodelor de imobilizare prin entrapare, adsorbție și entrapare combinată cu adsorbție

Au fost realizate numeroase studii privind această metodă de entrapare combinată cu adsorbție. În cazul lipazei *Candida cylindracea* entrapată în geluri hibride (derivate din amestecuri echimolare de MeTMOS, PrTMOS sau TMeMOS și TMOS) depuse pe suprafața exterioară a particulelor de pământ de diatomee (kieselguhr), cum este Celite 545, s-a observat o creștere importantă a stabilității termice. Enzima imobilizată prin metoda combinată a fost testată în reacția de esterificare a alcoolului izoamilic cu acidul butiric în n-decan unde s-a dovedit a fi de 100 și respectiv de 200 de ori mai termostabilă la 95°C, decât aceeași enzimă imobilizată doar prin simpla depunere pe Celite 545 (Kawakami și Yoshida, 1996).

Într-un alt studiu, lipaza din *Candida rugosa* a fost imobilizată prin entrapare în sol-gel cu TMOS și diverși alchil-trimetoxisilani (MeTMOS, EtTMOS, PrTMOS, BuTMOS, i-BuTMOS, HexTMOS, HexdlTMOS, OcdlTMOS, DMDMOS, TMeMOS) la raport molar de 1:1 combinată cu depunere pe Celite 545. Preparatele obținute au fost testate în reacția de esterificare a (±)-mentolului cu acid butiric în n-decan la 35°C și 75°C. La ambele temperaturi, s-a observat o creștere a activității de esterificare a preparatelor imobilizate odată cu creșterea lungimii lanțului grupe alchil și a numărului de grupe metil din silanul precursor. Rezultatele cele mai bune au fost obținute atunci când s-au folosit ca și silani precursori TMOS și HexTMOS sau DMDMOS. În ceea ce privește enantioselectivitatea preparatelor de lipază imobilizată, la 35°C nu s-au observat diferențe semnificative. Spre deosebire de acestea la 75°C a avut loc o creștere a raportului enantiomeric odată cu creșterea lungimii lanțului grupe alchil și a numărului de grupe metil din silanul precursor (Furukawa și Kawakami, 1998).

1.3.2.5.2. Bioimprimarea cu analogi de substrat

Bioimprimarea reprezintă un mod promițător de a îmbunătăți proprietățile enzimelor în medii neapoase. Prin acest proces, enzima este adusă în conformația deschisă cu ajutorul moleculelor utilizate pentru bioimprimare (compuși amfilici, analogi de substrat etc.), apoi enzima este prinsă în această conformație prin imobilizare (González-Navarro și Braco, 1997). Ezimele bioimprimare prezintă în medii anhidre o rigiditate conformațională îmbunătățită și o viteză de reacție mărită (Mingarro, Abad și Braco, 1995; Cao și colab., 2009).

O îmbunătățire a activității enzimatică a lipazei din *Candida rugosa* imobilizate prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție, a fost obținută prin bioimprimare cu analogi de substrat: etanol, propanol, butanol, alcool amilic, hexanol, heptanol, octanol, alcool benzilic, ciclohexanol și (-)-mentol. Amestecarea cu compusul șablon a fost efectuată după obținerea gelului și înainte de a introduce suportul solid (Celite 545). A fost observată o creștere a activității preparatelor în reacția de esterificare a (\pm) mentolului cu acid butiric, odată cu creșterea lanțului alchil al alcoolilor folosiți ca și substrat șablon la pretratament. Aceeași tendință a fost remarcată și în cazul utilizării de alcooli având structură ciclică, (-)-mentolul și ciclohexanolul dând cele mai bune rezultate (Furukawa și colab., 2001). S-a presupus că această îmbunătățire a fost determinată de modificarea micromediului din vecinătatea centrului activ datorită interacțiunii hidrofobe dintre analogii de substrat și moleculele de lipază. În plus, acest pretratament a indus creșterea afinității dintre centrul activ al lipazei și moleculele de substrat (Furukawa și colab., 2001; Furukawa și colab., 2002).

Utilizarea substraturilor șablon hidrofobe ca *R*-(-)-2-octanol, *S*-(+)-2-octanol și *S*-(-)- β -citronelol pentru bioimprimarea lipazei din *Rhizopus javanicus* a dus la creșteri selective ale activității în reacția de esterificare a glicidolului racemic cu acid *n*-butiric. Lipaza a fost entrapată în sol-gel cu silani precursori BuTMOS:TMOS în raport molar de 4:1, pretrată cu analogi de substrat și apoi depusă pe Celite 545. Pretratamentul cu un substrat șablon în forma enantiomerului *R* a indus activarea selectivă a reacției de esterificare a *R*-(+)-glicidolului cu acid butiric, iar pretratamentul cu un substrat șablon în forma enantiomerului *S* a activat selectiv esterificarea *S*-(-)-glicidolului.

Pretratamentul cu molecule hidrofobe duce la bioimprimarea eficientă a lipazei imobilizate. Acest lucru este foarte important, întrucât un mare număr de aplicații a catalizei enzimatică au ca scop obținerea de compuși optic activi (Furukawa și colab., 2002).

Bioimprimarea cu analogi de substrat (acizi grași) a lipazei din *Burkholderia cepacia* în cursul procesului de imobilizare în sol-gel a dus la îmbunătățirea activității în reacția de esterificare a acidului lauric cu dodecanol în izooctan. Activitatea specifică a preparatului bioimprimat a fost de 48 de ori mai mare decât a lipazei native și de 2,5 ori mai mare decât a preparatului netratat. De asemenea, preparatul bioimprimat a prezentat o mai bună stabilitate termică, cu păstrarea activității după ce a fost incubat la 60°C pentru 12 ore. Acest studiu a oferit o cale eficientă de a îmbunătăți performanțele lipazei din *Burkholderia cepacia*, un biocatalizator frecvent folosit în aplicații biotehnologice în medii neapoase, prin bioimprimare cu analogi de substrat în procesul de imobilizare în sol-gel (Cao și colab., 2009). În mod particular, bioimprimarea lipazelor mărește aplicarea lor în domenii promițătoare cum sunt cel oleochimic, farmaceutic și bioenergetic (González-Navarro și Braco, 1997; Yilmaz, 2003; Forestia, Alimentib și Ferreira, 2005; Cao și colab., 2009).

1.3.2.5.3. Tratament cu solvenți organici

S-a raportat în literatură că activitatea enzimatică a enzimelor native poate fi îmbunătățită în mod semnificativ prin dispersia acestora în soluții apoase ce conțin solvenți organici polari cum sunt 2-propanolul sau acetona (Goto și colab., 2003; Kim, Lee și Chung, 2000) sau direct, în solvenți organici puri (Matsumoto, Kida și Kondo, 2001).

În cazul enzimelor imobilizate, Chang și Hu au arătat că uscarea enzimelor proaspăt imobilizate în prezența 2-propanolului a îmbunătățit semnificativ activitatea și enantioselectivitatea acestora (Chang și Hu, 2005). Îmbunătățirea proprietăților enzimelor prin tratament cu solvenți organici este în general atribuită modificărilor conformaționale ale enzimei.

Lipazele din *Candida rugosa*, *Mucor javanicus* și *Rhizopus oryzae* imobilizate prin adsorbție pe Amberlite XAD-7 au fost tratate cu 2-pentanol timp de 2 ore la 25°C înainte de liofilizare. Au fost obținute valori ale activității în reacția de esterificare a acidului lauric cu 1-propanol de 1,6-3,4 ori mai mari decât în cazul preparatelor fără tratament cu solvent organic. Pe lângă 2-propanol, au fost de asemenea utilizați acetona, 1-propanol și acetat de etil pentru tratarea lipazei din *Mucor javanicus* imobilizată prin adsorbție pe Amberlite XAD-7. Cei mai buni dintre solvenții organici folosiți s-au dovedit a fi 2-propanolul și acetona. Preparatul enzimatic obținut prin tratare cu acetona timp de o oră și-a păstrat 70% din activitatea inițială când a fost menținut în izooctan timp de 120 de ore la 25°C, spre deosebire de preparatul enzimatic fără tratament care și-a păstrat doar 50% din activitatea inițială. Îmbunătățirea activității și stabilității enzimelor testate, ca rezultat al pretratamentului cu solvenți polari, au fost în principal atribuite modificărilor conformaționale a structurii enzimelor din forma inactivă “închisă” în cea activă “deschisă” (Wu și colab., 2007).

1.3.2.6. Aplicații ale biocatalizatorilor entrapați în sol-gel

Încapsularea compușilor având funcțiune biologică, de exemplu proteine, enzime, anticorpi, antigeni, acizi polinucleici și celule vii în materiale de sol-gel a dus la numeroase aplicații. Cele mai cunoscute includ: obținerea de biosenzori electronici și optici, utilizarea în cromatografia de bioafinitate, extracția în fază solidă, agenți pentru eliberare controlată, biofizică și biocataliză. Dintre acestea se evidențiază două aplicații majore:

- biosenzori optici și electrochimici
- biocatalizatori imobilizați

1.3.2.6.1. Biosenzori optici și electrochimici

Biosenzorii sunt în prezent subiectul unor cercetări intense în scopul dezvoltării de aplicații în numeroase domenii. Flexibilitatea în fabricarea polimerilor împreună cu posibilitățile variate de producție a sol-gelurilor au făcut posibilă construcția unei game variate de biosenzori în fază gazoasă și lichidă (Dave și colab., 1994; Lin și Brown, 1997), care pot fi folosiți pentru determinarea concentrației în soluții a analiților medicali și de mediu, incluzând glucoză, colesterol, uree, acetilcolină, lactat, alcooli etc. (Jil și Ballesteros, 2000; Kumar și colab., 2003; Gupta și Chaudhury, 2007).

1.3.2.6.2. Aplicații biocatalitice

A doua aplicație importantă, care s-a dezvoltat mai încet, dar de mare perspectivă este aceea a biocatalizatorilor imobilizați prin entrapare în sol-gel (Tabelul 1.11). Lucrările inițiale în această domeniu s-au limitat doar la încapsularea hidrolazelor ca tripsina și fosfataza acidă și până în 1995 au fost descrise doar puține aplicații sintetice. Reetz și colab., prin studiile lor asupra încapsulării lipazelor în sol-geluri compozite de tip Ormosil, au fost primii care au stabilit utilitatea practică a biocatalizatorilor imobilizați prin sol-gel (Reetz, Zonta și Simpelkamp, 1995).

Activitatea maximă a multor lipaze, fosfolipaze și cutinaze necesită mutarea unui așa-numit „capac”, care în urma contactului cu o interfață hidrofobă deplasează un segment al structurii terțiare, expunând total centrul de legare și astfel activând enzima față de substratul ei (Gerstein, Lesk și Chothia, 1994). Presupunând că ar fi posibilă folosirea de Ormosil-uri hidrofobe pentru a încapsula și activa lipazele, Reetz și colab. au arătat că o varietate de lipaze pot fi atât activate cât și entrapate în poli(alchilsiloxani) separați ca microfaze, în sol-geluri hibride de poli(alchilsiloxani)-poli(dimetilsiloxani) și în amestecuri Ormosil-magnetite (Reetz, Zonta și Simpelkamp, 1995; Reetz, Zonta și Simpelkamp, 1996; Reetz, 1997; Reetz și colab., 1998; Reetz, Wenkel și Avnir, 2000). De atunci, alte grupuri de cercetători au extins această metodologie pentru obținerea de Ormosil-uri funcționale, hibride, cu umplutură sau cu rețele de întrepătrundere, utilizate pentru imobilizarea lipazelor, fosfolipazelor și cutinazelor. De asemenea o serie de esteraze, serin-, cistein- și metaloproteaze, α - și β -glicozidaze, fosfataze acide și alcaline, fosfolipaze și hidrolaze organo-fosforice au fost cu succes entrapate în hidrogeluri și xerogeluri și utilizate ca biocatalizatori la sinteze de peptide, glicozide, oligozaharide, lipide bioactive (Gill, 2001).

Reacțiile în medii apoase, apoase-organice și în solvenți organici în care au fost folosiți biocatalizatorii astfel imobilizați au fost de hidroliză regio-, chemo-, și enantioselective, esterificare și transesterificare a acizilor carboxilici, a alcoolilor și esterilor, cât și de acilare a aminelor.

Tabelul 1.11 . Exemple de biocatalizatori încapsulați în sol-gel

Enzima sau celula Încapsulată	Tipul matricei sol-gel	Aplicații	Referință
Lipază din <i>Candida rugosa</i>	Poli(alchilsiloxan)	Hidroliza enantioselectivă a esterilor	Jil și Ballesteros, 1998; Reetz, Zonta și Simpelkamp, 1995; Reetz, Zonta și Simpelkamp, 1996; Reetz și colab., 1997; Kuncova și Sivel, 1997; Gill și Ballesteros, 1996
Lipază din <i>Candida antarctica</i>	Poli(alchilsiloxan)-SiO ₂	Esterificări enantioselective în solvenți organici	Jil și Ballesteros, 1998; Reetz, Zonta și Simpelkamp, 1995; Reetz, Zonta și Simpelkamp, 1996; Reetz și colab., 1997; Kuncova și Sivel, 1997; Gill și Ballesteros, 1996
Lipază din <i>Mucor miehei</i>	Poli(alchilsiloxan)-poli(3-aminopropilsiloxan)-SiO ₂	Acilări enantioselective ale aminelor	
Lipază din <i>Burkholderia cepacia</i>	Poli(alchilsiloxan)-Fe ₃ O ₄		
Lipază din <i>Pseudomonas fluorescens</i>			
Lipază din pancreas de porc			
Tripsină	SiO ₂	Hidroliza amidelor de aminoacizi	Shtelzer și colab., 1992
α-Chimotripsină	SiO ₂	Sinteza oligopeptidelor și esterilor de peptide	Jil și Ballesteros, 1998
Subtilizină	SiO ₂ ; ZrO ₂ - SiO ₂	Sinteza dipeptidelor și oligopeptidelor	Jil și Ballesteros, 1998; Ariga și colab., 1996
α-Galactozidază	SiO ₂	Sinteza alchil- și hidroalchil α-galactozidelor	Jil și Ballesteros, 1998
Oxinitrilază din <i>Pseudomonas amygdalus</i>	Siloxane polifuncțional-poli(metilsiloxan)-SiO ₂	Hidrocianarea enantioselectivă ale aldehydelor	Jil și Ballesteros, 1998
Lipoxigenază, tipul I	Poli(metilsiloxan)-SiO ₂ Alginat-SiO ₂	Oxidarea enantio- și regioselectivă a acizilor grași polinesaturați	Jil și Ballesteros, 1998; Wu, Lin și Chan, 1994
Tirozinază	Siloxane polifuncțional-SiO ₂	Sinteza derivaților L-DOPA	Jil și Ballesteros, 1998
Peroxidază din hrean	SiO ₂	Polimerizarea S-oxidativă a fenolilor	Jil și Ballesteros, 1998

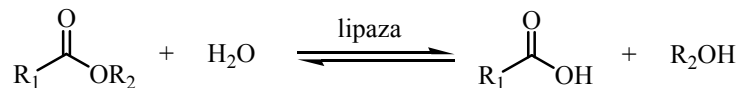
Peroxidază	SiO ₂	S-Oxidarea dibenzotiofenei	Obert și Dave, 1999
Alcool dehidrogenază din ficat de cal	Poli(metilsiloxan)-SiO ₂	Oxidarea enantioselectivă ale alcoolilor	Jil și Ballesteros, 1998
Celule întregi de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SiO ₂ Poli(metilsiloxan)-poli(dimetilsiloxan)-SiO ₂	Producerea fermentativă a etanolului Reducerea enantioselectivă a 3-oxobutanoatului	Jil și Ballesteros, 1998, 114
Celule întregi de <i>Acinetobacter johnsonii</i>	SiO ₂	Îndepărtarea reductivă a nitraților	Campostrini și colab., 1996

1.3.2.7. Biocataliză în mediu de solvenți organici

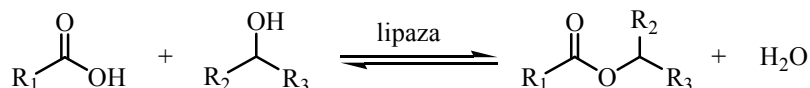
Un exemplu important de enzime imobilizate utilizare pentru biocataliză selectivă este lipazele imobilizate în materiale hidrofobe de sol-gel, derivate dintr-un amestec de precursori alchilsilanici de tipul RSi(OCH₃)₃ și Si(OCH₃)₄.

Lipazele entrapate în sol-gel sunt biocatalizatori excelenți într-o varietate de biotransformări organice sintetice cum ar fi: reacții enantioselective de hidroliză, esterificare și transesterificare în medii apoase-organice, solvenți organici, lichide ionice sau dioxid de carbon supercritic (Reetz, Wenkel și Avnir, 2000; Chen și Lin, 2003, Guisan, 2006).

1. Hidroliza



2. Esterificare

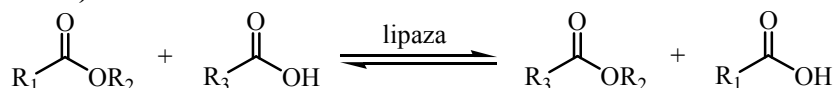


3. Transesterificare

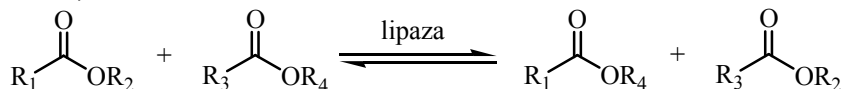
a) alcooliză



b) acidoliză



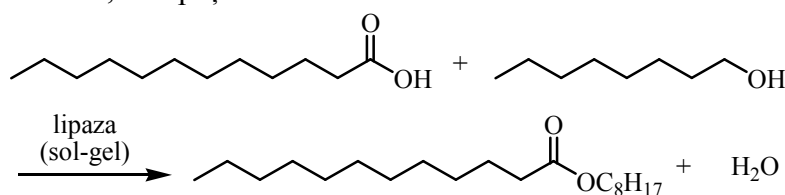
c) interesterificare



Lipazele pot fi utilizate pentru sinteza esterilor din acizi carboxilici și alcooli, iar pentru a deplasa echilibrul spre formarea esterului apa trebuie îndepărtată din sistem folosind site moleculare sau vid. Reacțiile de transesterificare trebuie realizate în mediu anhidru și pot fi împărțite în alcooliză, acidoliză și interesterificare. Dintre acestea, esterificarea și alcooliza utilizează amestecuri racemice de alcooli fiind frecvent folosite în biocataliza cu lipaze pentru obținerea alcoolilor enantiomeric puri. În vederea obținerii de enantioselectivități ridicate în procesele de rezoluție cinetică sunt necesare condiții ce favorizează reacții rapide și ireversibile. Purity optica a produsului obținut și a substratului rămas netransformat în rezoluții cinetice biocatalitice scade pe măsură ce reacția inversă înaintează, datorită naturii reversibile a esterificării și interesterificării precum și enantioselectivității identice a catalizatorului în ambele direcții. Pentru a depăși aceste probleme au fost folosite mai multe strategii în vederea suprimării reversibilității sau menținerii ireversibilității procesului, deși viteza de reacție scăzută rămâne un obstacol în astfel de reacții.

În procesele de transesterificare cei mai utilizați sunt esterii enolici (esterul vinilic sau izopropenilic), deoarece alcoolul vinilic format se transformă printr-o tautomerizare ceto-enolică în compusul carbonilic corespunzător (acetaldehidă sau acetona), făcând reacția practic ireversibilă și mult mai rapidă în comparație cu reacțiile în care se folosesc acizi carboxilici sau esteri simpli ca acetatul de etil. Sensul reacției este dependent și de mediul de reacție folosit (apoi sau organic). Recent, utilizarea lipazelor în medii neapoase s-a extins la fluide supercritice (Matsuda și colab., 2005) și lichide ionice (Freemantle, 2004), care reprezintă noi clase de solvenți ce pot fi personalizați pentru o anumită aplicație. Utilizarea acestor solvenți reduce cantitatea de produși secundari volatili, ceea ce este un pas important în protecția mediului (Ghanem, 2007).

În cercetările inițiale, Reetz și colaboratorii au folosit tehnica de entrapare în sol-gel, ce implică reacția de hidroliză în mediu acid sau bazic a tetraalcoxisilanilor de forma $\text{Si}(\text{OR})_4$, pentru a imobiliza o serie de lipaze. Preparatele obținute cu lipaza din *Burkholderia cepacia* (Amano PS) au prezentat, în reacția de esterificare a acidului lauric cu n-octanol în izooctan (Schema 1.5), activități enzimatic relative dezamăgitor de mici, mai puțin de 5% din activitatea enzimei native.



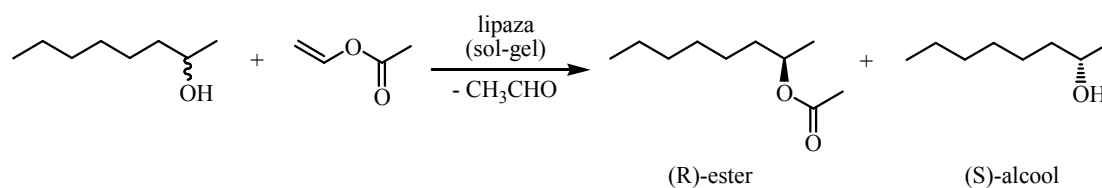
Schema 1.5.

S-a presupus că matricea de SiO_2 ar putea fi prea polară și din acest motiv pentru imobilizare s-a folosit în continuare un amestec de $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$ și alchilsilani de tipul $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$ sau polidimetilsiloxan (PDMS), cu grupări R-alkil nehidrolizabile ($\text{R} = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{n-C}_3\text{H}_7, \text{n-C}_4\text{H}_9, \text{i-C}_4\text{H}_9$), ceea ce a facilitat un tip de activare la interfață a lipazei entrapate. De asemenea, procesul sol-gel a fost realizat în cataliză bazică, folosind NaF ca și catalizator, ceea ce a determinat formarea unei matrici hidrofobe cu pori mari. S-a obținut o creștere a activității relative a lipazei în reacția studiată de 200 până la 800%. În cele mai multe cazuri raportul optim al silanilor precursori $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$ și $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$ s-a dovedit a fi de 5:1 (Reetz M. T., Zonta A., Simpeltkamp, 1996).

Lipazele entrapate în sol-gel sunt foarte stabile și pot fi păstrate la temperatura camerei câteva luni fără o pierdere semnificativă a activității. De exemplu, lipaza din *Burkholderia cepacia* imobilizată în sol-gel cu MeTMOS sau MeTMOS și PDMS a fost utilizată în mod repetat în reacția de esterificare a acidului lauric cu n-octanol în izooctan (Schema 1.5). După ce a stat în amestecul de reacție timp de 23 de ore la 30°C preparatul enzimatic a fost recuperat prin filtrare, spălat cu izooctan sau pentan și reintrodus în reactor, iar în plus la fiecare a 5-a reutilizare a fost spălat cu acetonă. După o ușoară scădere a activității, probabil datorită pierderii lipazei de la suprafața gelului, activitatea enzimatică a rămas constantă la 80-85% din valoarea inițială, pentru cel puțin 30 de cicluri de reutilizare (Reetz M. T., Zonta A., Simpelkamp, 1996).

Într-un alt studiu s-a demonstrat că lipaza din *Rhizomucor miehei* entrapată în sol-gel cu MeTMOS sau MeTMOS și PDMS și-a păstrat 91% din activitatea inițială după depozitare timp de 3 luni în mediu apos. În comparație cu acest preparat, aceeași lipază imobilizată doar prin adsorbție pe rășini schimbătoare de ioni (Lipozyme IM™) și-a menținut doar 6% din activitatea inițială (Reetz M. T., Zonta A., Simpelkamp, 1996).

Progrese semnificative au fost făcute odată cu obținerea unei noi generații de lipaze imobilizate în sol-gel, ce presupune alegerea grupei alchil optime din silanul precursor $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3$ precum și utilizarea aditivilor (18-coroană-6, Tween-80, ciclodextrine, izopropanol și/sau KCl) (Reetz și colab., 2003). Aceasta a deschis calea catalizatorilor eterogeni, mai activi și care prezintă o stabilitate termică și mecanică ridicată, ceea ce face posibilă reciclarea lor. Nouă lipaze de diferite proveniențe (din *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Mucor miehei*, *Aspergillus niger*, *Candida antarctica* B, *Candida rugosa* (tipul VII), *Candida rugosa* (L-3), *Thermomyces lanuginosa*, *Penicillium roqueforti*) au fost imobilizate prin entrapare în sol-gel, toate prezentând proprietăți catalitice îmbunătățite. În unele cazuri a fost realizată și dubla imobilizare prin combinarea metodei de entrapare în sol-gel cu adsorbția pe un suport solid (SIRAN sau Celite), ce a dus la îmbunătățirea activității precum și a stabilității termice și mecanice. De asemenea, entraparea în sol-gel a îmbunătățit și enantioselectivitatea în reacția de rezoluție cinetică a 2-octanolului racemic (Tabelul 1.12 și Schema 1.6) (Reetz și colab., 2003).



Schema 1.6.

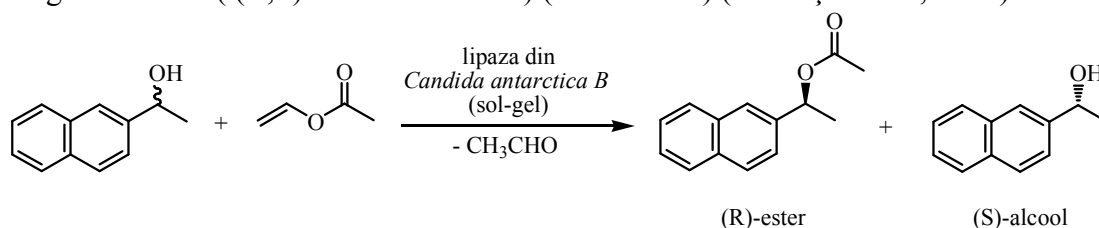
Tabelul 1.12. Rezoluția cinetică a 2-octanolului racemic cu acetat de vinil în izooctan, catalizată de lipazele din *Candida antarctica* B (CaL-B), *Burkholderia cepacia* (BcL) și *Pseudomonas fluorescens* (Pfl) native și încapsulate în sol-gel cu iBuTMOS:TMOS în raport molar de 5:1, cu sau fără aditiv.

Tipul lipazei	Aditiv	Activitate relativă	E
CaL-B (nativă)	-	1	70,1
CaL-B (sol-gel)	-	4,2	> 100
CaL-B (sol-gel)	18-coroană-6	5,1	> 100
BcL (nativă)	-	1	4,4
BcL (sol-gel)	-	5,6	4,1
BcL (sol-gel)	18-coroană-6	18,8	4,0
BcL (sol-gel)	Tween-80	18,3	4,5
Pfl (nativă)	-	1	2,2
Pfl (sol-gel)	-	3,2	3,3
Pfl (sol-gel)	18-coroană-6	18,4	6,0

Din (Tabelul 1.12) se poate observa că dintre cele 3 lipaze testate, CaL-B este de departe cea mai activă și enantioselectivă. Celelalte două lipaze prezintă valori mici ale enantioselectivității, dar se poate observa o îmbunătățire a activității.

Preparatele de CaL-B au fost folosite și într-un studiu de reutilizare în reacția de acilare a 2-octanolului racemic cu acetat de vinil în izooctan. Indicele enantiomeric al preparatelor de lipază entrapate în sol-gel s-a menținut la o valoare de peste 100 în toate cele 20 de reutilizări. Mai mult decât atât, după 20 de cicluri de reacție preparatele immobilizate și-au menținut 70% din activitatea inițială, în timp ce CaL-B nativă doar 40%.

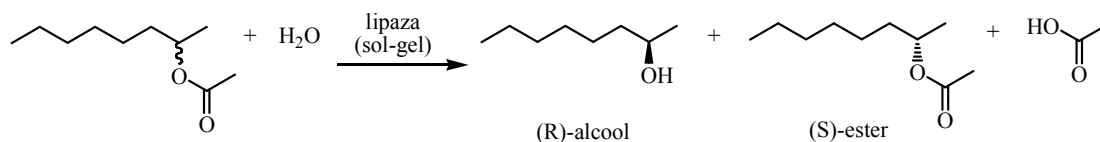
Un alt experiment similar a fost realizat la scală preparativă, unde 250 mg preparat de lipază din CaL-B entrapată în sol-gel a fost suficientă pentru a transforma 10 g de substrat (R,S)-2-naftil-2-etanol (Schema 1.7) (Reetz și colab., 2003).



Schema 1.7.

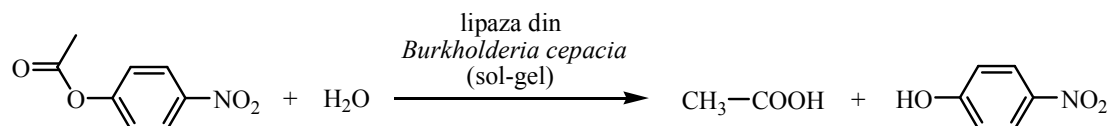
Kato și colaboratorii au realizat immobilizarea lipazelor din *Candida antarctica* SP 525 (SP 525), *Burkholderia cepacia* (Amano PS) și *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) prin entrapare în sol-gel folosind ca și silan precursor viniltriethoxisilanul (VTEOS). Preparatul SP 525 entrapat în VTEOS a prezentat în reacția de hidroliză a acetatului de 2-octil racemic (Schema 1.8) o activitate cu 15-20% mai mare decât preparatul obținut cu aceeași lipază entrapată într-un amestec de PrTMOS și TMOS de 5:1. Acest lucru s-a datorat, cel mai probabil, gelifierii mai lente care nu mai necesita răcirea amestecului pentru compensarea efectului exoterm.

De asemenea, preparatele entrapate cu VTEOS au fost investigate și din punct de vedere al stabilității termice pe intervalul de temperatură 30-90°C în reacția de hidroliză a acetatului de 2-octil racemic (Schema 1.8). Astfel, preparatul SP 525 și-a menținut aproximativ 70% din activitatea inițială după menținerea pentru o oră la 90°C, în timp ce lipaza nativă și-a păstrat doar 5%. În plus, preparatul SP 525 a fost reutilizat de cel puțin 10 ori în reacția de hidroliză a acetatului de 2-octil, cu menținerea activității hidrolitice la 86% din cea inițială (Kato și colab., 2002).



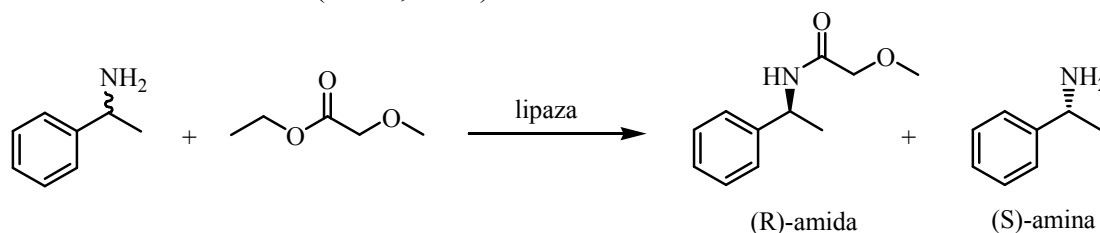
Schema 1.8.

Hidroliza acetatului de 4-nitrofenil (Schema 1.9) a fost catalizată de lipaza din *Burkholderia cepacia* entrapată cu PDMS și MeTMOS în raport molar de 1:3, obținându-se o creștere a activității relative de 200-250% (Reetz, 1997).



Schema 1.9.

Reacția de acilare a 1-feniletilaminei cu acetatul de etil decurge foarte încet, dar specialiștii de la BASF au descoperit că utilizarea ca și agent de acilare a esterului etilic al acidului metoxiacetic duce la o accelerare spectaculoasă a reacției (Schema 1.10). La folosirea lipazei din *Burkholderia plantarii* ca și catalizator, (R)-amida a fost obținută cu o puritate enantiomerică e.e.=93% la o conversie de 52%, în timp ce (S)-amina a fost izolată în stare pură (e.e.=99%) (Balkenhohl și colab., 1997). Valoarea raportului enantiomeric E a fost >100. Preparatul imobilizat obținut prin adsorbție pe Amberlite XAD7a fost reutilizat în reacție de 10 ori cu păstrarea a 80% din activitatea inițială, rezultate ce au dus la intenția BASF de a produce (S)-amina la o scală de 1000 tone/an (Gotor, 2000).



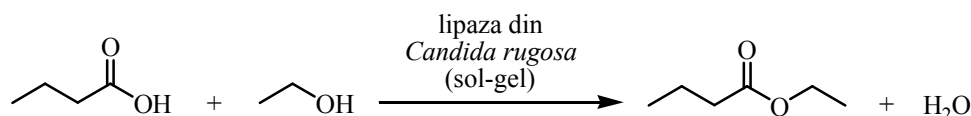
Schema 1.10.

Reetz și colaboratorii au studiat aceeași reacție (Schema 1.10) însă cu lipaza din *Candida antarctica* B. Au observat că atât lipaza nativă cât și cea imobilizată în sol-gel având ca silani precursori iBuTMOS/TMOS, cu sau fără aditiv (18-coroană-6), sunt catalizatori excelenți, conversia de 50% fiind atinsă după 29 de ore, iar valoarea

raportului enantiomeric E a fost > 100 . Aceasta înseamnă că reacția s-a oprit atunci când (R)-amina a fost consumată, ceea ce este ideal.

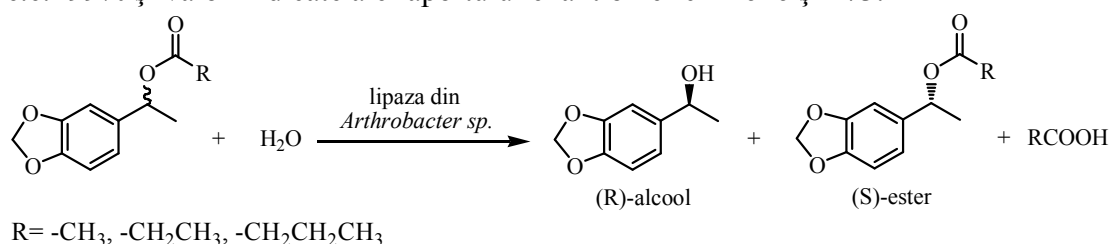
Dintre tipurile de catalizatori studiați, preparatul entrapat în sol-gel cu adaos de aditiv eterul coroană 18-coroană-6 s-a dovedit a fi cel mai activ. Acesta a fost evaluat și într-un studiu de reutilizare, observându-se o bună stabilitate în ceea ce privește activitatea și enantioselectivitatea sa după 5 reutilizări (Reetz, 2003).

Chen și Lin au testat diferite preparate obținute prin imobilizarea lipazei din *Candida rugosa* în sol-geluri pe bază de TMOS și alchiltrimetoxilani, în reacția de esterificare dintre acidul butiric cu etanol în n-hexan (Schema 1.11). Condițiile optime pentru imobilizarea lipazei au fost silanii precursori PrTMOS și TMOS la un raport molar de 4:1, raport molar apă/silan=24, încărcare cu enzimă 6,25% și utilizare ca aditiv a 1 mg PVA/ g lipază. Procentul de proteină imobilizată a fost de 95%, iar activitatea specifică a preparatului obținut a fost de 59 de ori mai mare decât a lipazei native (Chen și Lin, 2003).

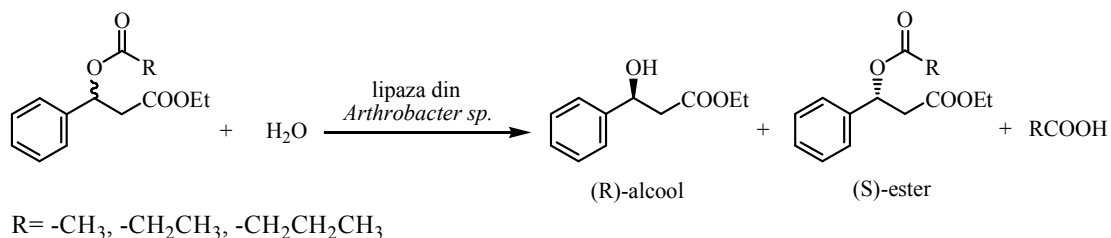


Schema 1.11.

Lipaza din *Arthrobacter sp.* (ABL) imobilizată prin entrapare în sol-gel cu TEOS a fost testată în rezoluția cinetică a unor esteri aromatici derivați de 1-feniletanol (Schema 1.12) și a unor intermediari ai medicamentului antidepresiv fluoxetine (Schema 1.13) în soluție tampon fosfat 0,1 M de pH=7 la 25°C. Așa cum se poate observa din (Tabelul 1.13), în ambele cazuri, rezoluția cinetică a intermediarilor studiați catalizată de lipaza ABL a dus la obținerea (R)-alcoolului cu puritate optică e.e.=99% și valori ridicate ale raportului enantiomeric E=646 și 473.

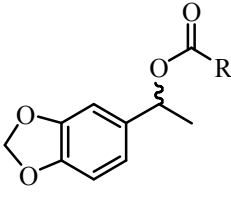
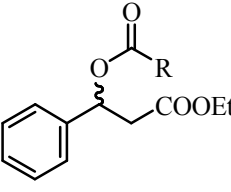


Schema 1.12.



Schema 1.13.

Tabelul 1.13. Rezoluția cinetică a unor intermediari catalizați de lipaza din *Arthrobacter sp.* (ABL) nativă sau entrapată în sol-gel.

Substratul	Enzima	Timp de reacție (ore)	R	Conversia (%)	e.e. produs (%)	E
	ABL nativă	6	CH ₃	30	96	73
			C ₂ H ₅	46	94	79
			C ₃ H ₇	49	94	100
	ABL sol-gel	6	CH ₃	30	99	302
			C ₂ H ₅	34	99	331
			C ₃ H ₇	48	99	646
	ABL nativă	21	CH ₃	29	94	47
			C ₂ H ₅	33	93	43
			C ₃ H ₇	35	93	45
	ABL sol-gel	21	CH ₃	29	99	296
			C ₂ H ₅	44	99	473
			C ₃ H ₇	44	99	473

S-a studiat și stabilitatea lipazei din *Arthrobacter sp.* (ABL) entrapată în sol-gel în diverși solvenți organici. Astfel, în hexan după o oră de incubare și-a menținut integral activitatea, după 6 ore și-a păstrat 90% din activitatea inițială, după 12 ore 85%, iar după 24 de ore 80%. În toluen, după 6 ore și-a păstrat 80% din activitate, după 12 ore 75%, iar după 48 de ore 65%. În cloroform, după 48 de ore și-a menținut 20% din activitatea inițială.

La reutilizarea preparatului de ABL entrapat, acesta și-a menținut activitatea reziduală la 78-83% pe parcursul a 12 reutilizări a câte 30 de minute fiecare (Chaubey și colab., 2006).

1.3.2.8. Biocataliză în mediu de lichide ionice

Reacțiile enzimaticе în lichide ionice reprezintă o alternativă promițătoare pentru solvenții organici, în domeniul de cercetare al biocatalizei în medii neconvenționale. Solvenții organici sunt de obicei lichide volatile, care se evaporă în atmosferă cu efecte negative asupra mediului și a sănătății umane. Prin urmare, este nevoie să se găsească noi alternative pentru mediile de reacție utilizate în biotransformările catalizate de enzime (van Rantwijk, Madeira-Lau și Sheldon, 2003, Guisan, 2006).

Spre deosebire de solvenții organici obișnuiți, lichidele ionice pot fi "croite" pe o anumită aplicație prin simpla modificare a cationului sau a anionului, demonstrând astfel un potențial extraordinar pentru biocataliza enzimatică în mediu neapos. (Park și Kazlauskas, 2003). Folosirea lichidelor ionice ca mediu de reacție pentru sintezele organice este bine documentată (Wasserscheid și Keim, 2000; Sheldon, 2001; Wasserscheid și Welton, 2002; Kragl, Eckstein și Kaftzik, 2002; van Rantwijk, Madeira-Lau și Sheldon, 2003; Park și Kazlauskas, 2003; De los Ríos și colab., 2007) și sinteza lor a fost publicată în numeroase review-uri (Welton, 1999; Wasserscheid și Keim, 2000; Wasserscheid și Welton, 2003; Yang și Pan, 2005; Bogel-Lukasik, 2007).

Biocataliza în lichide ionice a fost luată în considerare doar de câțiva ani, prima lucrare în acest sens a fost publicată în anul 2000 (Erbeldinger, Mesiano și Russel, 2000) și tot atunci a apărut și prima lucrare de biocataliză cu lipaze (Lau și colab., 2000).

Principalele lichide ionice care se utilizează sunt alcătuite dintr-un cation organic de tip (1,3-dialchilimidazol, N-alchilpiridiniu, tatraalchilamoniu sau tetraalchilfosfoniu) și un anion necoordinativ (BF_4^- , PF_6^- , SbF_6^- , CH_3COO^- , CF_3CO_2^- , CF_3COO^- , CF_3SO_3^- și $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$). Lichidele ionice au vâscozitate ridicată, presiune de vapori neglijabilă, o excelentă stabilitate termică (până la 300°C în multe cazuri), posibilitatea de a dizolva o mare varietate de solvenți organici și anorganici, incluzând gaze (H_2O , CO_2 , CO), sunt neinflamabile și prezintă o bună conductivitate electrică. Pe lângă aceste proprietăți, polaritatea, hidrofilicitatea/hidrofobicitatea și solubilitatea lor în solvenții organici pot fi modificate prin alegerea cationului și a anionului adecvat (Tabelul 1.14).

Lichidele ionice pot fi astfel croite pentru a fi miscibile sau nemiscibile cu apa sau unii solvenți organici (hexan, benzen, eter, *i*-PrOH, etc.), devenind astfel utile în recuperarea produșilor din amestecul de reacție (Poole, 2004).

Tabelul 1.14. Proprietățile fizice ale unor lichide ionice (Guisan, 2006)

Cation	Anion	t_{topire} (°C)	Densitate la 20 °C (g/ml)	Vâscozitate la 20 °C (cSt)	Solubilitate				
					H_2O	CH_3CN	<i>i</i> PrOH	Hexan	Toluen
Mmim	MeSO_4	-	1,33	70					
Emim	BF_4	15	1,34	113	+	+	-	-	-
Bmim	BF_4	-71	1,21	120	+	+	-	-	-
Hmim	BF_4	-82	1,15	195	±	+	+	-	-
Emim	PF_6	60	Solid	Solid	+	+	-	-	-
Bmim	PF_6	12	1,38	281	-	+	-	-	-
Hmim	PF_6	-74	1,29	548	-	+	-	-	-
Emim	NTf_2	-3	1,52	145	-	+	-	-	-
Bmim	NTf_2	-16	1,43	256	-	+	-	-	-

+ total miscibil; - nemiscibil; ± parțial miscibil

Vâscozitatea ridicată este o proprietate inerentă a lichidelor ionice datorată forțelor intermoleculare puternice de tip ion-ion, dar și interacțiunilor slabe cum sunt forțele van der Waals. Interacțiunile de tip ion-ion sunt inerente în lichidele ionice, dar prin micșorarea suprafeței moleculelor pentru reducerea interacțiunilor van der Waals se poate scădea ușor vâscozitatea. Similar, lichidele ionice cu grupare alchil mai scurtă în moleculă sunt mai puțin vâscoase decât cele care au gruparea alchil mai lungă. Adăugând co-solvenți organici vâscozitatea lichidelor ionice scade, dar odată cu aceasta se anulează multe dintre avantajele utilizării lichidelor ionice (Park și Kazlauskas, 2003).

Activitatea și stabilitatea enzimelor în lichide ionice

Deși solvenții organici polari inactivează enzimele (Park și Kazlauskas, 2001; Chin, Wheeler și Klivanov, 1994), în mod surprinzător lichidele ionice nu au un asemenea efect, permițând astfel reacțiilor catalizate de enzime să aibă loc pe un domeniu mai larg de polaritate al solventului. Posibilitatea de a folosi solvenți cu polaritate ridicată face ca solubilitatea substraturilor polare (cum sunt glucoza, maltoza sau acidul ascorbic) să crească rezultând viteze de reacție mai mari și îmbunătățiri ale selectivității (Park și Kazlauskas, 2001; Park și colab., 2003). De exemplu, la acilarea acidului ascorbic cu acid oleic în [2Pentmim]BF₄, catalizată de CaL-B, conversia a fost mai ridicată (83%) în comparație cu rezultatele tipice în solvenți organici (50%) (Park și colab., 2003). Această îmbunătățire rezultă din solubilitatea mai ridicată a acidului ascorbic în lichidul ionic. Un alt exemplu este sinteza N-acetilactozaminei, unde prin adaosul a 25% [Mmim]MeSO₄ a fost împiedicată hidroliza produsului (N-acetilactozamina), iar randamentul a crescut de la 30% în soluție tampon la 58% în amestec tampon-lichid ionic.

Enzimele active catalitic nu se dizolvă în lichide ionice ci rămân suspendate ca o pudră. Atunci când totuși se dizolvă ele sunt inactivate; de exemplu, [Bmim]PF₆ a dizolvat 3,2 mg/mL de termolizina (Erbeldinger, Mesiano și Russell, 2000), care a fost inactivată, dar în concentrație mai mare, termolizina suspendată a prezentat activitate catalitică. Alte exemple de lichide ionice care au dizolvat și dezactivat CaL-B sunt: [Bmim]NO₃, [Bmim]lactat sau [Emim]EtSO₄. (Sheldon și colab., 2002).

Deși scala de polaritate Reichardt este un mod util de a compara solvenții organici, o comparație mai detaliată ar putea necesita parametri multipli. De exemplu, [Bmim]PF₆, [Bmim]Tf₂N și [Bmim]BF₄ sunt similari pe scala de polaritate Reichardt, dar diferă semnificativ prin solubilitatea lor în apă: [Bmim]PF₆ și [Bmim]Tf₂N sunt doar ușor solubile în apă (0,13% volum și respectiv 1,4% masă), în timp ce [Bmim]BF₄ este complet miscibil cu apa.

Hidrolazele și oxidoreductazele își păstrează activitatea când sunt suspendate în lichide ionice. Inițial cercetările s-au concentrat asupra hidrolazelor cum sunt proteazele și lipazele, întrucât acestea sunt enzimele folosite cel mai mult în biocataliză. Mai târziu, cercetările s-au extins și asupra unor oxidoreductaze ca peroxidazele și dehidrogenazele. Se pare că enzimele care sunt active în solvenți organici vor funcționa și în lichide ionice.

Nu toate lichidele ionice sunt potrivite pentru biocataliză. Enzimele sunt de obicei active în lichide ionice ce conțin ca anioni BF₄, PF₆ și Tf₂N, dar nu și în Cl, NO₃, CF₃SO₃, trifluoroacetat sau acetat (Kaar și colab., 2003). O posibilă explicație pentru această diferență este bazicitatea scăzută a legăturii de hidrogen enzimă – anion compatibil. Anionul BF₄ își distribuie sarcina negativă asupra a 4 atomi de fluor, anionul PF₆ asupra a 6 atomi de fluor și Tf₂N asupra a 5 atomi. Bazicitatea scăzută a legăturii de hidrogen minimizează interferența cu legăturile de hidrogen interne ale unei enzime. Potrivit acestui concept, enzimele sunt inactivate în [Bmim]Cl (lichid la 65°C), la care bazicitatea legăturii de hidrogen este ridicată (Anderson și colab., 2005).

Imposibilitatea de a utiliza anioni cu bazicitatea legăturii de hidrogen ridicată poate limita unele aplicații. De exemplu, celuloza se dizolvă până la 25% în [Bmim]Cl, dar nu și în [Bmim]BF₄ sau [Bmim]PF₆ (Swatloski și colab., 2002). Soluția pentru rezolvarea problemei de solubilitate este formarea legăturilor de hidrogen între celuloză și clorură pentru a compensa ruperea legăturilor de hidrogen puternice din celuloză.

Alți solvenți care dizolvă celuloza (clorura de litiu / soluție de N,N-dimetilacetamidă) formează de asemenea legături de hidrogen puternice cu aceasta. Este imposibil de găsit un solvent care să mențină atât activitatea enzimei, dar în același timp să dizolve și celuloza.

Mai multe grupuri de cercetători au raportat nu numai creșterea activității enzimei, dar și o creștere a stabilității ei în lichide ionice în comparație cu solvenții organici (Matsuda, 2007). De exemplu, α -chymotripsina (Lozano și colab., 2001^a), CaL-B (Lozano și colab., 2001^b), și esteraza din *Bacillus stearothermophilus* (Persson și Bornscheuer, 2003) sunt de 17, 3 și respectiv 30 de ori mai stabile în lichide ionice decât în solvenți organici.

În unele cazuri lipazele și proteazele sunt mult mai enantioselective în lichide ionice decât în solvenți organici (Kim și colab., 2001; Schöfer și colab., 2001; Zhao și Malhotra, 2002). În alte cazuri, nu s-a observat nici o schimbare a enantioselectivității (Park și Kazlauskas, 2001; Persson și Bornscheuer, 2003) sau chiar s-a raportat o scădere a acesteia de 1,5 până la de 4,4 ori (Itoth și colab., 2001^b).

Cum lichidele ionice nu sunt volatile, se poate utiliza vidul pentru a îndepărta produșii volatili ca alcoolul sau apa, deplasând echilibrul în sensul formării produsului. De exemplu, Itoh și colaboratorii au îndepărtat metanolul de la transesterificarea unui alcool secundar catalizată de CaL-B, folosind metil esterul ca donor acil (Itoh și colab., 2001^c). Similar, pervaporizarea (permeație prin membrană și apoi vaporizare) a fost utilizată pentru a îndepărta apa formată la esterificarea acidului 2-cloropropionic cu butanol, catalizată de lipaza din *Candida rugosa* (Bélafi-Bako', Dörmo și Gubicza, 2002).

Reacții biocatalitice cu lipaze în mediu de lichid ionic

Enzimele de diverse tipuri sunt active catalitic în lichide ionice sau sisteme bifazice apă-lichid ionic (Tabelul 1.15). Lipazele, în special, își mențin activitatea în mediu de lichid ionic anhidru, iar enantioselectivitatea și stabilitatea sunt adesea mai bune decât în solvenții tradiționali. Proprietățile neconvenționale de solvent ale lichidelor ionice au fost exploatate la reutilizarea biocatalizatorului și recuperarea produsului, în condiții mai avantajoase decât în sistemele clasice de solvenți.

Tabelul 1.15. Exemple de reacții biocatalitice în mediu de lichid ionic (Kragl, Eckstein și Kaftzik, 2002)

Biocatalizator	Lichid ionic	Reacția	Referință
Termolizina	[Bmim]PF ₆	Sinteza Z-aspartamului	Erbeldinger, Mesiano și Russel, 2000
α -Chymotripsina	[Omim]PF ₆	Transesterificarea esterului etilic al N-acetil-L-fenilalaninei cu 1-propanol	Laszlo și Compton, 2001
	[Bmim]PF ₆		
	[Emim]BF ₄	Transesterificarea N-acetil-L-tirozinetilesterului cu 1-propanol	Lozano și colab., 2001 ^a
	[Bmim]PF ₆		
	[Bmim]BF ₄		

Alcool dehidrogenaza	[Bmim]Tf ₂ N	Reducerea enantioselectivă a 2-octanonei	Eckstein și colab., 2004
Esteraza din <i>Bacillus stearothermophilus</i>	[Bmim]PF ₆	Transesterificare	Persson și Bornscheuer, 2003
β-galactozidaze	[Mmim]MeSO ₄ -H ₂ O (25:75)	Sinteza N-acetilactozaminei	Kaftzik, Wasserscheid și Kragl, 2002
Peroxidaze	[Bmim]PF ₆	Oxidarea 2-metoxifenolului (guaiacol)	Laszlo și Compton, 2002
Lacaza C din specia <i>Trametes</i>	[Bmim]PF ₆	Oxidarea antracenei	Hinckley și colab., 2002
Format dehidrogenaza	[Mmim]MeSO ₄ -H ₂ O (25:75)	Regenerarea NADH	Kaftzik, Wasserscheid și Kragl 2002
Celule întregi din drojdie	[Bmim]PF ₆ -H ₂ O (10:1)	Reducerea enantioselectivă a cetonelor	Howarth, James și Dai, 2001
Celule din kefir <i>Lactobacillus</i>	[Bmim]PF ₆ [Bmim]Tf ₂ N	Reducerea asimetrică a 4-cloroacetofenonei la (R)-1-(4-clorofenil)etanolului	Pfruender și colab., 2004
Lipaza din <i>Candida antarctica</i> B	[Bmim]PF ₆	Alcooliză, amonioliză, perhidroliză	Lau și colab., 2000
	[Bmim]BF ₄		
	[Emim]PF ₆	Rezoluția cinetică a alcoolilor secundari	Kim și colab., 2001
	[Bmim]PF ₆		
	[Emim]BF ₄	Sinteza butiratului de butil prin transesterificare	Lozano și colab., 2001 ^b
	[Bmim]Tf ₂ N		
	[Bmim]PF ₆		
	[Emim]Tf ₂ N		
	[Emim]Tf ₂ N	Rezoluția cinetică a feniletanolului în prezența CO ₂ supercritic	Lozano și colab., 2002
[Bmim]Tf ₂ N			
[Bmim]Tf ₂ N	Esterificarea n-octanolului în prezența CO ₂ supercritic	Reetz și colab., 2002	
Lipazele din <i>Candida antarctica</i> B, <i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Candida rugosa</i> și din pancreas de porc	[Bmim]PF ₆	Rezoluția cinetică a alcoolilor alilici	Itoh și colab., 2001 ^a
	[Bmim]TfO		
	[Bmim]BF ₄		
	[Bmim]Tf ₂ N		
Lipaza din <i>Pseudomonas fluorescens</i> AK	[Bmim]PF ₆ [Bmim]BF ₄	Rezoluția cinetică a hidroximetanonofosfinaților chirali	Kielbasinski și colab., 2002

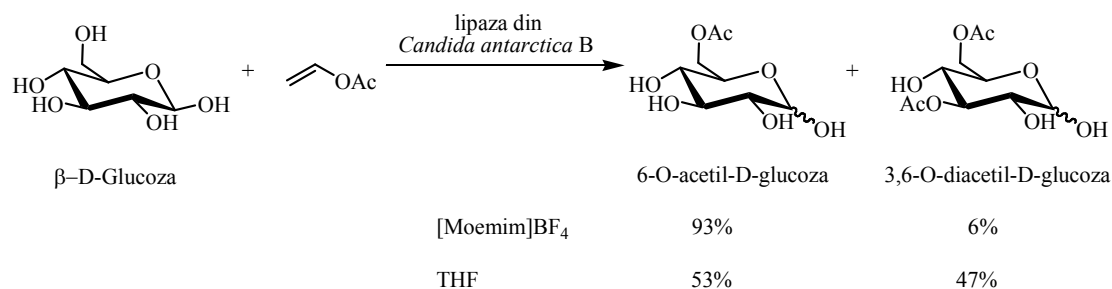
Prima biotransformare reușită în mediu de lichid ionic a fost sinteza Z-aspartamului catalizată de termolizina într-un lichid ionic hidrofob, [Bmim]PF₆.

Lipazele, cunoscute pentru buna lor toleranță față de solvenții organici, sunt cu siguranță candidații principali pentru biocataliza în mediu de lichid ionic. Într-adevăr, lipaze microbiene cum sunt *CaL-B* (Lau și colab., 2000; Husum și colab., 2001) și *BcL* (Kim și colab., 2001; Park și Kazlauskas, 2001) au prezentat activitate în lichide ionice cu parte cationică de 1-alkil-3-metilimidazoliu și 1-alkil-piridiniu în combinație cu anioni cum ar fi tetrafluoroboratul, hexafluorofosfatul și bis (trifluorometansulfonil)imida.

Biotransformările cu lipaze cuprind o gamă largă de reacții solvolitice ale grupării carboxil, cum sunt esterificarea, transesterificarea (alcooliza), perhidroliza și amonoliza (sinteza amidelor) (Schmidt și Verger, 1998). Transesterificarea și sinteza amidelor sunt realizate de preferință în mediu anhidru pentru a suprima reacțiile hidrolitice secundare nedorite. Lipaza *CaL-B*, care tolerează cu ușurință asemenea condiții (Anderson, Larsson și Kirk, 1998; Lau și colab., 2000; Kirk și Christensen, 2002), precum și *BcL*, au fost folosite ca și biocatalizatori în aceste reacții (Bornscheuer și Kazlauskas, 1999).

O atenție deosebită a fost acordată reacției de transesterificare catalizată de lipaze cu obținere de poliesteri (care înlocuiește polimerizarea chimică clasică ce are loc la > 200°C). Astfel, *CaL-B* a catalizat sinteza poliesterilor în lichidele ionice [Bmim]BF₄ sau [Bmim]PF₆ la 60°C (Uyama, Takamoto și Kobayashi, 2002).

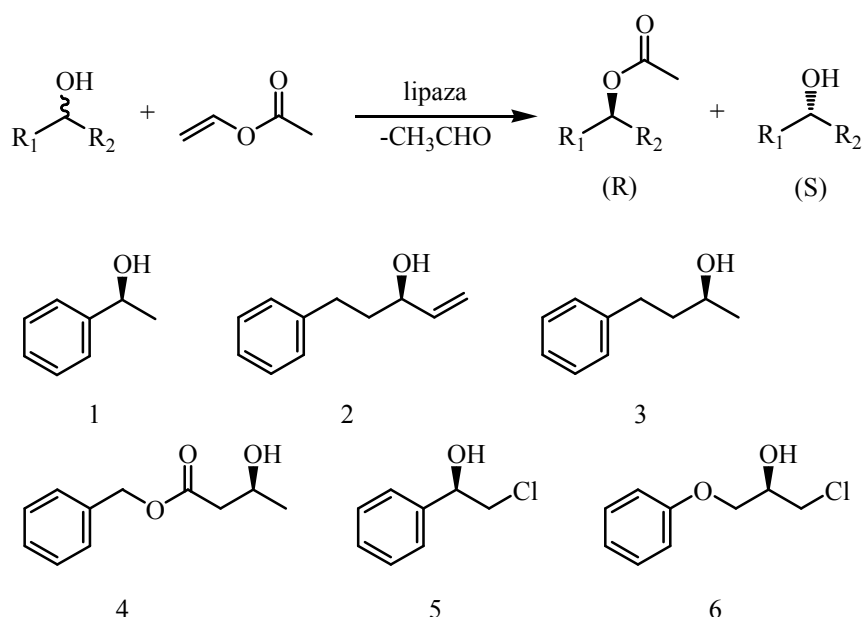
În solvenții tradiționali, esterificarea carbohidraților catalizată de lipaze este împiedicată de solubilitatea lor scăzută în mediul de reacție, iar produsul monoacilat va avea tendința de a se acila mai departe la diester, fiind mai solubil decât compusul inițial. Prin contrast, acilarea regioselectivă a glucozei catalizată de *CaL-B* în lichidul ionic [Emim]BF₄ a fost complet selectivă (Schema 1.14). Reacția a devenit mult mai rapidă în [Moemim]BF₄, în care 5 g/l de glucoză se dizolvă la 55°C, de 100 de ori mai mult decât în acetonă (Park și Kazlauskas, 2001).



Schema 1.14.

Maltoza a fost de asemenea acilată în prezența *CaL-B* utilizând ca mediu de reacție [Moemim]BF₄. Studii recente au arătat că până la 10 % celuloză s-a dizolvat în [Bmim]Cl la 100°C (Swatloski și colab., 2002), indicând că lichidele ionice ar putea rezolva incompatibilitățile lipazelor și carbohidraților în ce privește mediul de reacție.

Rezoluția alcoolilor chirali prin acilare enantioselectivă catalizată de lipaze este una dintre aplicațiile industriale majore ale lipazelor (Schmidt, 2001). Prin urmare, numeroși cercetători au investigat efectele lichidului ionic ca mediu de reacție la acilarea arilalcanolilor 1-6 cu acetat de vinil, catalizată de *CaL-B* sau *BcL* (Schema 1.15) (Schöfer, Kaftzik și Wasserscheid, 2001; Kim și colab., 2001; Park și Kazlauskas, 2001; Itoh și colab., 2001^a).



Schema 1.15.

Alcoolii studiați au fost acilați cu enantioselectivități ridicate și în mediu de solvenți convenționali, deci nu a fost loc de prea multe îmbunătățiri. Totuși, raportul enantiomeric (E) al unora dintre aceste reacții a fost considerabil îmbunătățit când mediul de reacție a fost un lichid ionic (Swatloski și colab., 2002). Astfel, rezoluția enantioselectivă a compusului 1 de către BcL, care a fost slabă în metil *tert*-butil eter (MTBE), a devenit aproape cantitativă în [Bmim]TfO sau [Bmim]Tf₂N. Chiar și rezoluțiile excelente ale compușilor 3-6 au fost îmbunătățite în mediu de lichid ionic (Schöfer, Kaftzik și Wasserscheid, 2001).

Faptul că lichidele ionice, ca de exemplu [Bmim]PF₆, nu se amestecă cu eter a fost folosit în mod avantajos pentru extragerea produșilor și reactantului netransformat din amestecul de transesterificare al compusului 2. Lipaza a rămas suspendată în faza de lichid ionic și a putut fi recuperată (Itoh și colab., 2001^a). S-a observat însă o pierdere de activitate care a fost atribuită acumulării oligomerilor acetaldehidei (inhibitori) în faza de lichid ionic (Itoh, Akasaki și Nishimura, 2002).

Termostabilitatea ridicată a lipazelor în lichide ionice a stimulat cercetarea rezoluției cinetice la temperaturi ridicate (Eckstein, Wasserscheid și Kragl, 2002). Acilarea compusului 1 cu acetat de vinil catalizată de BcL în [Bmim]Tf₂N și-a păstrat enantioselectivitatea ridicată, E scăzând de la 200 la doar 150 atunci când temperatura a crescut de la 25 la 90°C, excepând la 55°C (corespunde cu punctul de fierbere al MTBE) când enantioselectivitatea în MTBE a scăzut dramatic de la 200 la 4.

Reacțiile biocatalitice în mediu neapos devin tot mai importante, deoarece o serie de compuși naturali (ca de exemplu: peptide, zaharuri, nucleotide și intermediari biochimici) sunt materii prime importante pentru produse farmaceutice, produse de sinteză fină și hidrogeluri. Lichidele ionice prin numeroasele avantaje pe care le prezintă ar putea fi o tehnologie cheie pentru realizarea acestor procese cât mai eficient.

2. CONTRIBUȚII ORIGINALE

2.1. Studiul reacțiilor de esterificare catalizate de lipaze imobilizate prin adsorbție și entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție

Principalul scop al imobilizării enzimelor este obținerea unui biocatalizator cu stabilitate și activitate îmbunătățite și care să nu fi fost afectate în timpul procesului de imobilizare. Nu există o regulă pentru a prezice performanțele catalitice ale enzimei prin imobilizare, deoarece imobilizarea poate să mărească activitatea enzimei dar la fel de bine o poate și inhiba (Balcao, Paiva și Malcata, 1996). Performanțele preparatelor enzimatic obținute prin imobilizare se testează în reacții chimice ca esterificare, interesterificare sau hidroliză.

S-a realizat imobilizarea lipazei din pancreas de porc (PPL) prin adsorbție (Metoda 1), entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (Metoda 6) și adsorbție urmată de entrapare în sol-gel (Metoda 9). Preparatele enzimatic obținute au fost utilizate ca și biocatalizatori în reacția de esterificare a acidului lauric cu 1-octanol în n-hexan la 40°C (a se vedea Cap. 3.3.1). Pe baza analizelor gaz-cromatografice efectuate, s-au calculat prin metoda standardului intern cantitatea de ester obținută, randamentul în ester, activitatea de esterificare a preparatelor imobilizate și randamentele de regăsire ale activității enzimatic la timp de reacție de 24 ore.

2.1.1. Influența naturii suportului solid asupra eficienței catalitice în reacții de esterificare catalizate de PPL imobilizată prin adsorbție

Pentru acest studiu au fost realizate 6 preparate enzimatic prin imobilizarea PPL prin adsorbție pe diferite materiale solide și cu precipitare cu acetonă răcită la -15°C, conform Metodei 1. Rezultatele obținute pe baza analizelor probelor după 24 de ore de la reacția de esterificare studiată sunt prezentate în Tabelul 2.1.

Tabelul 2.1. Reacții de esterificare ale acidului lauric cu 1-octanol prin biocataliză cu preparate obținute prin imobilizarea PPL prin adsorbție.

Cod preparat	Suport solid	η_{ester} (%)	Activitate ($\mu\text{moli/h}\cdot\text{mg}_{\text{enz}}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)
PPL _{nativă}	-	37	0,311	100
PPL ₁	Celite 545	99	0,213	470
PPL ₂	Celite 521	67	0,113	253
PPL ₃	Celite C22	99	0,208	943
PPL ₄	CaCO ₃	87	0,148	624
PPL ₅	Purolite MN 200	52	0,088	171
PPL ₆	Celuloză AVICEL	14	0,024	110

Din Tabelul 2.1 se poate observa că dintre suporturile studiate, cele mai bune s-au dovedit a fi Celite C22 și CaCO_3 , pe care s-au obținut randamente de regăsire a activității enzimatică foarte mari. Creșterea activității totale după imobilizare se explică prin evitarea aglomerării enzimei în mediul de reacție datorită distribuției sale pe suprafața suportului și unor interacțiuni cu suportul care determină realizarea unei conformații mai favorabile pentru activitatea catalitică.

Adsorbția reprezintă o metodă simplă și frecvent utilizată pentru imobilizarea enzimelor, însă are dezavantajul că enzima imobilizată se desoarbe ușor de pe suport, mai ales în solvenți polari, și preparatul nu poate fi folosit de mai multe ori cu aceeași eficiență.

2.1.2. Studiul reacțiilor de esterificare prin biocataliză cu PPL dublu imobilizată

Pentru că nici una dintre metodele de imobilizare cunoscute nu este lipsită de dezavantaje, apare logică ideea ca prin combinarea mai multor metode să fie conservate avantajele și eliminate dezavantajele care caracterizează fiecare dintre metodele respective. Trebuie însă ca metodele să fie complementare, adică să poată fi realizate consecutiv astfel ca enzima „preimobilizată” printr-o metodă să poată fi imobilizată folosind o a doua metodă. O asemenea combinație este posibilă între adsorbție și entraparea în sol-gel. Acest tip de “dublă imobilizare” implică depunerea enzimei entrapate în sol-gel pe suprafața unui suport solid, ceea ce ar putea duce la creșterea activității și la evitarea aglomerării enzimei în timpul procesului de imobilizare precum și a pierderilor difuzionale care apar la utilizarea enzimei (Zarcu și colab., 2008^a). Dacă procesul de gelificare are loc prea rapid este dificil de distribuit enzima entrapată pe suprafața suportului. Astfel, este mai convenabil de a utiliza precursori tetraetoxisilani, care gelifică mai lent decât precursorii tetrametoxisilani (Péter și colab., 2007^a).

Variantele de imobilizare încercate au diferit prin natura silanilor precursori, natura catalizatorului (NaF sau NH_3), natura materialului adsorbant (Celite 545, Celite 521, Celite C22, CaCO_3 , Purolite MN 200 sau Celuloză AVICEL), utilizarea sau nu a unui adaos de etanol cât și prin temperatura de maturare a gelului (5°C sau 25°C) (Zarcu și colab., 2008^a).

2.1.2.1. Optimizarea metodei de imobilizare

S-au efectuat o serie de imobilizări a PPL prin entrapare combinată cu adsorbție conform (Metodei 6), folosind ca și silani precursori etoxisilani TEOS și MeTEOS sau PhTEOS în raport molar de 1:1 și diferite tipuri de suport solid, care s-au adăugat în momentul în care gelifierea a început (Zarcu și colab., 2008^a). În faza de obținere a solului, în unele cazuri, s-a adăugat și o anumită cantitate de etanol, pentru a mări omogenitatea sistemului și a favoriza astfel hidroliza silanilor precursori. Gelul obținut a fost păstrat timp de 24 de ore la 25°C pentru o maturare completă. Preparatele obținute au fost testate pentru activitate în reacția de esterificare a acidului lauric cu 1-octanol în mediu de n-hexan la 40°C .

Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 2.2, iar pe baza lor au fost realizate figurile 2.1 și 2.2.

Tabelul 2.2. Reacții de esterificare ale acidului lauric cu 1-octanol prin biocataliză cu preparate obținute prin imobilizarea PPL prin entrapare combinată cu adsorbție.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar 1:1)	Suport solid	Catalizator, Aditiv	η_{ester} (%)	Activitate ($\mu\text{moli/h}\cdot\text{mg}_{\text{enz}}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)
PPL _{nativă}	-	-	-	37	0,311	100
PPL ₇	MeTEOS:TEOS	Celite 545	NH ₃ , -	82	0,170	423
PPL ₈	PhTEOS:TEOS		NaF, EtOH	11	0,023	77
PPL ₉	PhTEOS:TEOS		NH ₃ , EtOH	58	0,120	361
PPL ₁₀	PhTEOS:TEOS		NH ₃ , -	71	0,148	320
PPL ₁₁	MeTEOS:TEOS	Celite 521	NaF, EtOH	-	-	-
PPL ₁₂	MeTEOS:TEOS		NH ₃ , EtOH	10	0,016	39
PPL ₁₃	MeTEOS:TEOS		NH ₃ , -	14	0,024	64
PPL ₁₄	PhTEOS:TEOS		NaF, EtOH	-	-	-
PPL ₁₅	PhTEOS:TEOS		NaF, -	15	0,024	57
PPL ₁₆	PhTEOS:TEOS		NH ₃ , EtOH	14	0,024	71
PPL ₁₇	PhTEOS:TEOS		NH ₃ , -	39	0,065	176
PPL ₁₈	MeTEOS:TEOS		Celite C22	NaF, -	14	0,023
PPL ₁₉	MeTEOS:TEOS	NH ₃ , -		33	0,056	163
PPL ₂₀	MeTEOS:TEOS	CaCO ₃	NaF, -	10	0,018	51
PPL ₂₁	MeTEOS:TEOS		NH ₃ , -	29	0,048	124
PPL ₂₂	MeTEOS:TEOS	Purolite MN 200	NaF, -	9	0,015	27
PPL ₂₃	MeTEOS:TEOS		NH ₃ , -	8	0,013	24
PPL ₂₄	MeTEOS:TEOS	Celuloză AVICEL	NaF, -	-	-	-
PPL ₂₅	MeTEOS:TEOS		NH ₃ , -	9	0,015	46

Din Tabelul 2.2 se observă că dintre preparatele enzimactice obținute prin imobilizarea lipazei pancreatice prin metoda combinată nu toate au fost active ca biocatalizatori în reacția de esterificare studiată, iar această activitate a fost influențată de natura catalizatorului, adausul de etanol și de suportul solid.

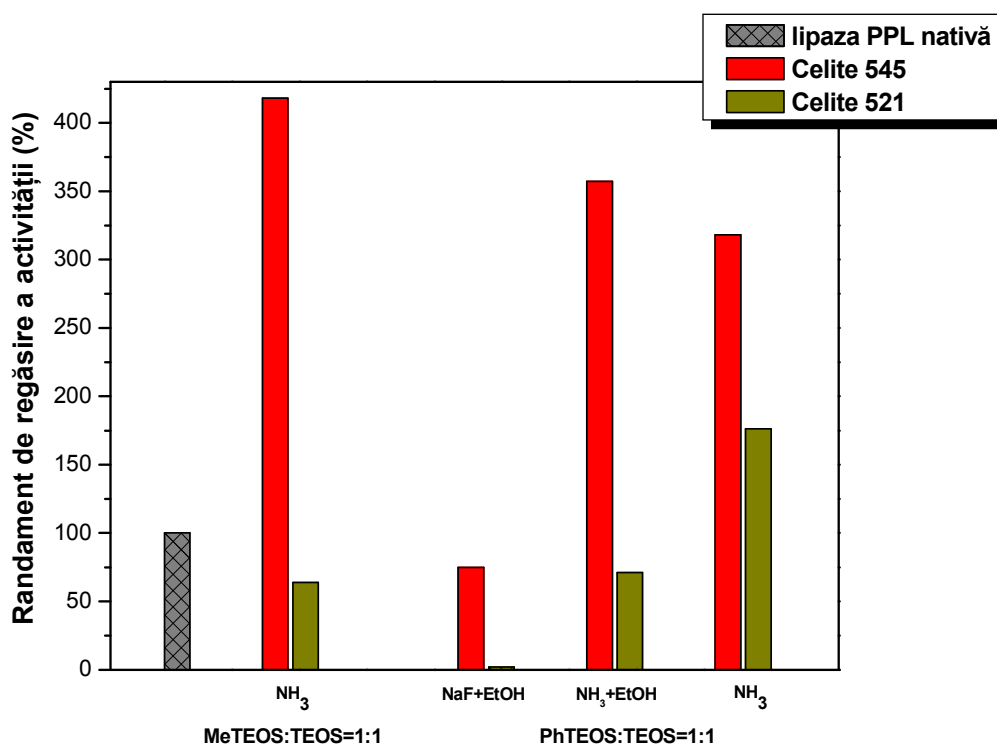


Figura 2.1. Influența metodologiei de imobilizare (silanii precursori, natura catalizatorului, adausul de etanol și suportul solid) asupra eficienței catalitice a preparatelor obținute prin imobilizarea PPL prin entrapare combinată cu adsorbție pe Celite 545 sau Celite 521.

Din Figura 2.1 se observă valori ridicate ($> 400\%$) ale randamentelor de regăsire a activității enzimatice a preparatelor de PPL imobilizate prin entrapare și adsorbție pe Celite 545, la utilizarea ca și silani precursori a MeTEOS/TEOS=1:1 cât și a PhTEOS/TEOS=1:1, precum și a NH₃ ca și catalizator. Atunci când suportul solid a fost Celite 521 s-au obținut valori ale randamentului de regăsire de 1,8-6,6 ori mai mici. În ambele cazuri, adausul de etanol a dus la o scădere pronunțată sau chiar la pierderea activității preparatelor enzimatice.

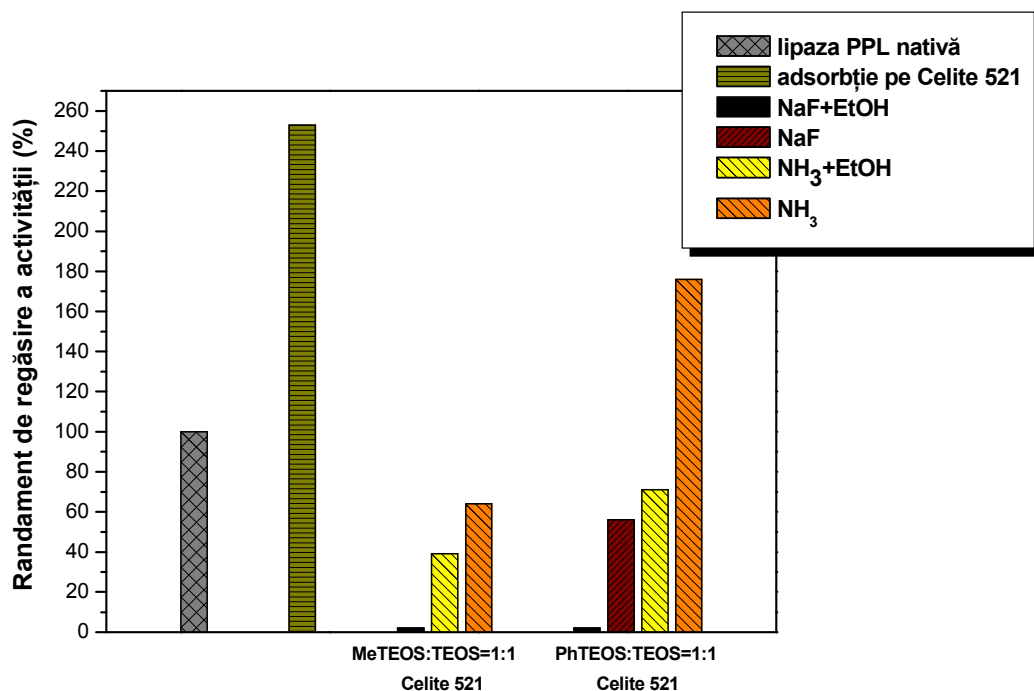


Figura 2.2. Influența metodologiei de imobilizare (silanii precursori, natura catalizatorului, adăusul de etanol) asupra eficienței catalitice a preparatelor obținute prin imobilizarea PPL prin entrapare combinată cu adsorbție pe Celite 521.

Din Figura 2.2 se observă că pentru imobilizarea PPL prin entrapare combinată cu adsorbție pe Celite 521 cele mai bune valori ale randamentelor de regăsire a activității au fost obținute la utilizarea NH₃ ca și catalizator, iar introducerea de etanol în timpul procesului sol-gel a dus la o ușoară scădere a activității (în cazul utilizării ca și silani precursori a MeTEOS/TEOS=1:1) și la o scădere de aprox 2,5 ori în cazul PhTEOS/TEOS=1:1. Folosind drept catalizator NaF randamentele de regăsire au fost mai mici comparativ cu NH₃, dar și de această dată adăugarea etanolului ca și aditiv a condus la pierderea totală a activității, motiv care a dus la renunțarea adăugării de etanol.

2.1.2.2. Influența naturii suportului solid și a catalizatorului de gelifiere

Așa cum se mai poate observa din Tabelul 2.2 pentru imobilizarea PPL prin entrapare combinată cu adsorbție, au fost testate mai multe materiale de suport. Ca și în cazul suportului Celite 521, folosirea catalizei bazice a dus la rezultate mai bune decât atunci când s-a folosit NaF (Zarcuța și colab., 2008^a). În general se poate spune că pentru dubla imobilizare a PPL, suporturile cele mai bune au fost Celite 545, Celite C22 și CaCO₃, pentru care activitatea totală regăsită a fost mai mare decât cea inițială (Figura 2.3). Aceste randamente au fost însă mai mici decât în cazul adsorbției simple, probabil din cauza unei dezactivări a enzimei în timpul formării sol-gelului.

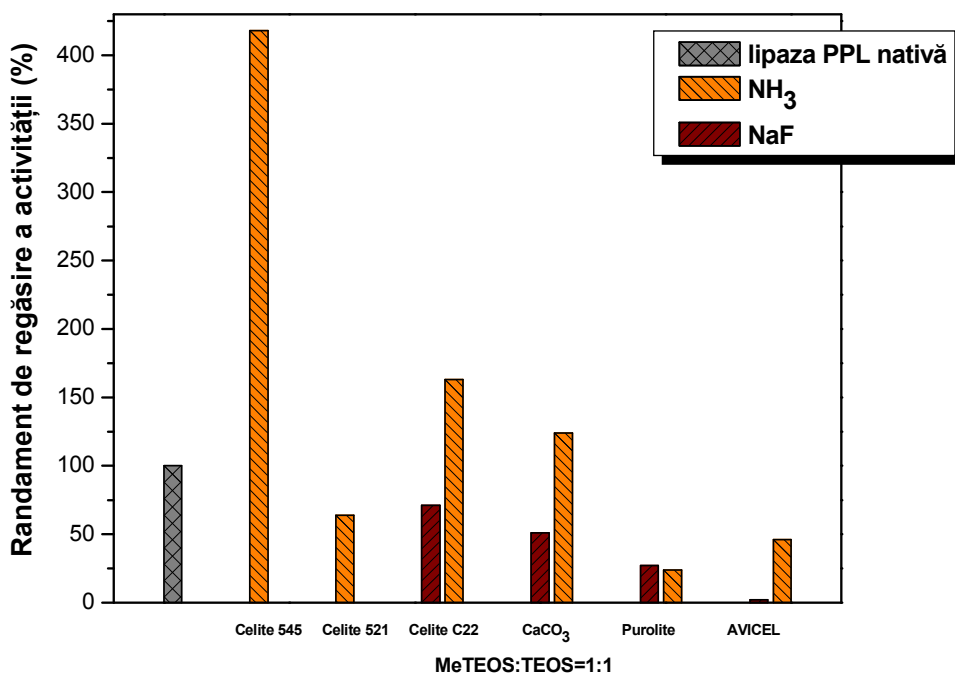


Figura 2.3. Influența tipului de adsorbent și a catalizatorului asupra eficienței catalitice a preparatelor obținute prin imobilizarea PPL prin entrapare combinată cu adsorbție.

În Figura 2.4 este prezentată, pentru exemplificare, o cromatogramă obținută prin analiza pe coloana BPX-5 a amestecului de reacție după 24 de ore de reacție de la esterificarea acidului lauric cu 1-octanol catalizată de PPL₁₉ dublu imobilizată.

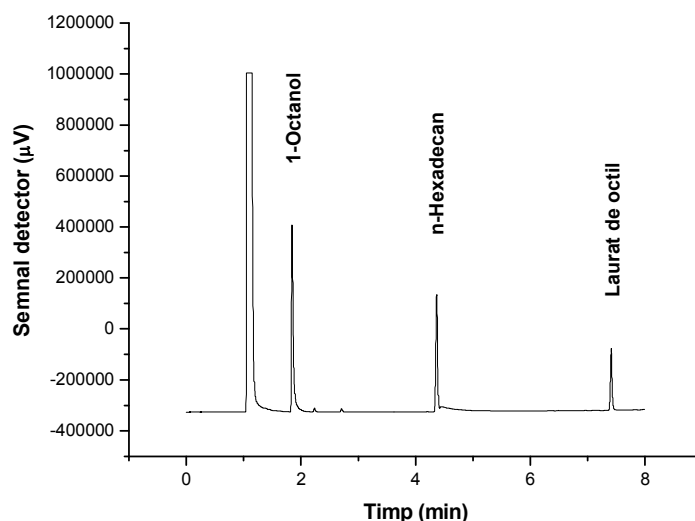


Figura 2.4. Cromatograma amestecului de la reacția de esterificare catalizată de PLL₁₉ imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite C22, cu un raport molar de silani MeTEOS:TEOS=1:1.

2.1.2.3. Influența temperaturii de maturare a gelului

Deoarece am presupus că dezactivarea lipazei se poate produce în timpul maturării gelului la temperatura camerei, s-a încercat realizarea acestei etape la rece, la temperatura de 5°C (Zarcu și colab., 2008^a). Astfel, pentru imobilizarea PPL prin metoda combinată (Metoda 6) s-au folosit suporturile Celite C22 și carbonat de calciu care au dat rezultate bune în determinările anterioare. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.3 și Figura 2.5 și se poate observa că randamentele de regăsire prezintă o ușoară creștere, pentru ambele suporturi utilizate, doar la utilizarea ca și catalizator a acidului Lewis (NaF). Rezultă astfel că nu temperatura de maturare este motivul dezactivării parțiale a enzimei. Aceasta se poate datora unor fenomene de împiedicare sterică, dar și unei distribuții necorespunzătoare a enzimei în sistemul destul de complex care există în timpul gelifierii în prezența suportului.

Tabelul 2.3. Reacții de esterificare ale acidului lauric cu 1-octanol prin biocataliză cu preparate obținute prin imobilizarea PPL prin entrapare combinată cu adsorbție - (maturarea gelului la 5°C)

Cod preparat	Silani precursori (raport molar 1:1)	Suport solid	Catalizator, Aditiv	η_{ester} (%)	Activitate ($\mu\text{moli/h}\cdot\text{mg}_{\text{enz}}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)
PPL _{nativă}	-	-	-	37	0,311	100
PPL ₂₆	MeTEOS:TEOS	CeliteC22	NaF, -	25	0,041	132
PPL ₂₇	MeTEOS:TEOS		NH ₃ , -	11	0,019	56
PPL ₂₈	MeTEOS:TEOS	CaCO ₃	NaF, -	13	0,021	54
PPL ₂₉	MeTEOS:TEOS		NH ₃ , -	26	0,043	109

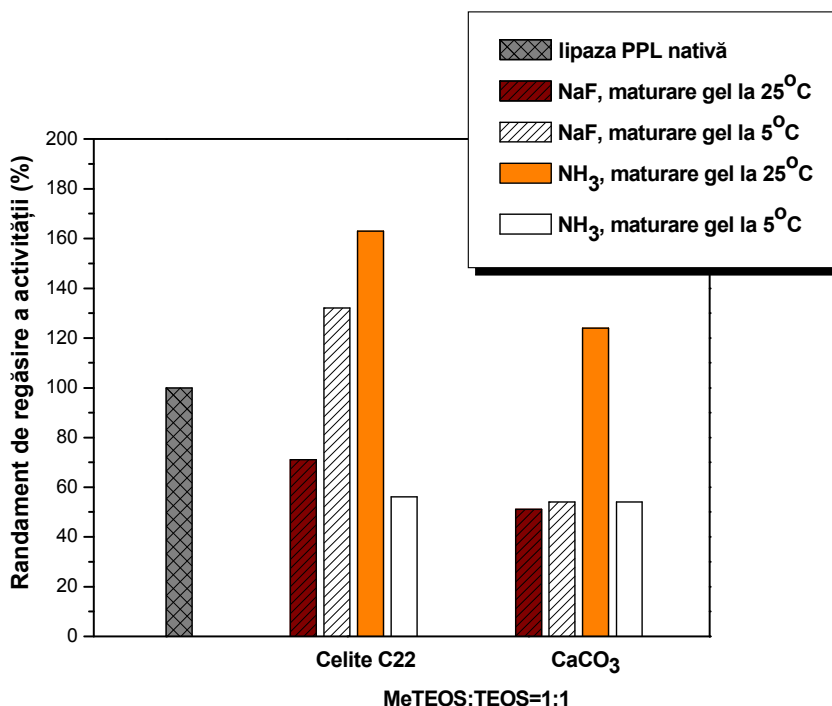


Figura 2.5. Influența temperaturii de maturare a gelului asupra eficienței catalitice a preparatelor obținute prin imobilizarea PPL prin entrapare combinată cu adsorbție.

2.1.2.4. Imobilizarea prin entraparea enzimei adsorbite

Deoarece nu am avut la dispoziție metode prin care să putem determina poziționarea exactă a enzimei în timpul și după finalizarea imobilizării, și presupunând că distribuția uniformă a enzimei pe suprafața suportului adsorbant favorizează activitatea catalitică, așa cum s-a demonstrat în cazul adsorbției simple, am încercat și posibilitatea de a realiza această imobilizare cu o tehnică diferită conform Metodei 9 (Zarcu și colab., 2008^a). S-a imobilizat lipaza prin adsorbție pe Celite 521, Celite C22 și CaCO₃, după care lipaza adsorbită a fost amestecată cu sol-gelul în momentul în care a început gelifierea. Rezultatele sînt prezentate în Tabelul 2.4.

Tabelul 2.4. Reacții de esterificare ale acidului lauric cu 1-octanol prin biocataliză cu preparate obținute prin imobilizarea PPL prin adsorbție urmată de entrapare în sol-gel.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar 1:1)	Suport solid	Catalizator, Aditiv	η_{ester} (%)	Activitate ($\mu\text{moli/h}\cdot\text{mg}_{\text{enz}}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)
PPL _{nativă}	-	-	-	37	0,311	100
PPL ₃₀	MeTEOS:TEOS	Celite 521	NH ₃	13	0,022	35
PPL ₃₁	MeTEOS:TEOS	Celite C22	NaF, -	9	0,014	47
PPL ₃₂	MeTEOS:TEOS		NH ₃ , -	12	0,020	69
PPL ₃₃	MeTEOS:TEOS	CaCO ₃	NaF, -	-	-	-
PPL ₃₄	MeTEOS:TEOS		NH ₃ , -	-	-	-

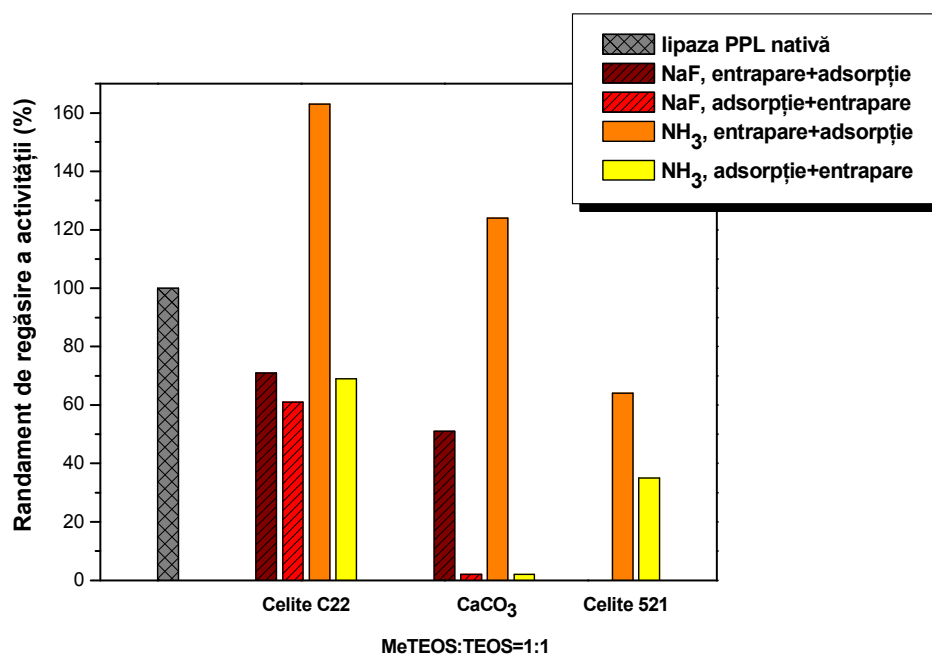


Figura 2.6. Influența protocolului de imobilizare și a naturii catalizatorului asupra eficienței catalitice a preparatelor obținute prin imobilizarea PPL prin adsorbție urmată de entrapare în sol-gel.

Utilizând noua tehnică de imobilizare, din Figura 2.6 se poate observa valorile mai mici ale randamentelor de regăsire a activității enzimatică comparativ cu cele obținute prin metoda de entrapare în sol-gel urmată de adsorbție, iar în cazul utilizării CaCO_3 ca și suport solid chiar pierderea totală a activității preparatelor. Probabil că rețeaua de sol-gel formată în jurul enzimei adsorbite a fost prea compactă și a împiedicat trecerea reactanților spre centrul activ.

2.1.3. Concluzii

1. A fost realizată imobilizarea lipazei pancreatice prin diferite metode: adsorbție, entrapare în sol-gel urmată de adsorbție și adsorbție urmată de entrapare în sol-gel.

2. Dintre suporturile de adsorbție, cele mai bune s-au dovedit a fi unele de tip Celite, Celite 545, Celite C22 și carbonatul de calciu. În condițiile în care imobilizarea s-a efectuat prin precipitarea enzimei pe suprafața suportului s-a înregistrat o creștere importantă a activității totale după imobilizare.

3. Aceleași suporturi au dat cele mai bune rezultate și în cazul imobilizării prin entrapare în sol-gel urmată de adsorbție, chiar dacă activitățile nu au fost așa de mari, însă stabilitatea preparatelor a crescut în urma entrapării, comparativ cu adsorbția simplă. S-au obținut randamente de regăsire a activității de peste 100%, dacă al doilea silan precursor alături de TEOS a fost MeTEOS (cele la care s-a folosit PhTEOS au gelificat mai greu și preparatele obținute au avut în general activități mai mici) și NH_3 a fost utilizat drept catalizator.

4. Folosind drept catalizator NaF randamentele de regăsire au fost mai mici comparativ cu NH_3 , iar adăugarea etanolului ca și aditiv a condus la scăderea sau chiar la pierderea totală a activității, motiv care a dus la renunțarea adăugării de etanol.

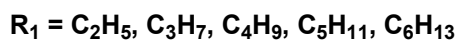
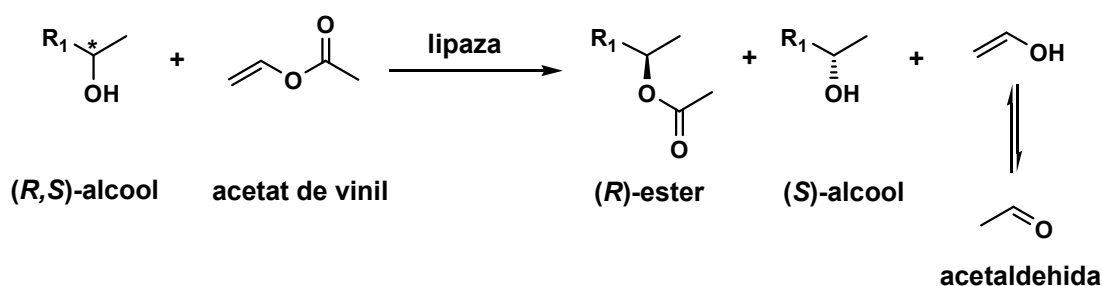
5. Maturarea gelului la rece (5°C) în loc de temperatura camerei a dus la o ușoară creștere a activității enzimei imobilizate doar în cazul utilizării NaF (catalizator) și a Celitei C22 ca adsorbent. Astfel se poate afirma că nu dezactivarea termică în timpul acestei etape este cauza pierderii de activitate.

6. Inversarea secvenței de imobilizare efectuând mai întâi adsorbția și apoi entraparea enzimei în sol-gel nu a dus la rezultatele așteptate, această tehnică fiind inferioară celei în care imobilizarea se realizează prin legarea de suport prin adsorbție a enzimei deja entrapate în sol-gel.

2.2. Studiul acilării enantioselective a unor alcooli secundari alifatici prin biocataliză cu lipaze immobilizate prin metoda sol-gel

Scopul acestor cercetări experimentale a fost obținerea unor biocatalizatori enzimatici cu caracteristici de activitate și enantioselectivitate superioare.

S-a realizat imobilizarea unor lipaze microbiene prin entrapare în sol-gel (Metodele 2, 3, 4 și 5) și entrapare combinată cu adsorbție (Metodele 6, 7 și 8). Reacția model utilizată pentru studiul performanțelor catalitice a fost transesterificarea unor alcooli secundari alifatici, de la 2-butanol la 2-octanol, folosind acetat de vinil ca agent de acilare. În acest mod reacția devine ireversibilă, deoarece produsul secundar obținut, alcoolul vinilic, se tautomerizează în acetaldehidă. Schema generală de reacție pentru o lipază (*R*)-selectivă este:



Schema 2.1.

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 gaz-cromatografie, folosind n-decan sau n-dodecan ca standard intern pentru analiza cantitativă. Pe baza analizelor cromatografice a probelor prelevate după 24 ore de reacție s-au calculat prin metoda standardului intern conversia alcoolului, activitatea de transesterificare/acilare și randamentul de regăsire a activității enzimatic ($\eta_{\text{regăsire}} \%$), excesul enantiomeric al (*R*)-esterului (e.e.) și raportul enantiomeric (E). Pentru calculul randamentului de regăsire al activității enzimatic după imobilizare, s-a efectuat o sinteză în aceleași condiții, în care s-a utilizat 5 mg lipază nativă.

2.2.1. Selectarea lipazelor

Pentru selectarea lipazelor care să fie folosite în studiile ulterioare au fost testate patru tipuri de lipaze microbiene în reacția de acilare enantioselectivă a unui număr de 5 alcooli secundari alifatici: 2-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol, 2-heptanol și 2-octanol cu acetat de vinil, în n-hexan la 40°C. Pentru comparație s-au determinat și valorile corespunzătoare pentru Novozyme 435 (obținută din *Candida antarctica* B), una dintre cele mai performante lipaze comerciale immobilizate utilizate în biotransformări enantioselective (Kiss și colab., 2007). Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.5.

Tabelul 2.5. Acilarea alcoolilor secundari alifatici prin biocataliză cu diferite lipaze microbiene.

Tipul lipazei	Substrat	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	e.e. (%)	E
<i>Candida cylindracea</i>	2-butanol	15	0,624	13	1
	2-pentanol	10	0,382	26	2
	2-hexanol	15	0,337	29	2
	2-heptanol	5	0,112	19	1
	2-octanol	11	0,319	22	2
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Amano AK)	2-butanol	60	2,458	7	1
	2-pentanol	64	2,380	47	6
	2-hexanol	54	2,446	73	17
	2-heptanol	31	2,630	74	9
	2-octanol	53	2,095	55	6
<i>Burkholderia cepacia</i> (Amano PS)	2-butanol	34	2,780	5	1
	2-pentanol	22	1,726	67	6
	2-hexanol	31	2,661	84	17
	2-heptanol	28	2,645	87	20
	2-octanol	38	3,282	78	13
<i>Candida antarctica</i> B (Novozyme 435)	2-butanol	90	1,881	4	1
	2-pentanol	68	1,291	36	4
	2-hexanol	74	1,347	52	10
	2-heptanol	76	1,669	30	6
	2-octanol	59	1,657	69	29

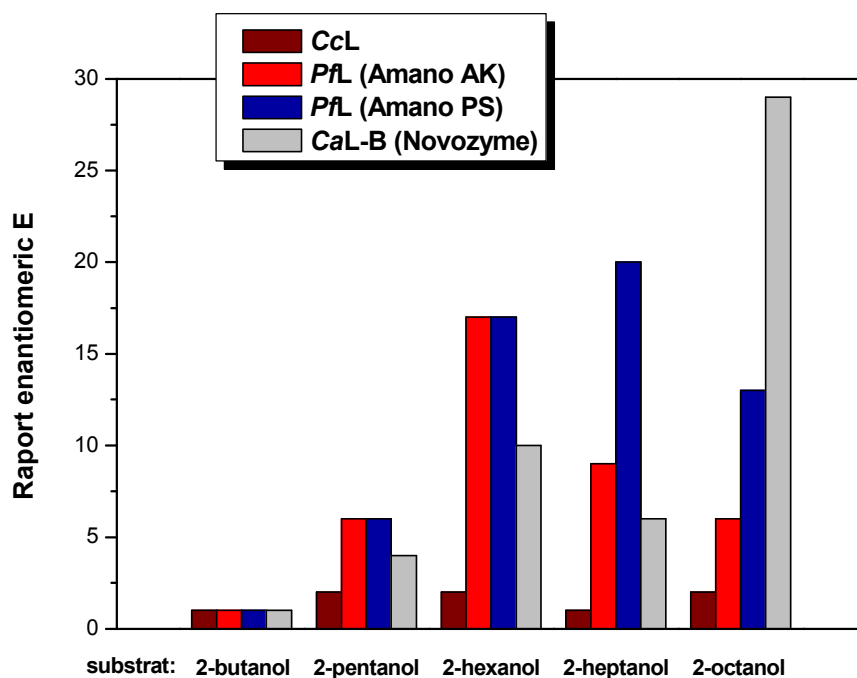


Figura 2.7. Dependența raportului enantiomeric de lipaza microbiană și de substratul utilizat în reacțiile de acilare studiate.

Așa cum se observă din Tabelul 2.5 și Figura 2.7, lipazele din *Pseudomonas fluorescens* Amano AK și *Burkholderia cepacia* Amano PS au arătat o enantioselectivitate superioară celei din *Candida cylindracea* și, exceptând substratul 2-octanol, foarte asemănătoare sau mai mare decât a lipazei Novozyme. Se mai poate observa că excesele enantiomerice în cazul substratului 2-butanol au fost foarte mici, deci nici una dintre lipazele testate nu este capabilă să facă distincție între izomerii optici ai acestui alcool în reacția de acilare cu acetat de vinil. Drept urmare, lipazele din *Pseudomonas fluorescens* Amano AK și *Burkholderia cepacia* Amano PS au fost selectate pentru studiile care s-au realizat în continuare.

2.2.2. Studii de acilare enantioselectivă a alcoolilor secundari alifatici cu lipază din *Pseudomonas fluorescens* imobilizată prin entrapare în sol-gel

Bioîncapsularea enzimelor în matrice de silice folosind tehnica sol-gel a fost mult studiată în ultimul timp datorită mecanismelor biochimice foarte cunoscute, a ariei largi de aplicații, disponibilitate comercială și a bunei stabilități a acestor preparate (Furukawa și colab., 2002; Kandimalla, Tripathi și Ju, 2006; Péter și colab., 2005). Tehnica sol-gel face parte dintre metodele de imobilizare bazate pe închiderea (entraparea) enzimei într-o matrice polimeră poroasă care permite trecerea reactanților și produșilor. Ea este cunoscută de mult în știința materialelor și a înregistrat o dezvoltare continuă.

Pentru acest studiu s-au folosit preparate enzimaticе obținute prin imobilizarea lipazei din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) prin entrapare în sol-gel folosind ca și silani precursori derivați metoxisilanici (TMOS și un trimetoxisilan cu o grupare nehidrolizabilă) în diferite rapoarte molare. Utilizarea precursorului MeTMOS a necesitat un studiu separat pentru optimizarea metodei de imobilizare, datorită valorilor foarte mici de activitate obținute în cazul folosirii metodei care a dat rezultate bune în cazul celorlalți silani.

2.2.2.1. Optimizarea metodei de imobilizare a lipazei Amano AK folosind precursorii MeTMOS și TMOS

În cazul preparatelor enzimaticе obținute prin imobilizarea lipazei Amano AK prin entrapare în sol-gel folosind MeTMOS și TMOS în raport de 1:1, respectiv 2:1 conform Metodei 2 s-au obținut valori foarte scăzute ale activității de transesterificare la acilarea 2-pentanolului (Tabelul 2.6) și 2-hexanolului (Tabelul 2.7). Întrucât imobilizarea a decurs bine, fără probleme la gelifiere, observându-se doar o creștere a temperaturii în timpul reacției de policondensare, se poate presupune că a avut loc o inactivare a lipazei cauzată de condițiile de reacție. Pentru a obține enzime imobilizate cu activitate corespunzătoare și cu acești precursori, metoda de imobilizare a fost modificată, de exemplu prin răcire în baia de gheață pe tot parcursul operației de gelifiere pentru a elimina posibilul efect nefavorabil al temperaturii. Rezultatele sunt prezentate în tabelele 2.6 și 2.7. Se observă că răcirea în timpul imobilizării nu a avut efect favorabil, deci sunt alte cauze care determină inactivarea.

Tabelul 2.6. Acilarea 2-pentanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin imobilizarea lipazei Amano AK prin diverse variante de entrapare în sol-gel

Cod preparat	Metoda	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	-	64	2,380	-	47	7
AK ₃	Metoda 2	MeTMOS:TMOS 1:1	2	0,004	1	64	5
AK ₄		MeTMOS:TMOS 2:1	3	0,022	5	70	6
AK ₁₁		MeTMOS:TMOS 1:1 (cu răcire)	3	0,020	5	71	6
AK ₁₂		TMOS:MeTMOS 1:1	4	0,031	7	73	7
AK ₁₃		TMOS:MeTMOS 1:1 (cu răcire)	1	0,008	2	68	5
AK ₄₃		Metoda 3	MeTMOS:TMOS 1:1	40	0,307	54	69
AK ₄₄	MeTMOS:TMOS 2:1		21	0,158	24	73	7
AK ₅₁	Metoda 4	MeTMOS:TMOS 1:1	5	0,022	5	68	5

Tabelul 2.7. Acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin imobilizarea lipazei Amano AK prin diverse variante de entrapare în sol-gel

Cod preparat	Metoda	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	-	54	2,446	-	73	17
AK ₃	Metoda 2	MeTMOS:TMOS 1:1	9	0,034	8	>99	>100
AK ₄		MeTMOS:TMOS 2:1	13	0,065	14	84	13
AK ₁₁		MeTMOS:TMOS 1:1 (cu răcire)	0,4	0,003	<1	>99	>100
AK ₁₂		TMOS:MeTMOS 1:1	49	0,213	44	80	21
AK ₁₃		TMOS:MeTMOS 1:1 (cu răcire)	6	0,051	11	>99	>100
AK ₄₃		Metoda 3	MeTMOS:TMOS 1:1	38	0,326	58	85
AK ₄₄	MeTMOS:TMOS 2:1		34	0,288	42	89	27
AK ₅₁	Metoda 4	MeTMOS:TMOS 1:1	8	0,068	8	>99	>100

Folosind tot Metoda 2 (SOL prepolimer obținut prin cataliză cu NaF) s-a încercat și inversarea ordinii de adăugare a silanilor la imobilizare, cu și fără răcire. Preparatul obținut la temperatura camerei și cu ordine de adăugare inversată a silanilor a fost singura cu activitate mai mare, dar numai pe substratul de 2-hexanol.

O posibilă explicație a activităților foarte mici ale preparatelor obținute prin această metodă poate fi structura compactă a acestora, rezultând blocarea enzimei în interiorul unor pori mici. Imaginea SEM a unui asemenea preparat (Figura 2.8.a) prezintă existența unor nanoparticule în blocuri compacte neregulate.

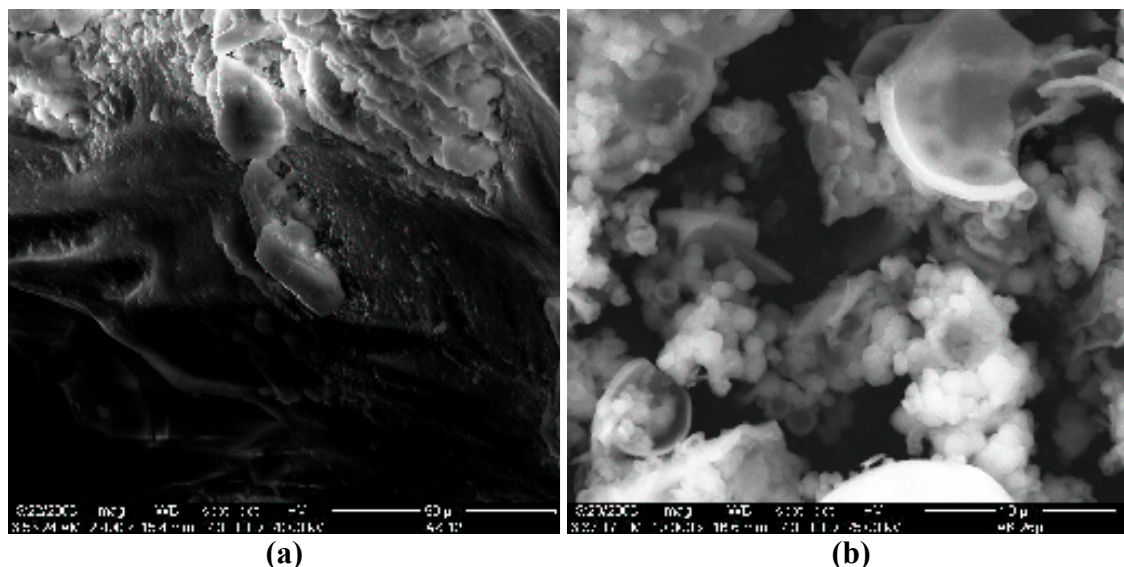


Figura 2.8. Imaginile SEM ale lipazei Amano AK entrapate în sol-gel cu MeTMOS/TMOS în raport de 1:1 utilizând: (a) Metoda 2; (b) Metoda 3.

Pentru imobilizarea cu aceiași precursori au fost utilizate și alte două metode de imobilizare, iar una dintre acestea, Metoda 3 (SOL prepolimer obținut în mediu de etanol), s-a dovedit a fi cea mai bună pentru această lipază, preparatele astfel obținute având activități corespunzătoare și randamente de regăsire de 54% respectiv 24% (în cazul 2-pentanolului) și 58% respectiv 42% (în cazul 2-hexanolului). O explicație a acestor rezultate este și structura poroasă, mai aerisită (Figura 2.8.b), ceea ce permite accesul substratului mai ușor.

În continuare, pentru imobilizarea lipazei Amano AK prin entrapare în sol-gel cu MeTMOS și TMOS ca și silani precursori se va folosi Metoda 3 (Zarcu și colab., 2007).

2.2.2.2. Studiul discriminării cinetice dintre izomerii 2-heptanolului și 2-octanolului

În reacțiile în care există o discriminare cinetică între enantiomeri, excesul enantiomeric depinde de conversie, ceea ce este logic dacă se ține cont de faptul că în stadiul inițial al reacției viteza de transformare a enantiomerului favorizat (în cazul nostru forma *R*) este mare și în consecință și excesul enantiomeric va fi mai mare. În acest studiu s-a urmărit evoluția în timp a conversiei alcoolului și a excesului enantiomeric (e.e.) a *R*-esterului în reacțiile de acilare a 2-heptanolului și a 2-octanolului prin biocataliză cu un preparat obținut prin entrapare în sol-gel cu OcTMOS/TMOS în raport molar de 2:1 (AK₈, Metoda 2) (Zarcu și Péter, 2007). Rezultatele obținute prin urmărirea reacțiilor timp de 24 de ore sunt prezentate în tabelele 2.8 și 2.9, iar pe baza datelor din aceste tabele s-a realizat Figura 2.9.

Tabelul 2.8. Evoluția în timp a reacției de acilare a 2-heptanolului

Timp (ore)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	e.e. (%)	E
1	15	3,118	81	11
2	24	2,479	79	11
3	34	2,341	78	12
4	40	2,065	76	12
5	46	1,900	74	13
6	50	1,721	72	13
24	73	0,628	36	8

Tabelul 2.9. Evoluția în timp a reacției de acilare a 2-octanolului

Timp (ore)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	e.e. (%)	E
1	12	3,455	61	5
2	25	3,194	59	5
3	34	2,981	57	6
4	45	2,730	54	6
5	54	2,428	52	8
6	57	2,296	49	9
24	90	0,908	13	4

Figura 2.9 prezintă discriminarea cinetică dintre izomerii 2-heptanolului și 2-octanolului. Curba conversiei este hiperbolică, așa cum se întâmplă în mod obișnuit în reacțiile enzimaticе, iar scăderea excesului enantiomeric arată o dependență liniară cu timpul, ceea ce este normal ținând cont că odată cu creșterea timpului de reacție crește ponderea relativă a reacției enantiomerului defavorizat. Se poate afirma că la acilarea 2-heptanolului și 2-octanolului prin biocataliză cu preparatul AK₈, valorile optime de conversie și enantioselectivitate au fost obținute în punctele de intersecție dintre curba conversiei și dreapta excesului enantiomeric, la 5 ore pentru 2-octanol și 10 ore pentru 2-heptanol. Acest rezultat este confirmat de faptul că la valorile respective ale timpului de reacție se obțin și valorile cele mai mari ale indicelui de enantioselectivitate E, care corelează ambii acești parametri, conversia și excesul enantiomeric. Dacă se urmărește obținerea produsului cu exces enantiomeric cât mai ridicat la o conversie bună, reacția ar trebui oprită la atingerea acestui optim. În reacțiile următoare, am preferat totuși un timp de reacție mai mare (24 de ore), pentru a avea rezultate comparabile pentru toate preparatele, incluzându-le și pe cele care au avut activități mici.

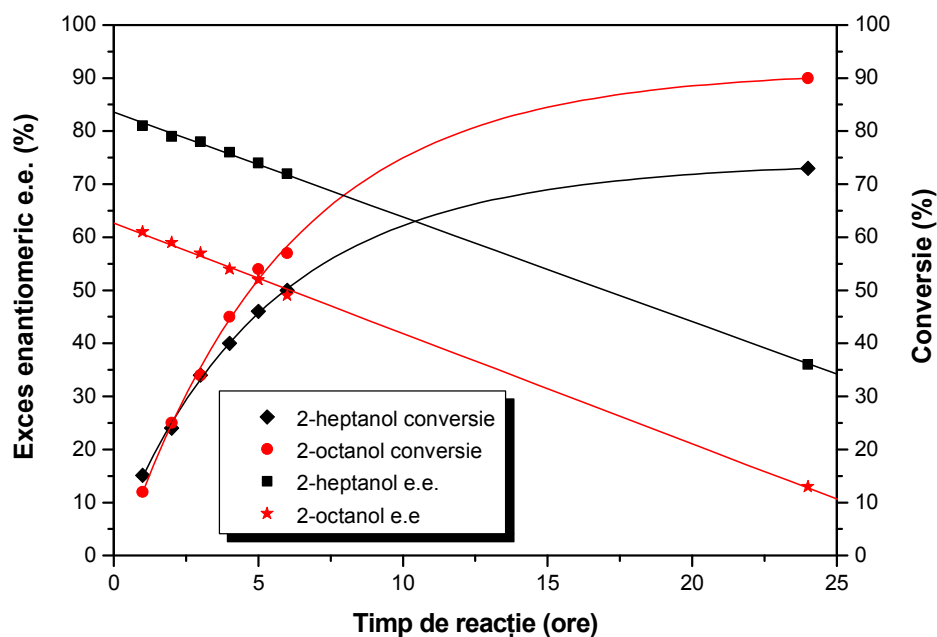


Figura 2.9. Dependența conversiei și a excesului enantiomeric de timpul de reacție în acilarea 2-heptanolului și 2-octanolului catalizate de preparatul AK₈ obținut prin entrapare în sol-gel cu OcTMOS/TMOS în raport molar de 2:1.

2.2.2.3. Studiul influenței naturii grupării nehidrolizabile asupra activității și enantioselectivității lipazei Amano AK imobilizate

Pentru acest studiu s-au folosit opt preparate enzimice obținute prin imobilizarea lipazei din *Pseudomonas fluorescens* Amano AK prin entrapare în sol-gel conform Metodei 2 și Metodei 3, utilizând ca precursori metoxisilanici TMOS și un alchil- sau aril-trimetoxisilan (MeTMOS, PrTMOS, OcTMOS sau PhTMOS) în rapoarte molare de 1:1 și 1:2, și un preparat pentru care la entraparea în sol-gel s-a utilizat doar TMOS (Zarcuța și colab., 2007). Preparatele obținute au fost utilizate ca și biocatalizatori în reacțiile de acilare a unor alcooli secundari, iar rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele 2.10 - 2.14.

Tabelul 2.10. Acilarea 2-butanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin entraparea în sol-gel a lipazei Amano AK.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	60	2,458	-	7	1
AK ₂	TMOS	4	0,028	3	17	1,4
AK ₄₃	MeTMOS:TMOS 1:1	32	0,256	45	12	1,3
AK ₄₄	MeTMOS:TMOS 2:1	15	0,121	18	11	1,3
AK ₅	PrTMOS:TMOS 1:1	24	0,196	37	9	1,2
AK ₆	PrTMOS:TMOS 2:1	60	0,489	77	12	1,5
AK ₇	OcTMOS:TMOS 1:1	78	0,635	124	10	1,6
AK ₈	OcTMOS:TMOS 2:1	91	0,368	57	9	2,6
AK ₉	PhTMOS:TMOS 1:1	7	0,056	14	5	1,1
AK ₁₀	PhTMOS:TMOS 2:1	12	0,097	21	8	1,2

Tabelul 2.11. Acilarea 2-pentanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin entraparea în sol-gel a lipazei Amano AK.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	64	2,380	-	47	7
AK ₂	TMOS	0,5	0,004	0,5	71	6
AK ₄₃	MeTMOS:TMOS 1:1	40	0,307	54	69	9
AK ₄₄	MeTMOS:TMOS 2:1	21	0,158	24	73	7
AK ₅	PrTMOS:TMOS 1:1	15	0,117	23	68	6
AK ₆	PrTMOS:TMOS 2:1	49	0,369	60	58	6
AK ₇	OcTMOS:TMOS 1:1	58	0,435	88	52	6
AK ₈	OcTMOS:TMOS 2:1	89	0,721	116	12	4
AK ₉	PhTMOS:TMOS 1:1	4	0,032	8	74	7
AK ₁₀	PhTMOS:TMOS 2:1	19	0,145	32	72	7

Tabelul 2.12. Acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin entrapare în sol-gel a lipazei Amano AK.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	54	2,446	-	73	17
AK ₂	TMOS	14	0,116	13	99	233
AK ₄₃	MeTMOS:TMOS 1:1	38	0,326	58	85	20
AK ₄₄	MeTMOS:TMOS 2:1	34	0,288	42	89	27
AK ₅	PrTMOS:TMOS 1:1	27	0,235	45	99	286
AK ₆	PrTMOS:TMOS 2:1	54	0,447	71	80	31
AK ₇	OcTMOS:TMOS 1:1	56	0,479	94	77	34
AK ₈	OcTMOS:TMOS 2:1	79	0,670	105	26	6
AK ₉	PhTMOS:TMOS 1:1	16	0,137	34	99	239
AK ₁₀	PhTMOS:TMOS 2:1	24	0,200	44	99	270

Tabelul 2.13. Acilarea 2-heptanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin entraparea în sol-gel a lipazei Amano AK.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	31	2,630	-	74	9
AK ₂	TMOS	2	0,002	0,2	74	7
AK ₄₃	MeTMOS:TMOS 1:1	15	0,153	25	80	10
AK ₄₄	MeTMOS:TMOS 2:1	22	0,181	25	84	15
AK ₅	PrTMOS:TMOS 1:1	14	0,128	23	78	9
AK ₆	PrTMOS:TMOS 2:1	43	0,398	58	74	12
AK ₇	OcTMOS:TMOS 1:1	61	0,578	106	61	15
AK ₈	OcTMOS:TMOS 2:1	73	0,628	92	36	8
AK ₉	PhTMOS:TMOS 1:1	4,4	0,035	8	73	7
AK ₁₀	PhTMOS:TMOS 2:1	13	0,110	21	82	11

Tabelul 2.14. Acilarea 2-octanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin entraparea în sol-gel a lipazei Amano AK.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	53	2,095	-	55	6
AK ₂	TMOS	0,4	0,003	0,4	70	1
AK ₄₃	MeTMOS:TMOS 1:1	22	0,191	40	64	5
AK ₄₄	MeTMOS:TMOS 2:1	26	0,222	38	64	6
AK ₅	PrTMOS:TMOS 1:1	17	0,143	32	59	4
AK ₆	PrTMOS:TMOS 2:1	60	0,484	89	55	8
AK ₇	OcTMOS:TMOS 1:1	68	0,559	128	46	11
AK ₈	OcTMOS:TMOS 2:1	90	0,908	166	4	2
AK ₉	PhTMOS:TMOS 1:1	3	0,025	7	52	3
AK ₁₀	PhTMOS:TMOS 2:1	8,1	0,065	16	60	4

Pe baza datelor din tabelele 2.10 - 2.14 s-a realizat Figura 2.10 și Figura 2.11, care prezintă randamentul de regăsire a activității enzimaticice și excesul enantiomeric e.e. după 24 de ore de reacție la acilarea enantioselectivă a alcoolilor studiați prin biocataliză cu preparatele enzimaticice menționate.

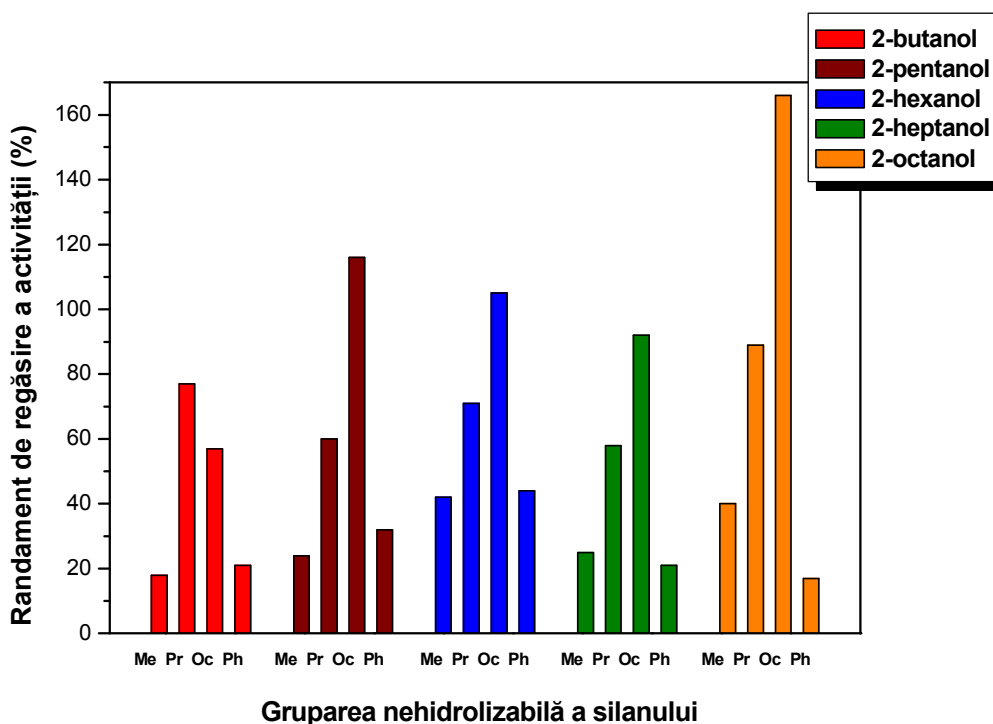


Figura 2.10. Dependența eficienței catalitice de natura grupei nehidrolizabile a silanului precursor și de substratul utilizat, în cazul preparatelor enzimactice de lipază Amano AK entrapate în sol-gel cu TMOS și un derivat de trimetoxisilan, la raport molar de 1:2.

Așa cum se poate observa din Figura 2.10 și din tabelele 2.10 - 2.14 eficiența imobilizării exprimată ca și randament de regăsire a activității, a fost mai ridicată la folosirea silanilor precursori cu grupare alchil nehidrolizabilă mai lungă. Pentru toate substraturile utilizate se remarcă rezultate bune la utilizarea preparatelor obținute cu PrTMOS și OcTMOS. Se poate spune că cele mai bune valori ale randamentului de regăsire a activității au fost obținute în cazul folosirii OcTMOS ca și silan precursor.

În ceea ce privește enantioselectivitatea (Figura 2.11), au fost obținute valori ale excesului enantiomeric foarte mici în cazul 2-butanolului, destul de bune pentru 2-pentanol, 2-heptanol și 2-octanol și excelente pentru 2-hexanol.

Explicația acestei comportări rezidă în structura zonei centrului catalitic activ al lipazei. Acest centru catalitic conține o așa-numită zonă de legare hidrofobă în care trebuie să se așeze gruparea alchil a alcoolului (substituentul mai voluminos). Din cauza configurației sterice diferite, apar diferențe între cei doi enantiomeri în ce privește ușurința de a se așeza în acest “buzunar” hidrofob și în consecință vitezele de reacție ai celor doi enantiomeri nu vor fi identice, diferența crescând odată cu creșterea mărimii substituentului de la α -carbonul alcoolului secundar. Dacă însă mărimea acestui substituent depășește a anumită limită (care depinde de tipul lipazei, întrucât fiecare lipază are altă dimensiune și formă a acestui centru de legare), așezarea corespunzătoare a substituentului voluminos devine dificilă și pentru enantiomerul favorizat și diferența între vitezele de reacție ai celor doi enantiomeri scade, având drept consecință scăderea excesului enantiomeric.

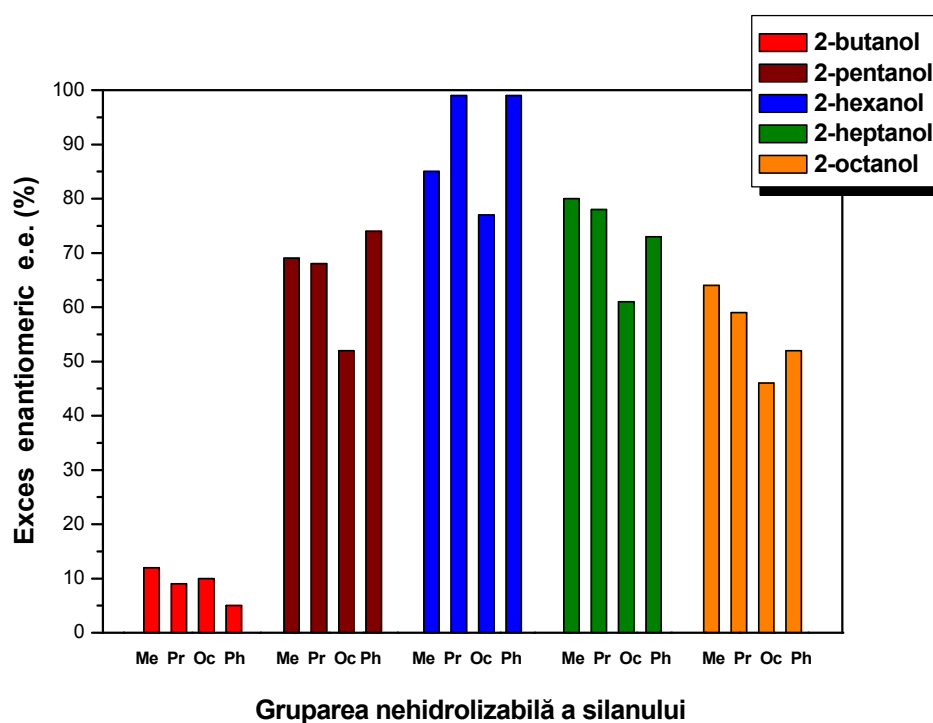


Figura 2.11. Dependența excesului enantiomeric de natura grupei nehidrolizabile a silanului precursor și de substratul utilizat, în reacțiile de acilare catalizate de preparate enzimaticice de lipază Amano AK entrapate în sol-gel cu TMOS și un derivat de trimetoxisilan, la raport molar 1:1.

Valori ridicate ale enantioselectivității au fost obținute, în special pentru substratul 2-hexanol, atunci când pentru imobilizare s-a utilizat un precursor silanic având ca grupe nehidrolizabile propil sau fenil (Peter și colab., 2007^b).

Ținând cont atât de eficiența imobilizării cât și de enantioselectivitate, se poate spune că cel mai bun silan precursor a fost PrTMOS, cu valori ale randamentului de regăsire între 30-89% și ale excesului enantiomeric de peste 65% pentru toate substraturile folosite, exceptând 2-butanolul.

2.2.3. Studii de acilare enantioselectivă a alcoolilor secundari alifatici cu lipază din *Burkholderia cepacia* imobilizată prin entrapare în sol-gel

Studiul realizat cu lipaza Amano AK a fost repetat și pentru cealaltă lipază microbială selectată, cea din *Burkholderia cepacia* (Amano PS). Reacțiile au fost realizate de asemenea în mediu de n-hexan la 40°C.

2.2.3.1. Optimizarea metodei de imobilizare a lipazei Amano PS folosind precursorii MeTMOS și TMOS

Și în cazul preparatelor enzimatiche obținute prin imobilizarea lipazei Amano PS prin entrapare în sol-gel folosind MeTMOS și TMOS în raport de 1:1, respectiv 2:1 conform Metodei 2 s-au obținut valori foarte scăzute ale activității de transesterificare la acilarea 2-pentanolului (Tabelul 2.15) și 2-hexanolului (Tabelul 2.16) (Pașka și colab., 2007). Deoarece imobilizarea a decurs bine, cu gelifiere rapidă, observându-se doar o creștere a temperaturii în timpul reacției de policondensare, s-a presupus că a avut loc o inactivare a lipazei cauzată de condițiile de reacție, în principal creșterea temperaturii. Pentru a verifica această lucruri s-a repetat imobilizarea conform Metodei 2, dar cu răcire în baia de gheață pe tot parcursul operației de imobilizare.

Tabelul 2.15. Acilarea 2-pentanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin imobilizarea lipazei Amano PS prin diverse variante de entrapare în sol-gel.

Cod preparat	Metoda	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
PS _{nativă}	-	-	27	1,726	-	67	6
PS ₂	Metoda 2	MeTMOS:TMOS 1:1	0,4	0,003	2	70	6
PS ₃		MeTMOS:TMOS 2:1	0,3	0,003	2	71	6
PS ₁₀		MeTMOS:TMOS 1:1 (cu răcire)	2,4	0,019	6	72	6
PS ₁₁		TMOS:MeTMOS 1:1 (cu răcire)	31	0,232	68	66	7
PS ₁₂		TMOS:MeTMOS 1:2 (cu răcire)	28	0,213	66	66	7
PS ₁₃		Metoda 3	MeTMOS:TMOS 1:1	0,1	0,007	2	88
PS ₁₄	Metoda 4	MeTMOS:TMOS 1:1	0,2	0,005	1,4	84	12

Tabelul 2.16. Acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin imobilizarea lipazei Amano PS prin diverse variante de entrapare în sol-gel.

Cod preparat	Metoda	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
PS _{nativă}	-	-	31	2,661	-	84	17
PS ₂	Metoda 2	MeTMOS:TMOS 1:1	17	0,079	32	81	11
PS ₃		MeTMOS:TMOS 2:1	15	0,064	27	>99	>100
PS ₁₀		MeTMOS:TMOS 1:1 (cu răcire)	7	0,060	13	>99	>100
PS ₁₁		TMOS:MeTMOS 1:1 (cu răcire)	28	0,226	43	84	16
PS ₁₂		TMOS:MeTMOS 1:2 (cu răcire)	41	0,332	66	83	19
PS ₁₃		Metoda 3	MeTMOS:TMOS 1:1	4	0,034	6	>99
PS ₁₄	Metoda 4	MeTMOS:TMOS 1:1	0,3	0,003	0,6	>99	>100

Din Tabelele 2.15 și 2.16 se poate observa că valoarea activității de transesterificare este scăzută, indiferent de metoda utilizată. Realizarea etapei de gelifiere la temperatură scăzută nu a avut nici ea efect pozitiv. Se poate spune că inactivarea datorită creșterii locale a temperaturii în timpul gelifierii nu este singura cauză a inactivării enzimei în acest caz. Rezultate bune s-au obținut în cazul inversării ordinii de adăugare a celor doi silani TMOS:MeTMOS (menținând răcirea în timpul gelifierii), preparatele obținute având activități bune și randamente de regăsire de până la 68% în cazul 2-pentanolului și 66% în cazul 2-hexanolului.

Prin inversarea ordinii de adăugare a precursorilor silanici, se modifică structura precursorului care este hidrolizat primul, deci și rețeaua care ia naștere va fi diferită. Dacă enzima este blocată în interiorul unor pori mici, accesul reactanților poate fi împiedicat și poate fi afectată conformația centrului activ, rezultând scăderea activității. Prin modificarea ordinii de adăugare a silanilor, probabil că se obține o structură în care aceste efecte negative sunt mai puțin pronunțate.

În experimentele următoare, pentru imobilizarea lipazei Amano PS prin entrapare în sol-gel cu silani precursori MeTMOS și TMOS s-a utilizat Metoda 2, dar cu inversarea ordinii de introducere a celor doi silani.

2.2.3.2. Studiul influenței naturii grupării nehidrolizabile asupra activității și enantioselectivității lipazei Amano PS imobilizate

Pentru acest studiu s-au folosit opt preparate enzimice obținute prin imobilizarea lipazei din *Burkholderia cepacia* Amano PS prin entrapare în sol-gel conform Metodei 2, utilizând ca precursori metoxisilanici TMOS și un alchil- sau aril-trimetoxisilan (MeTMOS, PrTMOS, OcTMOS sau PhTMOS) la rapoarte molare de 1:1 și 1:2, și un preparat pentru care la entraparea în sol-gel s-a utilizat doar TMOS (Pașka și colab., 2007). Preparatele enzimice obținute au fost utilizate ca și biocatalizatori în reacțiile de acilare a unor alcooli secundari, iar rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele 2.17 - 2.21.

Tabelul 2.17. Acilarea 2-butanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin entraparea în sol-gel a lipazei Amano PS.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
PS _{nativă}	-	34	2,780	-	5	1,1
PS ₁	TMOS	3	0,022	5	4	1,1
PS ₁₁	MeTMOS:TMOS 1:1	18	0,144	26	4	1,1
PS ₁₂	MeTMOS:TMOS 2:1	45	0,380	73	5	1,1
PS ₄	PrTMOS:TMOS 1:1	29	0,243	92	3	1,1
PS ₅	PrTMOS:TMOS 2:1	63	0,522	153	5	1,2
PS ₆	OcTMOS:TMOS 1:1	82	0,700	244	5	1,3
PS ₇	OcTMOS:TMOS 2:1	84	0,695	166	4	1,3
PS ₈	PhTMOS:TMOS 1:1	45	0,374	179	4	1,1
PS ₉	PhTMOS:TMOS 2:1	79	0,652	293	4	1,2

Tabelul 2.18. Acilarea 2-pentanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin entrapare în sol-gel a lipazei Amano PS.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
PS _{nativă}	-	22	1,726	-	67	6
PS ₁	TMOS	0,3	0,003	1	70	6
PS ₁₁	MeTMOS:TMOS 1:1	30	0,232	68	66	7
PS ₁₂	MeTMOS:TMOS 2:1	28	0,213	66	66	7
PS ₄	PrTMOS:TMOS 1:1	20	0,156	95	68	6
PS ₅	PrTMOS:TMOS 2:1	58	0,446	211	52	7
PS ₆	OcTMOS:TMOS 1:1	71	0,517	290	37	6
PS ₇	OcTMOS:TMOS 2:1	45	0,323	124	57	6
PS ₈	PhTMOS:TMOS 1:1	34	0,256	197	65	7
PS ₉	PhTMOS:TMOS 2:1	64	0,499	361	48	9

Tabelul 2.19. Acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin entraparea în sol-gel a lipazei Amano PS.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regāsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
PS _{nativă}	-	31	2,661	-	84	17
PS ₁	TMOS	10	0,082	18	99	>100
PS ₁₁	MeTMOS:TMOS 1:1	28	0,242	46	87	20
PS ₁₂	MeTMOS:TMOS 2:1	41	0,332	66	83	19
PS ₄	PrTMOS:TMOS 1:1	31	0,258	102	87	21
PS ₅	PrTMOS:TMOS 2:1	58	0,473	145	70	22
PS ₆	OcTMOS:TMOS 1:1	66	0,550	200	50	12
PS ₇	OcTMOS:TMOS 2:1	65	0,552	138	53	14
PS ₈	PhTMOS:TMOS 1:1	54	0,442	221	82	40
PS ₉	PhTMOS:TMOS 2:1	60	0,493	232	64	17

Tabelul 2.20. Acilarea 2-heptanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin entraparea în sol-gel a lipazei Amano PS.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regāsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
PS _{nativă}	-	28	2,645	-	87	20
PS ₁	TMOS	7	0,031	12	99	>100
PS ₁₁	MeTMOS:TMOS 1:1	15	0,142	27	87	17
PS ₁₂	MeTMOS:TMOS 2:1	33	0,287	58	87	22
PS ₄	PrTMOS:TMOS 1:1	22	0,202	80	89	22
PS ₅	PrTMOS:TMOS 2:1	48	0,442	136	85	29
PS ₆	OcTMOS:TMOS 1:1	57	0,539	197	74	30
PS ₇	OcTMOS:TMOS 2:1	56	0,503	126	76	29
PS ₈	PhTMOS:TMOS 1:1	30	0,266	134	91	31
PS ₉	PhTMOS:TMOS 2:1	56	0,239	198	77	34

Tabelul 2.21. Acilarea 2-octanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin entrapare în sol-gel a lipazei Amano PS.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
PS _{nativă}	-	38	3,282	-	78	13
PS ₁	TMOS	-	-	-	-	-
PS ₁₁	MeTMOS:TMOS 1:1	13	0,114	18	78	9
PS ₁₂	MeTMOS:TMOS 2:1	39	0,347	56	75	11
PS ₄	PrTMOS:TMOS 1:1	25	0,221	71	80	12
PS ₅	PrTMOS:TMOS 2:1	58	0,492	122	71	26
PS ₆	OcTMOS:TMOS 1:1	68	0,597	176	45	15
PS ₇	OcTMOS:TMOS 2:1	64	0,569	115	54	12
PS ₈	PhTMOS:TMOS 1:1	38	0,329	134	79	14
PS ₉	PhTMOS:TMOS 2:1	59	0,530	202	69	29

Pe baza datelor din tabelele 2.17 - 2.21 s-au realizat figurile 2.12 și 2.13 care prezintă randamentul de regăsire a activității și excesul enantiomeric e.e. după 24 de ore de reacție la acilarea enantioselectivă a alcoolilor studiați prin biocataliză cu preparate enzimice obținute prin imobilizarea lipazei Amano PS prin entrapare în sol-gel.

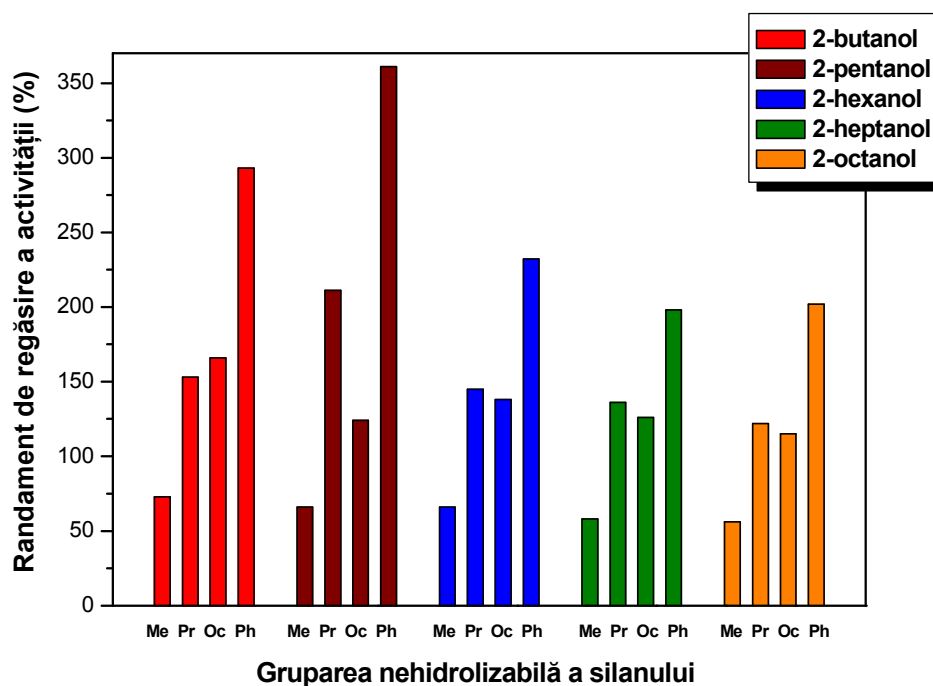


Figura 2.12. Dependența eficienței catalitice de natura grupei nehidrolizabile a silanului precursor și de substratul utilizat, în cazul preparatelor enzimatiche de lipază Amano PS immobilizate folosind precursori trimetoxisilanici, la raport molar TMOS/silan cu grupare nehidrolizabilă de 1:2.

Așa cum se poate observa din Figura 2.12 și tabelele 2.17 - 2.21, eficiența imobilizării exprimată prin randamentul de regăsire a activității a fost mai ridicată la utilizarea PhTMOS ca și silan precursor. Preparatele obținute cu PrTMOS (OcTMOS în cazul 2-butanolului) și PhTMOS în matricea sol-gel au dat rezultate bune pentru toate substraturile utilizate.

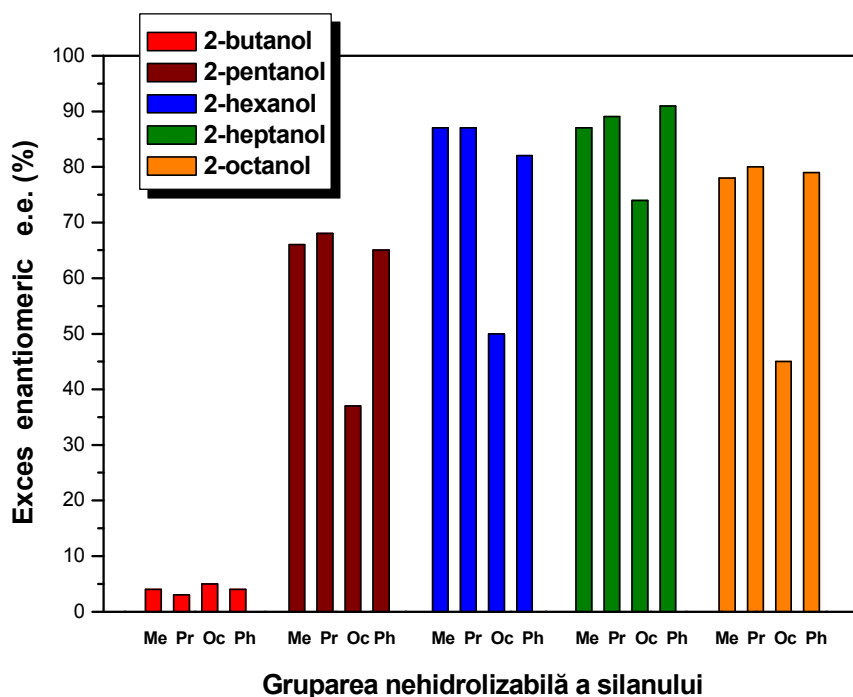


Figura 2.13. Dependența excesului enantiomeric de natura grupei nehidrolizabile a silanului precursor și de substratul utilizat, în cazul preparatelor enzimactice de lipază Amano PS imobilizate folosind precursori trimetoxisilanici, la raport molar TMOS/silan cu grupare nehidrolizabilă de 1:1.

În ceea ce privește enantioselectivitatea (Figura 2.13), au fost obținute valori ale excesului enantiomeric foarte mici în cazul 2-butanolului, destul de bune pentru 2-pentanol, 2-hexanol și 2-octanol și excelente pentru 2-heptanol atunci când pentru imobilizare s-au utilizat precursori silanici cu gruparea nehidrolizabilă propil sau fenil.

Ținând cont atât de eficiența imobilizării cât și de enantioselectivitate, se poate spune că cel mai bun silan precursor a fost PhTMOS, cu valori ale randamentului de regăsire între 200-360% și ale excesului enantiomeric de peste 65% pentru toate substraturile folosite, exceptând 2-butanolul.

2.2.4. Concluzii

În cazul preparatelor imobilizate cu lipază Amano AK

1. Evoluția în timp a conversiei alcoolului și a excesului enantiomeric (e.e.) a *R*-esterului în reacțiile de acilare ale 2-heptanolului și 2-octanolului prin biocataliză cu preparatul obținut prin entrapare în sol-gel cu OcTMOS/TMOS la raport molar de 2:1 arată că valorile optime au fost obținute în punctele de intersecție dintre curba conversiei și dreapta excesului enantiomeric, la 5 ore pentru 2-octanol și 10 ore pentru 2-heptanol.

2. Prezența grupei nehidrolizabile octil în rețeaua sol-gel a dus la cele mai mari valori ale conversiei și ale randamentului de regăsire a activității.

3. Valori ridicate ale enantioselectivității au fost obținute, în special pentru substratul 2-hexanol, atunci când pentru imobilizare s-au utilizat precursori silanici având ca grupe nehidrolizabile propil și fenil.

4. Ținând cont atât de eficiența imobilizării cât și de enantioselectivitate, se poate spune că cel mai bun silan precursor a fost PrTMOS, cu valori ale randamentului de regăsire între 30-89% și ale excesului enantiomeric de peste 65% pentru toate substraturile folosite exceptând 2-butanolul.

În cazul preparatelor imobilizate cu lipază Amano PS

1. Prezența grupei nehidrolizabile fenil în rețeaua sol-gel a dus la cele mai mari valori ale conversiei și ale randamentului de regăsire a activității.

2. Valori ridicate ale enantioselectivității au fost obținute, în general pentru toate substraturile, atunci când pentru imobilizare s-au utilizat precursori silanici cu grupa nehidrolizabilă propil (în cazul 2-butanolului octil) și fenil.

3. Ținând cont atât de eficiența imobilizării cât și de enantioselectivitate, se poate spune că cel mai bun silan precursor a fost PhTMOS.

2.3. Studiul acilării enantioselective a alcoolilor secundari alifatici prin biocataliză cu lipaza Amano AK dublu imobilizată

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 repartiție 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.

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 (Kawakami și Yoshida, 1996; Kawakami și Furukawa, 1998).

Nu avem informații referitoare la studii privind influența imobilizării prin entrapare combinată cu adsorbție asupra enantioselectivității enzimei. Imobilizarea este considerată o metodă care îmbunătățește stabilitatea enzimei și nu influențează enantioselectivitatea. Studiile noastre anterioare (Péter și colab., 2005; Kiss și colab., 2007) au arătat însă că enantioselectivitatea lipazei poate fi influențată de metoda de imobilizare. În rezoluțiile cinetice bazate pe viteze diferite de formare ale celor doi enantiomeri, efectele sterice și conformaționale sunt importante și pot fi influențate de micromediul existent în jurul zonei catalitice active a enzimei în urma imobilizării.

Acest studiu a urmărit obținerea de preparate enzimatiche cu lipază din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) dublu imobilizată, cu caracteristici de activitate și enantioselectivitate superioare, care au fost utilizate în acilarea enantioselectivă a unor alcooli secundari racemici: 2-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol, 2-heptanol și 2-octanol cu acetat de vinil în n-hexan (mediu de reacție) și cu n-decan sau n-dodecan (în cazul 2-hexanolului) ca standard intern pentru analiza gaz-cromatografică cantitativă (a se vedea Cap. 3.3.2.).

2.3.1. Lipază Amano AK dublu imobilizată utilizând derivați metoxisilanici și Celite 545

Unul din obiectivele acestor cercetări a fost studierea influenței naturii grupeii nehidrolizabile din silanul precursor asupra performanțelor lipazei Amano AK imobilizate prin metoda combinată, utilizând ca silani precursori derivați metoxisilanici (Zarcu și colab., 2009^c).

Au fost obținute preparate enzimatiche care conțin în matricea de silicagel grupări alchil: metil, propil, octil sau fenil, provenite din grupările nehidrolizabile ale metoxisilanilor folosiți ca precursori și TMOS la un raport molar de 1:1 (Metoda 6). Prezența acestor grupări are rolul de a stabili conformația lipazei cu capacul hidrofob care închide accesul spre centrul activ deplasat în urma interacțiunilor cu componentele hidrofobe ale suportului. Probabil că aceste grupări interacționează și cu suportul utilizat (Celite 545) prin legături de natură hidrofobă, ajutând la fixarea mai bună a întregului sistem sol-gel-enzimă pe adsorbant. S-a menținut în toate cazurile același raport de masă între cantitatea totală de silani și adsorbant. Preparatele obținute au fost utilizate ca și biocatalizatori în reacțiile de acilare a unor alcooli secundari, iar rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele 2.22 - 2.26.

Tabelul 2.22. Acilarea 2-butanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei Amano AK.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	60	2,458	-	7	1
AK ₅₄	MeTMOS:TMOS 1:1	3	0,014	6	34	2
AK ₅₅	PrTMOS:TMOS 1:1	18	0,073	31	16	1
AK ₅₆	OcTMOS:TMOS 1:1	25	0,103	48	11	1
AK ₅₇	PhTMOS:TMOS 1:1	55	0,230	74	14	2

Tabelul 2.23. Acilarea 2-pentanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei Amano AK.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	64	2,380	-	47	7
AK ₅₄	MeTMOS:TMOS 1:1	1,3	0,005	2	77	8
AK ₅₅	PrTMOS:TMOS 1:1	15	0,058	25	75	8
AK ₅₆	OcTMOS:TMOS 1:1	41	0,155	75	64	7
AK ₅₇	PhTMOS:TMOS 1:1	18	0,068	23	75	8

Tabelul 2.24. Acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei Amano AK.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	54	2,446	-	73	17
AK ₅₄	MeTMOS:TMOS 1:1	14	0,057	22	99	233
AK ₅₅	PrTMOS:TMOS 1:1	26	0,106	45	84	15
AK ₅₆	OcTMOS:TMOS 1:1	62	0,273	103	60	17
AK ₅₇	PhTMOS:TMOS 1:1	58	0,237	99	71	26

Tabelul 2.25. Acilarea 2-heptanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei Amano AK.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	31	2,630	-	74	9
AK ₅₄	MeTMOS:TMOS 1:1	6	0,027	10	85	13
AK ₅₅	PrTMOS:TMOS 1:1	18	0,082	32	86	16
AK ₅₆	OcTMOS:TMOS 1:1	38	0,146	64	91	37
AK ₅₇	PhTMOS:TMOS 1:1	15	0,061	18	81	11

Tabelul 2.26. Acilarea 2-octanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei Amano AK.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	53	2,095	-	55	6
AK ₅₄	MeTMOS:TMOS 1:1	2	0,007	3	63	5
AK ₅₅	PrTMOS:TMOS 1:1	15	0,061	30	65	5
AK ₅₆	OcTMOS:TMOS 1:1	55	0,230	127	60	9
AK ₅₇	PhTMOS:TMOS 1:1	15	0,063	24	64	5

Reacția de acilare a alcoolilor secundari a avut loc cu cele mai mari randamente de regăsire a activității enzimice totale atunci când al doilea silan precursor folosit la imobilizare a fost OcTMOS, adică matricea de sol-gel a conținut o grupare alchil mai lungă și deci caracterul hidrofob al întregului sistem a fost mai pronunțat.

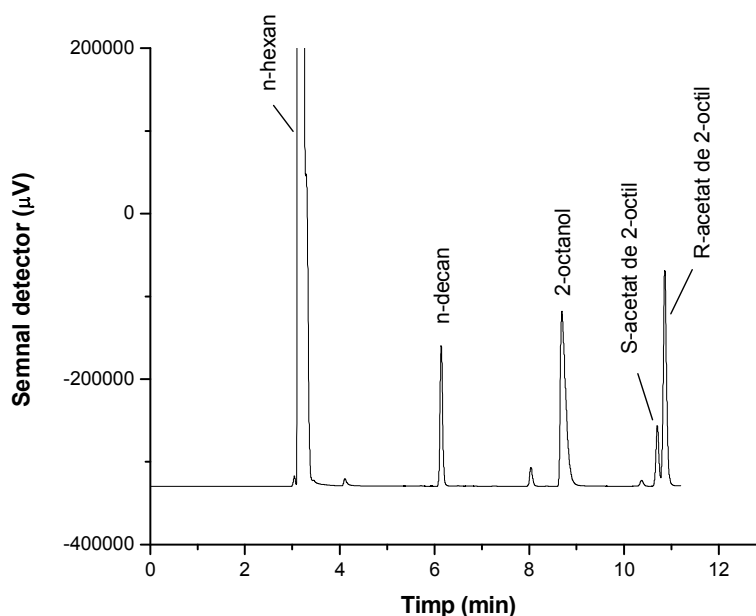


Figura 2.14. Cromatograma obținută în urma analizei pe coloana CYDEX-B a amestecului de reacție după 24 h de la acilarea 2-octanolului prin biocataliză cu lipaza Amano AK₅₆.

Dacă gruparea nehidrolizabilă a fost metil, activitatea enzimei imobilizate a fost mult mai mică, deși gelifierea a avut loc foarte repede. Acest fenomen a fost observat și în cazul preparatelor imobilizate doar prin entrapare în sol-gel și se datorează probabil formării unei rețele micro- sau nanoporoase foarte compacte care îngreunează mult accesul reactanților la centrul activ al enzimei. Pentru remedierea acestei probleme vor fi încercate diferite alte rețete de imobilizare.

În ce privește enantioselectivitatea acestor reacții, ele sunt ilustrate în Figura 2.15 care prezintă excesele enantiomerice obținute după 24 de ore de reacție și care s-a realizat pe baza datelor din tabelele 2.22 - 2.26.

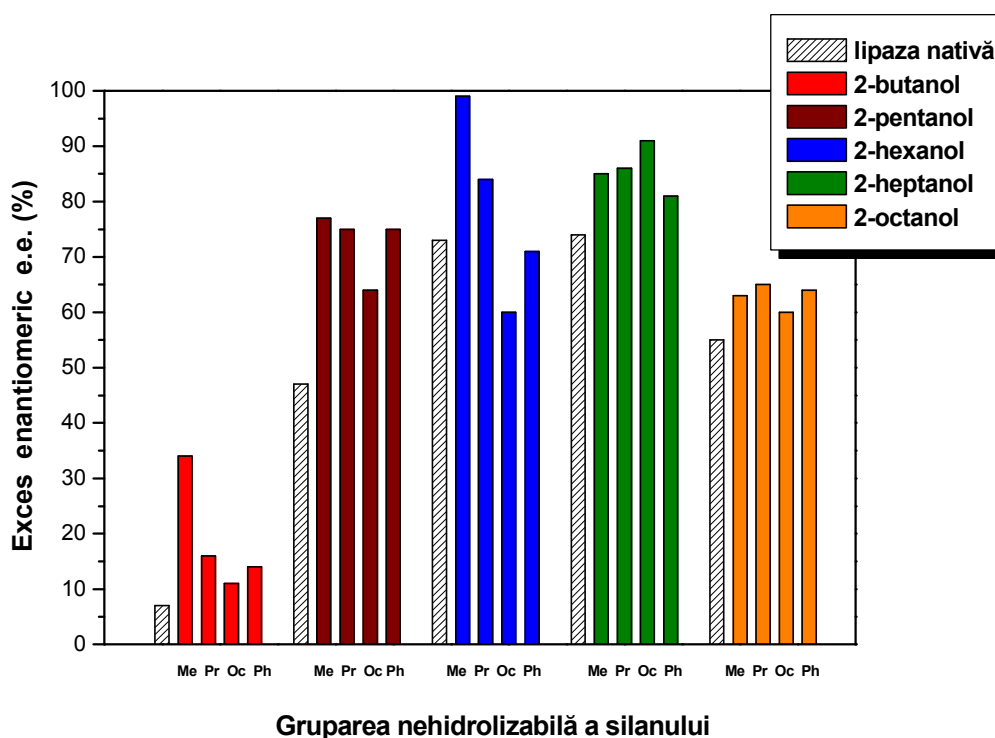


Figura 2.15. Influența naturii grupei nehidrolizabile a silanului precursor asupra excesului enantiomeric, în cazul preparatelor obținute prin dubla imobilizare a lipazei Amano AK.

Se poate observa că excesul enantiomeric după un timp de reacție de 24 de ore a crescut în toate cazurile comparativ cu enzima nativă. Nu apar diferențe semnificative între preparatele obținute cu diferiți precursori în ce privește valorile excesului enantiomeric, însă se observă că între alcoolii studiați au existat asemenea diferențe. În cazul 2-butanolului s-au obținut valori foarte mici ale excesului enantiomeric, așa cum s-a observat și în studiile anterioare. 2-Hexanolul și 2-heptanolul au fost acilați cu enantioselectivitate mai ridicată decât 2-pentanolul și 2-octanolul. Utilizarea grupării metil în compoziția sol-gelului a dus la excese enantiomerice ridicate pentru alcoolii studiați, dar (cu excepția substratului 2-hexanol) nu așa de mari încât să compenseze activitatea redusă a acestor preparate. Valorile indicelui enantiomeric E care ține cont atât de conversie cât și de excesul enantiomeric (tabelele 2.22 - 2.26) arată de asemenea că pentru substraturile 2-hexanol și 2-heptanol s-au obținut valori apropiate sau peste 20, care este cifra considerată limită pentru ca o reacție bazată pe discriminare cinetică să poată fi aplicată industrial.

2.3.2. Lipază Amano AK dublu imobilizată utilizând derivați etoxisilanici și Celite 545

A fost efectuat un studiu privind influența raportului molar al etoxisilanilor utilizați ca și silani precursori asupra performanțelor lipazei Amano AK imobilizate prin metoda combinată (Zarcu și colab., 2009^e). S-au obținut preparate enzimatiche prin entraparea în sol-gel cu TEOS și MeTEOS la diferite rapoarte molare, urmată de adsorbție pe Celite 545 (Metoda 6). Preparatele obținute au fost utilizate ca biocatalizatori în reacțiile de acilare ale alcoolilor secundari care au fost menționați anterior. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele 2.27 - 2.31.

Tabelul 2.27. Acilarea 2-butanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei Amano AK.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	60	2,458	100	7	1
AK ₁	Adsorbție	90	0,398	160	4	1
AK ₅₈	MeTEOS:TEOS 1:1	29	0,115	39	8	1
AK ₅₉	MeTEOS:TEOS 2:1	55	0,247	84	13	2
AK ₆₀	MeTEOS:TEOS 4:1	66	0,263	89	10	2

Tabelul 2.28. Acilarea 2-pentanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei Amano AK.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	64	2,380	100	47	7
AK ₁	Adsorbție	88	0,343	142	13	4
AK ₅₈	MeTEOS:TEOS 1:1	20	0,071	25	71	7
AK ₅₉	MeTEOS:TEOS 2:1	28	0,180	63	61	7
AK ₆₀	MeTEOS:TEOS 4:1	53	0,189	66	56	7

Tabelul 2.29. Acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei Amano AK.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	54	2,446	100	73	17
AK ₁	Adsorbție	79	0,345	139	26	6
AK ₅₈	MeTEOS:TEOS 1:1	33	0,132	45	78	12
AK ₅₉	MeTEOS:TEOS 2:1	49	0,211	72	78	18
AK ₆₀	MeTEOS:TEOS 4:1	51	0,198	67	72	14

Tabelul 2.30. Acilarea 2-heptanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei Amano AK.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	31	2,630	100	74	9
AK ₁	Adsorbție	71	0,297	111	40	9
AK ₅₈	MeTEOS:TEOS 1:1	8	0,033	10	78	9
AK ₅₉	MeTEOS:TEOS 2:1	25	0,098	31	79	11
AK ₆₀	MeTEOS:TEOS 4:1	35	0,139	33	75	10

Tabelul 2.31. Acilarea 2-octanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei Amano AK.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	53	2,095	100	55	6
AK ₁	Adsorbție	76	0,388	182	31	7
AK ₅₈	MeTEOS:TEOS 1:1	20	0,085	34	62	5
AK ₅₉	MeTEOS:TEOS 2:1	53	0,217	87	58	7
AK ₆₀	MeTEOS:TEOS 4:1	43	0,174	69	59	6

Prin adsorbție simplă pe Celite 545 s-au obținut valori ale activității de transesterificare ridicate, dar enantioselectivității scăzute comparativ cu metoda de entrapare combinată cu adsorbție. Studii anterioare au arătat că imobilizarea prin entrapare în sol-gel utilizând numai TEOS au dus la xerogeluri fără activitate de transesterificare, iar la o concentrație scăzută de grupări metil (raport molar 1:1) s-a observat de asemenea o pierdere semnificativă de activitate a enzimei imobilizate (30-45% din activitatea totală a fost recuperată).

Creșterea concentrației de grupări metil în amestecul de silani precursori a fost benefică până la un raport molar MeTEOS/TEOS de 2:1, dar o mărire a raportului la 4:1 a cauzat doar o ușoară creștere sau chiar o scădere a activității.

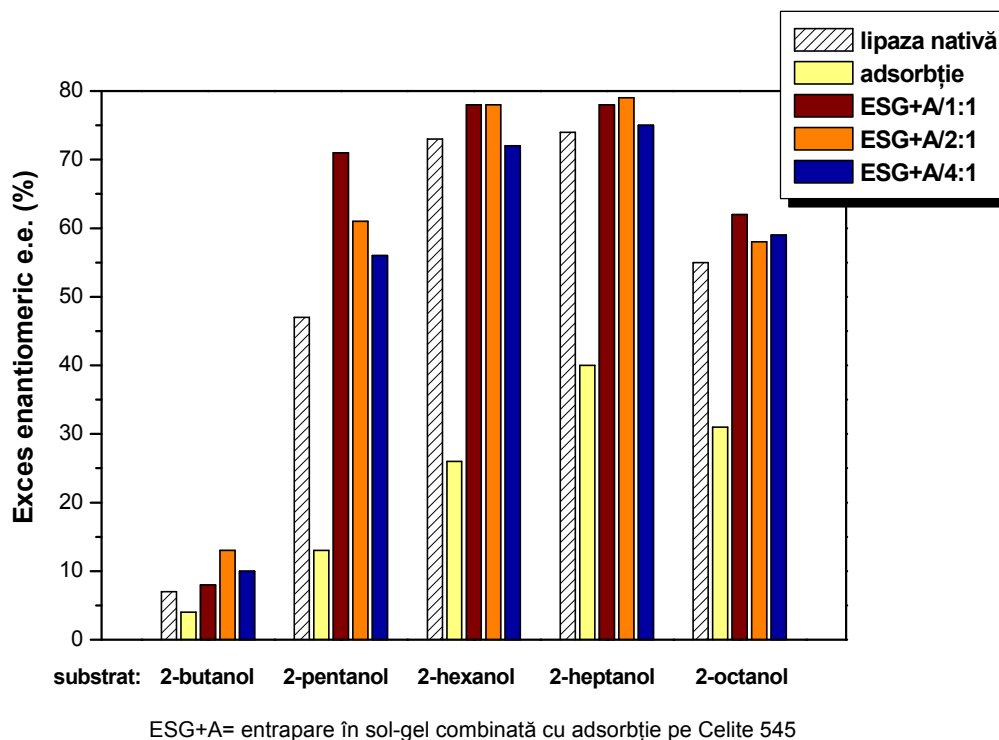


Figura 2.16. Influența raportului molar MeTEOS/TEOS și a metodei de imobilizare asupra excesului enantiomeric, în cazul preparatelor obținute prin dubla imobilizare a lipazei Amano AK.

În ceea ce privește enantioselectivitatea (Figura 2.16), nici lipaza nativă, nici preparatele imobilizate nu au putut distinge între izomerii optici ai 2-butanolului. Spre deosebire de acesta, la acilarea celorlalți alcooli secundari s-au obținut excese enantiomerice ridicate comparativ cu lipaza nativă sau adsorbită, 2-hexanolul și 2-heptanolul fiind cele mai bune substraturi. Cele mai mari valori pentru excesul enantiomeric și raportul enantiomeric au fost obținute pentru preparatul cu MeTEOS/TEOS la raport molar de 1:1, însoțite evident de valori ale activității scăzute, așa cum s-a menționat. Rezultă că pentru imobilizarea prin entrapare și adsorbție folosind ca silani precursori MeTEOS și TEOS raportul molar optim este de 2:1, cu randamente de regăsire a activității enzimatică de 63-77% și valori ale excesului enantiomeric de 58-78% la acilarea alcoolilor secundari menționați.

2.3.3. Studiul influenței grupării nehidrolizabile din silanul precursor asupra eficienței biocatalizatorilor

Natura grupării nehidrolizabile a avut o influență considerabilă asupra eficienței biocatalizatorilor obținuți cu diferiți precursori (etoxisilani sau metoxisilani) în raport molar de 1:1. La acilarea 2-hexanolului cu acetat de vinil catalizată de preparatele astfel imobilizate s-au obținut valori ale randamentului de regăsire a activității între 22-103% (Tabelul 2.32) (Zarcuța și colab., 2009^c).

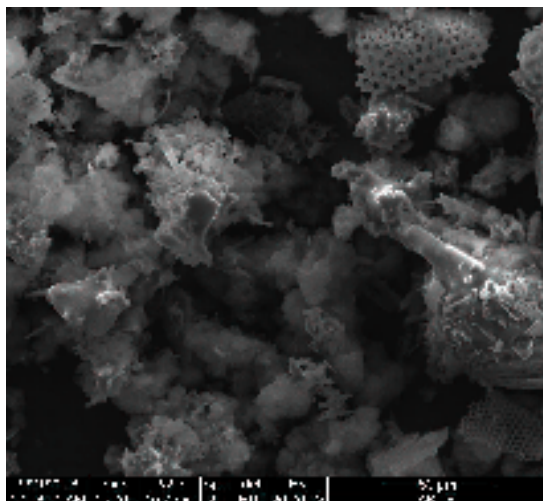
În mod obișnuit, în timpul procesului de imobilizare se produce o inactivare parțială a enzimei. La imobilizarea prin închidere în sol-gel, etanolul și metanolul, introduse ca mediu de reacție pentru formarea gelului sau rezultate în urma reacției de policondensare, pot avea efect inhibitor. Dacă gruparea nehidrolizabilă a fost metil, au fost observate diferențe importante între preparatele obținute pe bază de etoxi-, respectiv metoxisilani, sugerând un efect inhibitor mai semnificativ al metanolului. Creșterea lanțului alchil a fost benefică pentru activitate, demonstrând că prezența grupărilor hidrofobe în matricea de sol-gel este importantă chiar dacă sunt prezente și interacțiunile specifice adsorbției.

Grupările fenil au fost cele mai eficiente pentru preparatele obținute cu precursori etoxisilanici, iar cele octil în cazul preparatelor cu precursori metoxisilanici. Valorile raportului enantiomeric (E) nu au diferit semnificativ față de enzima nativă, chiar dacă valorile excesului enantiomeric după 24 ore de reacție au fost mai mari pentru preparatele imobilizate. Activitățile scăzute ale preparatelor ce conțin grupări metil au anulat avantajul unor valori mult mai ridicate ale raportului enantiomeric (E=233), în ce privește o posibilă utilizare pe scară largă a acestui tip de biocatalizator. Au fost încercate mai multe rețete de imobilizare pentru a depăși această problemă, dar nu s-au obținut îmbunătățiri semnificative.

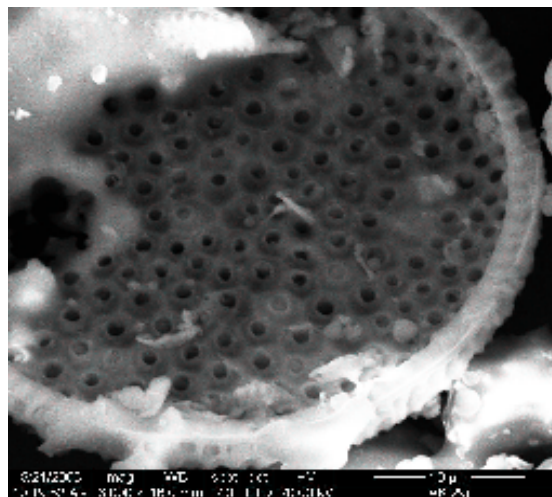
Tabelul 2.32. Influența naturii silanilor precursori la acilarea 2-hexanolului cu acetat de vinil catalizată de lipaza Amano AK imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar=1:1)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AKnativă	-	2,446	-	73	17
AK ₁	Adsorbție	0,345	139	26	6
AK ₅₄	MeTMOS:TMOS	0,057	22	99	233
AK ₅₅	PrTMOS:TMOS	0,106	45	84	15
AK ₅₆	OcTMOS:TMOS	0,273	103	60	17
AK ₅₇	PhTMOS:TMOS	0,237	99	71	26
AK ₅₈	MeTEOS:TEOS	0,132	45	78	12
AK ₆₁	EtTEOS:TEOS	0,113	47	70	7
AK ₆₂	PhTEOS:TEOS	0,232	101	69	15

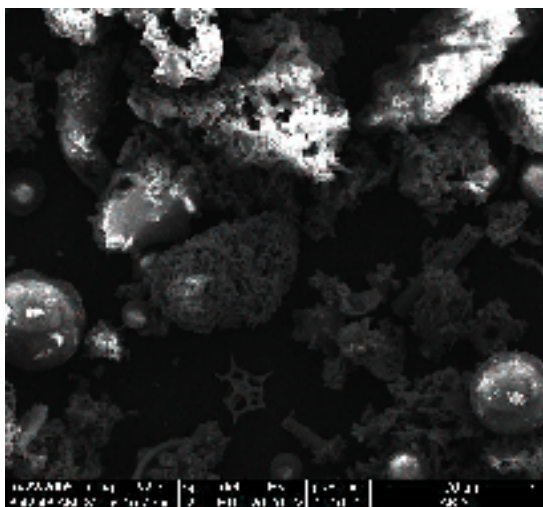
Este important de știut cum are loc procesul de imobilizare, prin închiderea enzimei și depunerea simultană a stratului de sol-gel sau prin formarea sol-gelului în jurul enzimei adsorbite în prealabil. S-a încercat facilitarea primului mecanism, utilizând o tehnică de imobilizare care a implicat adăugarea adsorbentului (Celite) numai după începerea gelifierii. Pentru a investiga morfologia preparatelor imobilizate s-a folosit tehnica de microscopie de scanare electronică SEM (Figura 2.17).



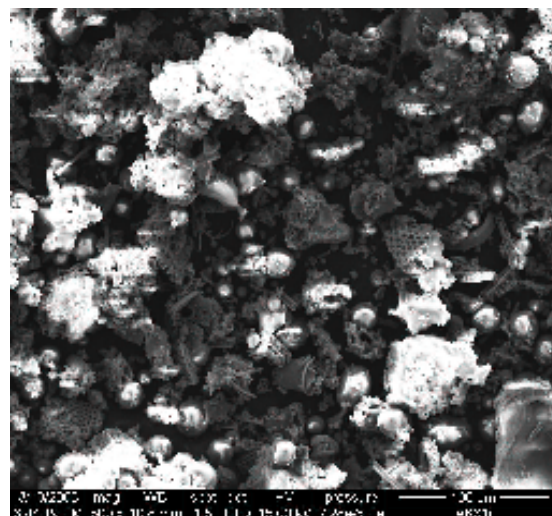
(a) MeTMOS/TMOS 1:1



(b) PrTMOS/TMOS 1:1



(c) OcTMOS/TMOS 1:1



(d) PhTMOS/TMOS 1:1

Figura 2.17. Imaginile SEM ale preparatelor cu lipază Amano AK imobilizate prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție, pe bază de TMOS și (a) MeTMOS, (b) PrTMOS, (c) OcTMOS respectiv (d) PhTMOS.

Din Figura 2.17 se pot observa (a) structuri aciculare aglomerate și poroase (b) structură poroasă, (c) și (d) structuri poroase, pe alocuri structuri aciculare și sfere aglomerate.

Astfel pare plauzibil că enzima entrapată în sol-gel a fost depozitată pe suprafața adsorbentului. În general preparatele obținute au un aspect suficient de poros pentru a putea spune că adsorbția s-a realizat în principal la suprafață, nu în structura internă a adsorbentului. Probabil că enzima depozitată în porii interiori a pierdut parțial activitatea datorită accesului mai dificil al reactanților la centrul activ.

2.3.4. Studiul influenței grupării alchil din alcoolul secundar asupra eficienței biocatalitice

Pentru preparatul cel mai eficient dintre cei cu grupare nehidrolizabilă de tip alchil s-a realizat un studiu al influenței naturii lanțului alchil al alcoolului secundar (Zarcuța și colab., 2009^c). Silanii precursori folosiți au fost OcTMOS și TMOS la un raport molar de 1:1 (Metoda 6). Reacția de acilare cu acetat de vinil a fost realizată în hexan timp de 24 h la temperatura de 40°C.

Tabelul 2.33. Acilarea alcoolilor secundari prin biocataliză cu lipază din Amano AK nativă sau imobilizată (AK₅₆) prin metoda combinată cu precursori OcTMOS și TMOS la raport molar de 1:1.

Substrat	Activitate ($\mu\text{moli}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)		$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)		E	
	Nativă	Imob.		Nativă	Imob.	Nativă	Imob.
2-butanol	2,458	0,103	48	7	11	1	1
2-pentanol	2,380	0,155	75	47	64	7	7
2-hexanol	2,446	0,273	103	73	60	17	17
2-heptanol	2,630	0,146	64	74	91	9	37
2-octanol	2,095	0,230	127	55	60	6	9

Așa cum rezultă din datele tabelului 2.33, cel mai mare randament de regăsire a activității s-a obținut în cazul alcoolului secundar cu lanțul alchil cel mai lung (2-octanol), iar cea mai ridicată enantioselectivitate s-a obținut pentru 2-heptanol. Un caracter hidrofob mai accentuat, nu numai în ceea ce privește matricea sol-gel ci și structura substratului, a fost benefic pentru activitatea preparatelor imobilizate. Randamentul de regăsire a activității enzimatică a fost peste 100% în cazul celor mai active preparate, demonstrând eficiența metodei de imobilizare. Excesul enantiomeric folosind enzima imobilizată a crescut în toate cazurile în comparație cu lipaza nativă, chiar dacă diferențele nu au fost mari. În ceea ce privește raportul enantiomeric (E), pentru 2-heptanol preparatul imobilizat a înregistrat o enantioselectivitate remarcabilă asociată cu o activitate ridicată.

2.3.5. Evaluarea comparativă a metodelor de imobilizare prin adsorbție și entrapare în sol-gel, simplă și combinată

Pentru acilarea enantioselectivă a 2-hexanolului s-a realizat o evaluare comparativă a metodelor de imobilizare prin adsorbție (Metoda 1), entrapare în sol-gel (Metoda 2) și entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (Metoda 6), utilizând silani precursori cu o grupare nehidrolizabilă fenil (PhTMOS/TMOS, respectiv PhTEOS/TEOS la raport molar de 1:1) (Zarcuța și colab., 2009^c). Condițiile de reacție au fost aceleași cu cele prezentate anterior.

Așa cum rezultă din Figura 2.18, imobilizarea prin adsorbție a dat cele mai mari randamente de regăsire a activității, dar enantioselectivitatea preparatului rezultat a fost scăzută. Considerând ambele metode de imobilizare, entraparea în sol-gel și metoda combinată, precursorii etoxisilanici au fost mai eficienți în ceea ce privește randamentul de regăsire a activității preparatelor enzimatic rezultate, în timp ce preparatele obținute cu precursori metoxisilanici au dus la enantioselectivități mai ridicate. Comparând rezultatele obținute prin metoda de entrapare în sol-gel cu cele prin metoda combinată cu adsorbție, este evident că depunerea enzimei entrapate în sol-gel pe Celite 545 duce la randamente de regăsire a activității mai ridicate. Explicația este relativ simplă, deoarece repartiția enzimei entrapate pe o suprafață mare poate reduce riscul agregării enzimei în timpul procesului de imobilizare și evită limitările difuzionale. În ceea ce privește enantioselectivitatea, aceasta a fost mai ridicată pentru preparatele obținute doar prin închidere în sol-gel, dar și cele obținute prin metoda combinată au avut valori puțin mai ridicate decât în cazul lipazei native.

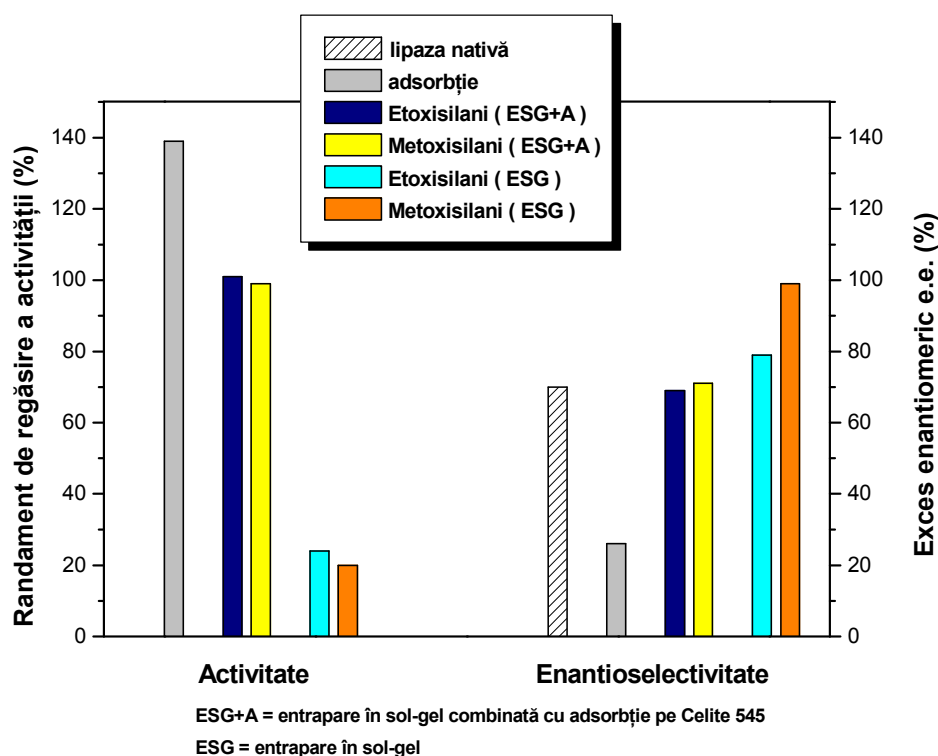


Figura 2.18. Dependența activității și a enantioselectivității lipazei Amamo AK imobilizată de metoda de imobilizare: adsorbție, entrapare în sol-gel cu derivați etoxi- sau metoxisilanici (cu o grupare nehidrolizabilă fenil) și entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție.

Biocatalizatorii în faza solidă au demonstrat deja că sunt instrumente importante pentru sinteza chimică organică, mai ales pentru rezoluția cinetică a amestecurilor racemice. Închiderea în sol-gel combinată cu adsorbție a determinat creșterea stabilității și activității lipazei, în timp ce enantioselectivitatea preparatelor enzimatică nu s-a modificat în mod semnificativ comparativ cu enzima nativă. Atât precursorii etoxisilanici cât și cei metoxisilanici s-au dovedit a fi eficienți pentru formarea matricii de sol-gel, etoxisilanii ducând la activități mai mari deoarece timpul de gelificare este mai lung și nu există pericolul ca efectul termic al reacțiilor de condensare să determine inactivarea enzimei datorită supraîncălzirii micromediului din jurul ei.

2.3.6. Concluzii

1. Biocatalizatorii în faza solidă sunt instrumente importante pentru sinteza chimică organică, mai ales pentru rezoluția cinetică a amestecurilor racemice. Entraparea în sol-gel combinată cu adsorbție a determinat creșterea stabilității și activității lipazei, în timp ce enantioselectivitatea preparatelor enzimatică nu s-a modificat în mod semnificativ comparativ cu enzima nativă.

2. Pentru toate substraturile folosite, cele mai mari valori ale randamentului de regăsire a activității enzimatică s-au obținut atunci când silanii precursori au fost OcTMOS/TMOS la raport de 1:1 (în cazul metoxisilanilor), respectiv MeTEOS/TEOS la raport de 2:1 (în cazul etoxisilanilor).

3. Între alcoolii studiați se observă diferențe semnificative în ceea ce privește enantioselectivitatea preparatelor enzimatică. În cazul 2-butanolului s-au obținut valori foarte mici ale excesului enantiomeric, așa cum s-a observat și în studiile anterioare. 2-Hexanolul și 2-heptanolul au fost acilați cu enantioselectivitate mai ridicată decât 2-pentanolul și 2-octanolul.

4. Natura grupării nehidrolizabile a avut o influență considerabilă asupra eficienței biocatalizatorilor obținuți prin metoda combinată cu diferiți precursori (etoxisilani sau metoxisilani) la raport molar de 1:1, la acilarea 2-hexanolului cu acetat de vinil. Creșterea lanțului alchil a fost benefică pentru activitate, grupările fenil au fost cele mai eficiente pentru preparatele obținute cu precursori etoxisilanici, iar cele octil în cazul preparatelor cu precursori metoxisilanici.

5. Pentru acilarea enantioselectivă a 2-hexanolului cu preparate obținute prin entraparea în sol-gel și metoda combinată, utilizând silani precursori cu o grupare nehidrolizabilă fenil (PhTMOS/TMOS, respectiv PhTEOS/TEOS la raport molar de 1:1), precursorii etoxisilanici au fost mai eficienți în ceea ce privește randamentul de regăsire a activității preparatelor enzimatică rezultate, în timp ce preparatele obținute cu precursori metoxisilanici au dus la enantioselectivități mai ridicate.

6. Comparând rezultatele obținute cu preparate imobilizate prin metoda de entrapare în sol-gel cu cele prin metoda combinată cu adsorbție, este evident că depunerea enzimei entrapate în sol-gel pe Celite 545 duce la randamente de regăsire a activității mai ridicate. În ceea ce privește enantioselectivitatea, aceasta a fost mai ridicată pentru preparatele obținute doar prin închidere în sol-gel, dar și cele obținute prin metoda combinată au avut valori puțin mai ridicate decât în cazul lipazei native.

2.4. Studiul utilizării lichidelor ionice ca aditivi la imobilizarea lipazei Amano AK prin metoda sol-gel

Lichidele ionice sunt compuși considerați de mare viitor în calitate de solvenți “curați”, care datorită nevolatilității lor și stabilității termice ridicate vor putea înlocui solvenții organici volatili utilizați la ora actuală în majoritatea proceselor. Este cunoscut faptul că lichidele ionice sunt compatibile cu enzimele, putând avea chiar un efect de stabilizare a acestora. În biocataliza cu enzime imobilizate prin metoda sol-gel a apărut însă și o altă posibilitate, aceea de a folosi lichidele ionice în calitate de aditivi în procesul de entrapare. Ele pot fi folosite pentru a îmbunătăți proprietățile gelului, în principal printr-un efect de stabilizare, protejând enzima de alcoolul eliberat în timpul procesului de entrapare în sol-gel precum și de efectele contractării gelului în timpul uscării. Lichidele ionice protejează structura gelului prin umplerea porilor, obținându-se astfel o structură mezoporoasă și foarte ordonată de silice (Lee și colab., 2007^a). Aceste cercetări se află încă în stadiu incipient pe plan mondial, de aceea datele de literatură sunt foarte puține. Studiile efectuate în cadrul acestei teze au urmărit realizarea unei contribuții în acest domeniu important, prin investigarea sistematică a modalităților în care utilizarea ca aditiv a lichidelor ionice în timpul procesului de imobilizare prin metoda sol-gel poate constitui o alternativă pentru obținerea de biocatalizatori cu performanțe superioare.

2.4.1. Influența naturii lichidului ionic

Varietatea structurală a lichidelor ionice este extrem de mare, atât în ce privește partea cationică cât și cea anionică. Dintre acestea, interes pentru biocataliză prezintă cele care sunt lichide la temperatura camerei, în special cele a căror parte cationică este constituită din ionul de 1-alkil-3-metil-imidazoliu $[C_n\text{mim}]^+$ (n fiind numărul de atomi de carbon din gruparea alchil). Partea anionică poate fi constituită dintr-un anion anorganic sau organic. În acest studiu am urmărit stabilirea influențelor pe care structurile grupărilor anionice și cationice din lichidele ionice utilizate ca aditivi le pot avea asupra performanțelor biocatalizatorilor (Zarcula și colab., 2009^a). Au fost testate 10 lichide ionice, utilizate ca și aditivi la imobilizarea lipazei Amano AK prin entrapare în sol-gel, înlocuind PEG în rețeta inițială de imobilizare (Metoda 2). Matricea sol-gel a fost obținută utilizând ca silani precursori OcTMOS și TMOS în raport molar de 1:1.

Au fost folosite:

- lichide ionice cu diferite grupe alchil în cationul imidazolic și anionii BF_4^- , PF_6^- sau Tf_2N^- : $[\text{Pmim}]\text{BF}_4$, $[\text{Bmim}]\text{BF}_4$, $[\text{Hmim}]\text{BF}_4$, $[\text{Omim}]\text{BF}_4$, $[\text{Bmim}]\text{PF}_6$, $[\text{Omim}]\text{PF}_6$ și $[\text{Bmim}]\text{Tf}_2\text{N}$.
- lichide ionice cu același cation și diferiți anioni: $[\text{Emim}]\text{BF}_4$, $[\text{Emim}]\text{OOCCH}_3$ și $[\text{Emim}]\text{OOCF}_3$.

Preparatele enzimice obținute au fost testate ca și biocatalizatori în reacțiile de acilare a unor alcooli secundari, iar rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 2.34.

Tabelul 2.34. Acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin entraparea în sol-gel a lipazei Amano AK cu OcTMOS/TMOS la raport molar de 1:1 și lichid ionic ca aditiv.

Cod preparat	Aditiv	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{moli}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	54	2,446	-	73	17
AK ₃₅	[Emim]BF ₄	56	0,432	113	76	29
AK ₃₆	[Pmim]BF ₄	58	0,440	123	70	22
AK ₂₃	[Bmim]BF ₄	56	0,421	133	76	29
AK ₃₇	[Hmim]BF ₄	59	0,481	155	67	19
AK ₂₄	[Omim]BF ₄	66	0,550	150	51	15
AK ₂₅	[Bmim]PF ₆	75	0,648	114	32	7
AK ₃₈	[Omim]PF ₆	42	0,321	94	79	15
AK ₃₉	[Bmim]Tf ₂ N	52	0,408	126	79	23
AK ₄₀	[Emim]OOCCH ₃	58	0,440	140	72	34
AK ₄₁	[Emim]OOCF ₃	52	0,425	117	76	19

Lichidele ionice cu același anion, tetrafluoroborat, au dus la activități ridicate ale preparatelor imobilizate odată cu creșterea hidrofobicității și a lungimii grupării alchil din partea cationică. 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 $\pi-\pi$ dintre grupările imidazol vecine au un rol important în formarea structurii rețelei (Zhou, Schattka și Antonietti, 2004). Cel mai probabil, lichidele ionice sunt parțial încorporate în matricea de silice și vor influența comportarea enzimei. O structură mezoporoasă ordonată ar trebui să favorizeze reacția enzimatică prin reducerea limitărilor difuzionale, dar natura hidrofilă a lichidelor ionice ar putea să inactiveze lipazele în medii neapoase prin eliminarea moleculelor de apă, esențiale pentru menținerea conformației active. Un substituent mai hidrofob în partea cationică a lichidului ionic poate echilibra această tendință și să ducă la activități mai mari. Enantioselectivitatea preparatelor imobilizate a fost mai mare atunci când s-a utilizat ca aditiv un lichid ionic cu o grupare alchil mai scurtă. Acest comportament poate fi explicat prin formarea unei rețele mai compacte favorizată de acești aditivi care induc o mai bună discriminare între izomerii optici ai substratului. Spre deosebire de acestea, lichidele ionice cu anionul hexafluoroborat au dus la valori mai mici ale activității enzimatică a preparatelor obținute.

În ceea ce privește lichidele ionice cu același cation, prezența în partea anionică a unor substituenți mai voluminoși (trifluoroacetat, comparativ cu acetat), a dus la scăderea activității și a enantioselectivității preparatelor enzimatică obținute. O

posibilă explicație ar putea fi din nou influența diferită a lichidelor ionice asupra formării unei structuri mezoporoase ordonate.

Pentru reacția studiată, lichidului ionic cu cele mai bune rezultate ca și aditiv de imobilizare a fost [Emim]OOCCH₃, cu o creștere de 40% a activității totale relative față de lipaza nativă și cu o valoare de 34 a raportului enantiomeric.

2.4.2. Optimizarea metodei de imobilizare a lipazei Amano AK folosind precursorii MeTMOS și TMOS și lichid ionic ca aditiv

Ținând cont de activitățile mici obținute în cazul utilizării precursorilor silanici cu grupare nehidrolizabilă metil, a fost necesară optimizarea metodei de imobilizare și în cazul folosirii lichidelor ionice ca aditivi. S-a realizat o evaluare comparativă a metodelor de imobilizare a lipazei Amano AK prin entrapare în sol-gel (Metoda 2, 3 sau 5), utilizând precursori silanici cu o grupare metil nehidrolizabilă (MeTMOS/TMOS în raport molar de 1:1) și lichid ionic ca aditiv. Rezultatele acilării enantioselective a 2-hexanolului catalizată de aceste preparatele sunt prezentate în Tabelul 2.35.

Tabelul 2.35. Eficiența catalitică a preparatelor obținute prin diferite metode de entrapare în sol-gel a lipazei Amano AK cu lichid ionic ca aditiv și MeTMOS/TMOS la raport molar de 1:1.

Cod preparat	Metoda	Caracteristici de imobilizare	IL	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	-	-	2,446	-	73	17
AK ₁₄	2	SOL prepolimer obținut prin cataliză cu NaF	[Bmim]BF ₄	0,081	17	75	9
AK ₁₅			[Omim]BF ₄	0,135	28	79	10
AK ₁₆			[Bmim]PF ₆	0,074	17	87	17
AK ₄₅	3	SOL prepolimer obținut în mediu de EtOH	[Bmim]BF ₄	0,029	6	22	2
AK ₄₆			[Omim]BF ₄	0,113	21	99	233
AK ₄₇			[Bmim]PF ₆	0,125	27	99	236
AK ₅₂	5	SOL prepolimer obținut prin cataliză cu HCl	[Omim]BF ₄	0,081	33	99	222
AK ₅₃			[Bmim]PF ₆	0,086	34	99	222

Comparând rezultatele obținute prin diversele variante de imobilizare în prezența lichidelor ionice se observă că s-au obținut valori apropiate ale randamentului de regăsire a activității, însă Metoda 5 a dus la rezultate mai bune. În ceea ce privește enantioselectivitatea s-au obținut valori de peste 98% ale excesului enantiomeric pentru toate preparatele obținute cu Metoda 3 și 5, indiferent de lichidul ionic utilizat, însă aceste rezultate trebuie să fie corelate și cu activități satisfăcătoare. Din acest punct de vedere, pe ansamblu preparatele obținute folosind ca aditiv [Bmim]PF₆ au dat cele mai bune rezultate.

Utilizând [Bmim]BF₄ s-au obținut valori reduse ale activității și enantioselectivității. În studiile care au urmat, a fost folosită Metoda 3 care a dus la cele mai mari activități efective ale preparatelor.

2.4.3. Influența structurii silanului precursor

În studiile prezentate în capitolele precedente, a fost investigată influența structurii precursorilor silanici asupra performanțelor catalitice ale lipazelor imobilizate prin metoda sol-gel. Prezența în sistem a unui lichid ionic poate modifica aceste influențe, de aceea a fost necesară realizarea unui asemenea studiu și în cazul imobilizărilor care utilizează ca aditiv lichide ionice. Au fost obținute preparate cu lipaza Amano AK imobilizată prin entrapare în sol-gel (Metoda 2 sau Metoda 3 în cazul MeTMOS) utilizând ca silani precursori derivați metoxisilanici, TMOS și un silan cu o grupare nehidrolizabilă: MeTMOS, PrTMOS, OcTMOS sau PhTMOS, la rapoarte molare de 1:1 și 1:2. S-au folosit trei tipuri de lichide ionice: [Bmim]BF₄, [Omim]BF₄ și [Bmim]PF₆ care s-au adăugat cu rolul de a stabiliza rețeaua împotriva colapsării în timpul maturării și uscării, dar și pentru o posibilă modificare a conformației enzimei în timpul imobilizării care ar putea influența favorabil enantioselectivitatea (Zarcu și colab., 2009^a). Preparatele obținute au fost testate în reacția de acilare a 2-hexanolului cu acetat de vinil în n-hexan, iar rezultatele după 24 de ore de reacție sunt prezentate în Tabelul 2.36. Pe baza datelor din acest tabel au fost realizate diagramele din figurile 2.19 și 2.20.

Tabelul 2.36. Acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin entraparea în sol-gel a lipazei Amano AK cu TMOS și alchil sau aril-trimetoxisilan la raport molar de 1:1 și 1:2 și lichid ionic ca aditiv.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Lichid Ionic	Activitate (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	η _{regăsire} (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	-	2,446	-	73	17
AK ₄₅	MeTMOS:TMOS 1:1	[Bmim]BF ₄	0,029	6	22	2
AK ₄₆		[Omim]BF ₄	0,113	21	> 99	> 100
AK ₄₇		[Bmim]PF ₆	0,125	27	> 99	> 100
AK ₄₈	MeTMOS:TMOS 2:1	[Bmim]BF ₄	0,118	25	77	9
AK ₄₉		[Omim]BF ₄	0,528	72	53	14
AK ₅₀		[Bmim]PF ₆	0,460	43	83	46
AK ₁₇	PrTMOS:TMOS 1:1	[Bmim]BF ₄	0,109	26	71	7
AK ₁₈		[Omim]BF ₄	0,483	109	77	24
AK ₁₉		[Bmim]PF ₆	0,474	102	70	22

AK ₂₀	PrTMOS:TMOS 2:1	[Bmim]BF ₄	0,366	80	73	12
AK ₂₁		[Omim]BF ₄	0,651	149	28	8
AK ₂₂		[Bmim]PF ₆	0,593	120	39	8
AK ₂₃	OcTMOS:TMOS 1:1	[Bmim]BF ₄	0,421	133	76	29
AK ₂₄		[Omim]BF ₄	0,550	150	51	15
AK ₂₅		[Bmim]PF ₆	0,648	114	32	7
AK ₂₆	OcTMOS:TMOS 2:1	[Bmim]BF ₄	0,605	124	32	6
AK ₂₇		[Omim]BF ₄	0,532	86	54	12
AK ₂₈		[Bmim]PF ₆	0,530	48	52	12
AK ₂₉	PhTMOS:TMOS 1:1	[Bmim]BF ₄	0,122	30	68	6
AK ₃₀		[Omim]BF ₄	0,354	106	82	18
AK ₃₁		[Bmim]PF ₆	0,245	65	61	5
AK ₃₂	PhTMOS:TMOS 2:1	[Bmim]BF ₄	0,218	61	80	12
AK ₃₃		[Omim]BF ₄	0,339	111	78	14
AK ₃₄		[Bmim]PF ₆	0,343	111	81	18

Așa cum se poate observa din Tabelul 2.36 și Figura 2.19.a, în prezența lichidelor ionice s-au obținut enzime imobilizate cu activitate ridicată, având loc chiar o activare în cazul celor mai bune preparate, care se reflectă în randamente de regăsire a activității totale de peste 100% după imobilizare. Pentru preparatele cu MeTMOS/TMOS la un raport molar de 1:1 s-au obținut și de data aceasta activități mai mici. Creșterea lungimii grupării alchil nehidrolizabile din molecula silanului precursor de la metil la octil duce la creșterea activității, în timp ce prezența grupării fenil a dus la o gelificare mai dificilă și o activitate ceva mai mică a preparatului. Creșterea densității grupărilor alchil nehidrolizabile în rețeaua de sol-gel (prin creșterea concentrației molare a silanului ce conține această grupare) a avut un efect favorabil asupra activității doar până la o anumită limită (Figura 2.19.b), așa cum se poate observa în cazul preparatelor cu octil, unde activitatea mai mare s-a înregistrat la un raport molar de 1:1 al silanilor (Figura 2.19.a). O explicație plauzibilă ar putea fi efectul nefavorabil al grupărilor hidrofobe în exces, care împiedică formarea unei structuri mezoporoase ordonate de gel necesară pentru obținerea unui preparat cu activitate ridicată.

Natura lichidului ionic a avut și ea influență asupra activității rezultate după imobilizare, aceasta fiind în general mai mare dacă s-a utilizat lichidul ionic cu o grupare alchil mai lungă în moleculă (octil) [Omim]BF₄ (Figura 2.19.a și Figura 2.19.b).

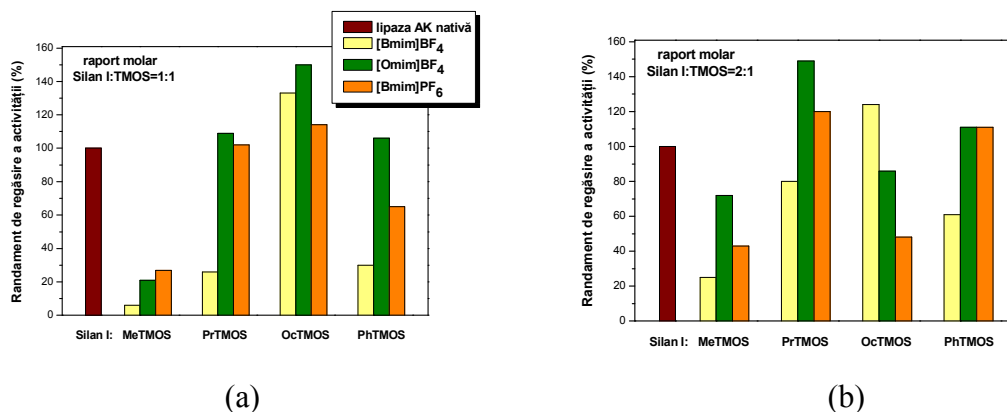


Figura 2.19. Influența naturii grupării alchil nehidrolizabile din silanul precursor asupra eficienței catalitice a lipazei Amano AK entrapată în sol-geluri cu lichide ionice ca aditivi la raport molar Silan I:TMOS de 1:1 (a) și 2:1 (b).

Activitatea ridicată a enzimei imobilizate nu a fost însă asociată și cu o enantioselectivitate ridicată (Figura 2.20.a și Figura 2.20.b), deoarece viteza de acilare a crescut în cazul ambilor enantiomeri. Preparatele imobilizate ce conțin metil ca grupare hidrofobă au avut în schimb o enantioselectivitate foarte ridicată, asociată însă cu o activitate redusă. Probabil că o structură mai compactă a rețelei de sol-gel care face mai dificil accesul substratului la centrul activ al enzimei determină în același timp creșterea discriminării cinetice între cei doi enantiomeri. În ce privește structura lichidului ionic aceasta a influențat enantioselectivitatea lipazei imobilizate în mod semnificativ doar atunci când s-a utilizat MeTMOS ca precursor și la o concentrație mai mare de grupări metil. În acest caz, lichidul ionic având în partea cationică o grupare alchil mai puțin voluminoasă (butil) și anion de hexafluorofosfat a determinat o enantioselectivitate mai mare.

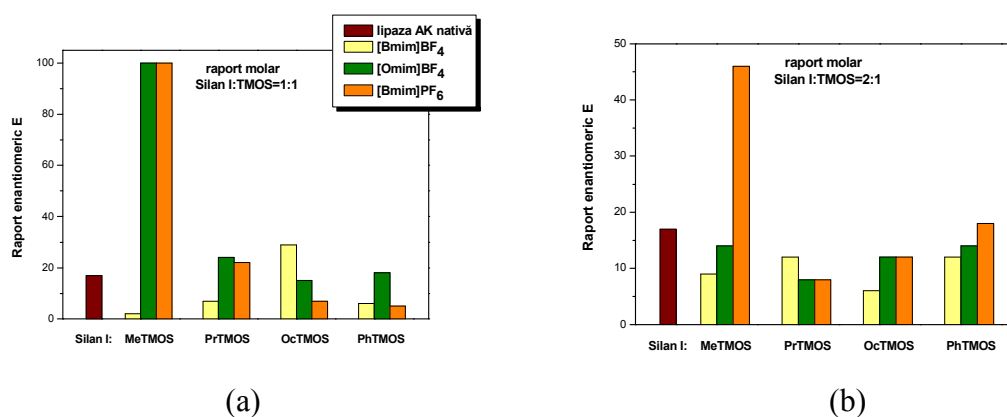


Figura 2.20. Influența structurii lichidului ionic și naturii grupării alchil nehidrolizabile din silanul precursor asupra enantioselectivității lipazei Amano AK entrapată în sol-gel cu Silan I:TMOS în raport molar de 1:1 (a) și 2:1 (b).

Pe ansamblu, se poate afirma că prin alegerea potrivită a condițiilor de imobilizare se pot obține în prezența lichidelor ionice preparate enzimatiche cu proprietăți superioare enzimei libere. Se poate alege fie obținerea unei enzime imobilizate foarte active fie a uneia cu enantioselectivitate foarte mare, după necesitățile procesului respectiv.

2.4.4. Influența structurii substratului și a lichidului ionic

A fost investigată influența structurii a șase alcooli secundari alifatici (cu creșterea lanțului alchil de la 2-butanol la 2-nonanol) asupra performanțelor lipazei Amano AK imobilizată în prezență de lichid ionic. Preparatele enzimaticе au fost obținute prin entrapare în sol-gel (Metoda 2) cu OcTMOS/TMOS la raport molar de 1:1, iar lichidele ionice utilizate au fost [Emim]OOCCH₃ (preparatul AK₄₀) sau [Omim]BF₄ (preparatul AK₂₄) (Zarcuța și colab., 2009^a). Reacția studiată a fost și în acest caz acilarea cu acetat de vinil în n-hexan, la 40°C. Rezultatele obținute după 24 de ore de reacție sunt prezentate în tabelul 2.37, iar pe baza acestora au fost realizate figurile 2.21 și 2.22. Pentru calculul randamentelor de regăsire, au fost utilizate valorile activității lipazei AK native față de substraturile în cauză. Aceste valori sunt de asemenea trecute în tabelul 2.37.

Tabelul 2.37. Acilarea alcoolilor secundari prin biocataliză cu lipază Amano AK nativă și imobilizată în sol-gel cu OcTMOS/TMOS la raport molar de 1:1 și lichid ionic ca aditiv.

Substrat	Lichid ionic	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
2-BUTANOL	- (lipază nativă)	2,458	-	7	1
	[Emim]OOCCH ₃	0,496	157	7	1
	[Omim]BF ₄	0,667	181	13	2
2-PENTANOL	- (lipază nativă)	2,380	-	47	6
	[Emim]OOCCH ₃	0,457	149	54	6
	[Omim]BF ₄	0,611	171	34	7
2-HEXANOL	- (lipază nativă)	2,446	-	73	17
	[Emim]OOCCH ₃	0,440	140	72	34
	[Omim]BF ₄	0,550	150	51	15
2-HEPTANOL	- (lipază nativă)	2,630	-	74	9
	[Emim]OOCCH ₃	0,360	107	73	12
	[Omim]BF ₄	0,508	129	63	20
2-OCTANOL	- (lipază nativă)	2,095	-	55	6
	[Emim]OOCCH ₃	0,494	183	49	7
	[Omim]BF ₄	0,738	235	36	8
2-NONANOL	- (lipază nativă)	2,030	-	63	8
	[Emim]OOCCH ₃	0,504	193	56	6
	[Omim]BF ₄	0,668	219	34	7

Așa cum rezultă din Tabelul 2.37 și Figura 2.21, pentru ambele preparate de lipază Amano AK s-au obținut valori ale randamentului de regăsire a activității enzimaticе de peste 100% la toate substraturile testate. În cazul alcoolilor secundari cu radical alchil mai lung (2-octanol și 2-nonanol), activarea în urma imobilizării a avut ca efect creșterea de peste două ori a activității totale comparativ cu enzima nativă. Preparatul având ca aditiv lichidul ionic [Omim]BF₄ a avut activitate mai mare pentru majoritatea substraturilor.

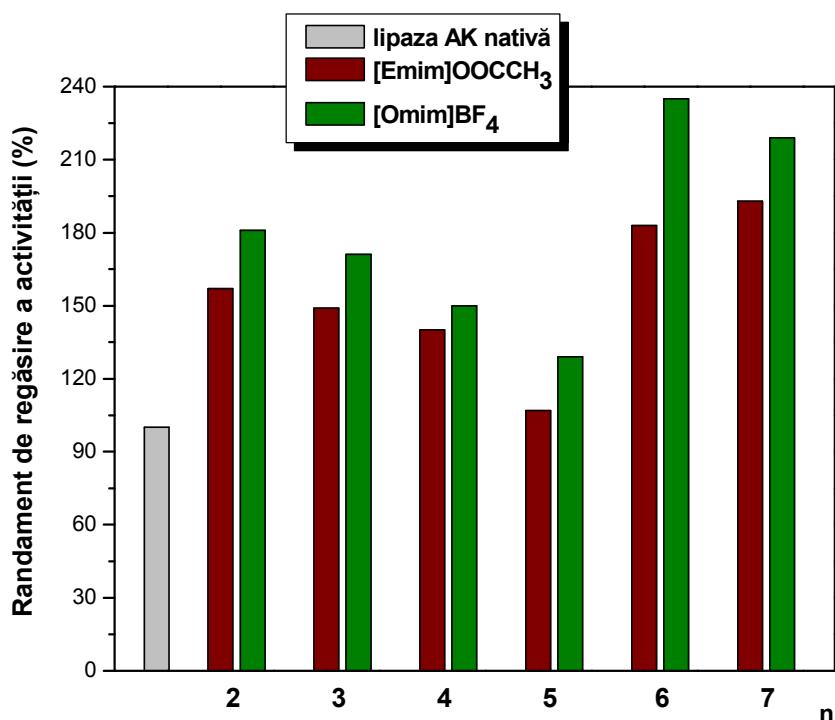


Figura 2.21. Dependența randamentului de regăsire a activității lipazei Amano AK imobilizată în sol-gel de numărul de atomi de carbon (n) din gruparea alchil a alcoolului secundar și de natura lichidului ionic utilizat ca aditiv.

În ceea ce privește enantioselectivitatea preparatelor, din Figura 2.22 se observă că pentru toți alcoolii studiați au fost obținute valori ale raportului enantiomeric E comparabile sau mai mari decât ale lipazei native. Creșterea enantioselectivității s-a observat în special în cazul 2-hexanolului și 2-heptanolului, ceea ce este esențial în aplicațiile tehnologice, deoarece alcoolii secundari optic activi sunt auxiliari chirali importanți.

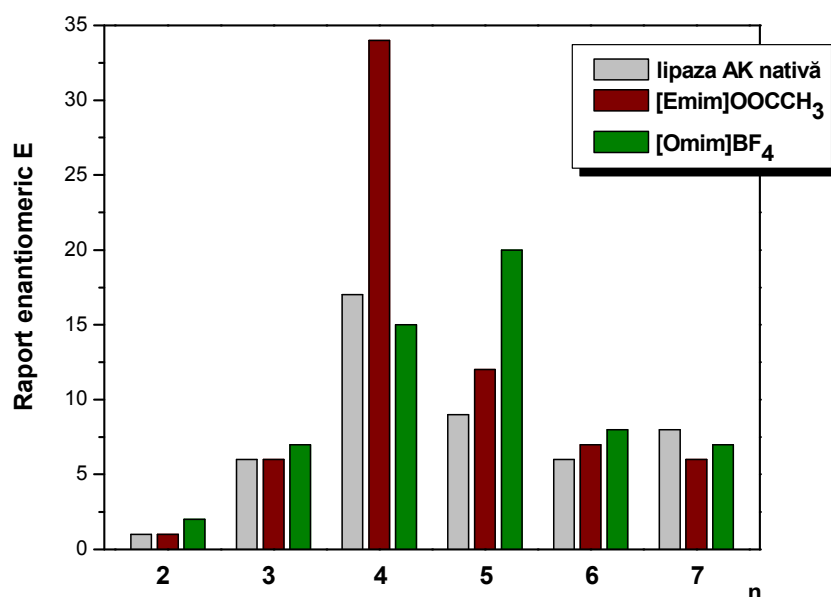


Figura 2.22. Dependența enantioselectivității lipazei Amano AK nativă și imobilizată în sol-gel de numărul de atomi de carbon (n) din gruparea alchil a alcoolului secundar și de natura lichidului ionic utilizat ca aditiv.

2.4.5. Randamente de imobilizare

Pentru a confirma îmbunătățirea proprietăților lipazei Amano AK entrapată în sol-gel datorită prezenței lichidelor ionice ca aditivi de imobilizare, s-a determinat și conținutul de proteine din filtratele obținute la prelucrarea gelurilor după 24 de ore de maturare a gelului. Deoarece parametrii care caracterizează cel mai bine performanțele catalitice ale preparatelor enzimatic obținute sunt randamentul de regăsire a activității enzimatic și raportul enantiomeric E, cantitatea de proteine din filtrat s-a determinat doar pentru câteva preparate.

Tabelul 2.38. Influența lichidelor ionice utilizate ca aditivi asupra randamentului de imobilizare a proteinei.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Aditiv	E	Concentrația de proteină (mg/ml)	Total proteine (mg)	$\eta_{\text{imobilizare}}$ (%)
AK ₂	TMOS	PEG	0,4428	0,4002	4,0	79,3
AK ₄₃	MeTMOS:TMOS=1:1	PEG	0,1966	0,0890	1,07	94,5
AK ₅	PrTMOS:TMOS=1:1	PEG	0,5156	0,4659	4,66	76,0
AK ₆	PrTMOS:TMOS=2:1	PEG	0,5408	0,4887	5,57	71,1
AK ₇	OcTMOS:TMOS=1:1	PEG	0,4143	0,3744	4,49	77,0
AK ₈	OcTMOS:TMOS=2:1	PEG	0,3776	0,3413	4,10	79,0
AK ₁₄	MeTMOS:TMOS=1:1	[Bmim]BF ₄	0,0409	0,0370	0,39	98,0
AK ₁₆	MeTMOS:TMOS=1:1	[Bmim]PF ₆	0,0340	0,0307	0,33	98,3
AK ₂₉	PhTMOS:TMOS=1:1	[Bmim]BF ₄	0,1576	0,1424	1,42	93,0
AK ₃₁	PhTMOS:TMOS=1:1	[Bmim]PF ₆	0,0125	0,0113	0,11	99,4

În cazul preparatelor obținute prin imobilizarea prin metoda sol-gel cu PEG ca și aditiv (Tabelul 2.38) se pot observa valori de peste 70% ale randamentului de imobilizare. Pentru preparatele imobilizate în prezență de lichid ionic, randamentele de imobilizare au fost și mai mari, s-au apropiat de 100%, ceea ce arată că enzima nu a fost îndepărtată prin spălare, ci a rămas aproape în totalitate în interiorul porilor matricei de sol-gel.

2.4.6. Concluzii

1. Prezența lichidelor ionice în matricea sol-gel a determinat obținerea unor enzime imobilizate cu activitate ridicată, care se reflectă în randamente de regăsire a activității totale după imobilizare de peste 100% în cazul celor mai active preparate, utilizate ca și biocatalizatori în reacția de acilare a 2-hexanolului.

2. Lichidele ionice cu același anion (BF_4^-) au dus la activități ridicate ale preparatelor imobilizate odată cu creșterea hidrofobicității și a lungimii grupării alchil din partea cationică (de la etil la octil). Lichidul ionic cu grupare alchil mai lungă (octil) $[\text{Omim}]\text{BF}_4$ a dus obținerea celor mai mari valori ale randamentului de regăsire a activității.

3. În ceea ce privește lichidele ionice cu același cation (1-metil-3-etilimidazoliu), prezența în partea anionică a unor substituenți mai voluminoși (trifluoroacetat, comparativ cu acetat), duce la scăderea activității și a enantioselectivității preparatelor enzimatic obținute.

4. Enantioselectivitatea preparatelor imobilizate a crescut comparativ cu enzima nativă pentru majoritatea preparatelor obținute cu lichide ionice ca aditivi, cel mai mult (de două ori) pentru $[\text{Emim}]\text{OOCCH}_3$.

5. Creșterea lungimii grupării alchil nehidrolizabile din molecula silanului precursor de la metil la octil duce la creșterea activității, în timp ce prezența grupării fenil a dus la o gelificare mai dificilă și o activitate ceva mai mică a preparatului.

6. Creșterea densității grupărilor alchil nehidrolizabile în rețeaua de sol-gel a avut efect favorabil asupra activității doar până la o anumită limită.

7. Lungimea lanțului alchil din alcoolul secundar alifatic a influențat randamentul de regăsire a activității enzimatic a preparatelor obținute cu OcTMOS/TMOS la raport molar de 1:1 și lichid ionic ca aditiv, valorile cele mai mari s-au obținut în cazul 2-octanolului și 2-nonanolului, pentru preparatul obținut în prezență de $[\text{Omim}]\text{BF}_4$. În ceea ce privește enantioselectivitatea preparatelor, valori ridicate ale lui E s-au observat în special în cazul 2-hexanolului și 2-heptanolului.

8. Prin alegerea potrivită a condițiilor de imobilizare se pot obține în prezența lichidelor ionice preparate enzimatic cu proprietăți superioare enzimei native. Se poate alege fie obținerea unei enzime imobilizate foarte active fie a uneia cu enantioselectivitate foarte mare, după necesitățile procesului respectiv.

2.5. Influența mediului de reacție asupra eficienței catalitice a lipazei Amano AK imobilizată prin metoda sol-gel

Numeroase cercetări s-au focalizat asupra performanțelor catalitice ale enzimelor native sau imobilizate utilizate în biocataliza în medii neconvenționale.

În ultimii ani, lichidele ionice, săruri organice care nu cristalizează la temperatura camerei, au atras atenția tot mai mult, fiind considerați potențiali solvenți ecologici, o alternativă promițătoare pentru solvenții organici (Lee și colab., 2007^b). Aceasta se datorează, în principal proprietăților fizice și chimice ale acestora: presiune de vapori neglijabilă, stabilitate termică excelentă (până la 300°C în unele cazuri), capacitatea de a dizolva un număr mare de compuși organici și anorganici, natură neinflamabilă, precum și a unui spectru larg de proprietăți ce pot fi modificate doar prin schimbarea cationului și a anionului: polaritatea, hidrofobicitatea și miscibilitatea (Guisan, 2006).

Deși biocataliza în lichide ionice a fost luată în considerare doar de câțiva ani, ele au fost deja utilizate într-un număr semnificativ de aplicații, în special lichidele ionice care au un cation de tip 1,3-dialchilimidazol sau N-alchilpiridină și un anion necoordinativ (Van Rantwijk, Lau și Sheldon, 2003).

Obiectivul cercetărilor prezentate în acest capitol a fost studierea influenței lichidelor ionice, în comparație cu medii de reacție organice, asupra eficienței catalitice și a enantioselectivității lipazei din *Pseudomonas fluorescens* Amano AK nativă și imobilizată. S-au studiat și în acest caz reacțiile de acilare ale alcoolilor secundari alifatici (2-butanol, 2-pentanol, 2-hexanol, 2-heptanol, 2-octanol și 2-nonanol) cu acetat de vinil.

Metodele de imobilizare folosite au fost entraparea în sol-gel (Metoda 2) și entraparea în sol-gel combinată cu adsorbție (Metodele 6, 7 și 8), în prezența sau absența lichidelor ionice [Bmim]PF₆ sau [Omim]BF₄ ca aditivi. Ca precursori silanici pentru obținerea gelurilor s-au utilizat metoxisilani: TMOS, MeTMOS, PrTMOS, OcTMOS și PhTMOS, iar drept suport solid Celite 545.

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

2.5.1. Acilarea 2-hexanolului în medii de reacție organice și de lichide ionice

Pentru acest studiu, lipaza Amano AK a fost imobilizată prin entrapare în sol-gel cu OcTMOS și TMOS la raport molar de 1:1 și [Omim]BF₄ ca aditiv la imobilizare (Metoda 2), iar preparatul obținut (AK₂₄) precum și lipaza nativă au fost testate în reacțiile de acilare ale unor alcooli secundari în mediu de solvent organic sau de lichid ionic (Zarcula și colab., 2008^c).

Ca medii de reacție s-au utilizat:

- solvenți organici: n-hexan, izooctan, metil-*terț*-butil-eter, tetrahidrofuran, toluen, acetonitril, acetonă și acetat de vinil.
- lichide ionice: [Emim]BF₄, [Pmim]BF₄, [Bmim]BF₄, [Hmim]BF₄, [Omim]BF₄, [Bmim]PF₆, [Omim]PF₆, [Bmim]Tf₂N, [Emim]OOCCH₃ și [Emim]OcSO₄.

Rezultatele obținute în reacția de acilare a 2-hexanolului în diverși solvenți organici catalizată de lipaza Amano AK nativă sunt prezentate în Tabelul 2.39.

Tabelul 2.39. Acilarea 2-hexanolului în mediu de solvent organic prin biocataliză cu lipaza Amano AK nativă.

Mediu de reacție	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	e.e. (%)	E
Hexan	54	2,446	73	17
Izoctan	56	2,270	66	13
Metil- <i>terț</i> -butil-eter	55	2,297	80	40
Tetrahidrofuran	42	1,713	78	14
Toluen	57	2,393	75	39
Acetonitril	60	2,476	65	20
Acetonă	52	2,116	91	104
Acetat de vinil	70	2,895	42	10

Se poate observa din datele tabelului 2.39 că în cazul enzimei native cea mai mare conversie s-a obținut fără a se utiliza un solvent organic, rolul de mediu de reacție avându-l un exces suplimentar de acetat de vinil (1 ml în plus față de cei 0,14 ml introduși în celelalte reacții). Acest lucru se datorește faptului că s-a modificat raportul molar al reactanților în reacția de acilare, lucrându-se cu un exces mult mai mare de acetat de vinil. În ceilalți solvenți s-au obținut valori apropiate ale activității, cu excepția tetrahidrofuranului. Activitatea mai redusă în acest solvent se poate datora faptului că solvenții organici au fost utilizați fără a fi anhidrificaliți și în cazul în care tetrahidrofuranul a conținut o cantitate mai mare de apă a avut loc și o reacție secundară de hidroliză.

În ce privește enantioselectivitatea, excesul enantiomeric cel mai mare și valoarea cea mai ridicată a indicelui enantiomeric E s-au obținut pentru acetonă, urmată de metil-*terț*-butil-eter, adică solvenți cu polaritate mai ridicată, în timp ce în solvenții hidrofobi izooctan și hexan enantioselectivitatea a fost scăzută. Diferențele de enantioselectivitate nu pot fi explicate numai pe baza polarității solventului, deoarece s-au obținut diferențe mari între reacția în acetonă și cea în acetonitril, solvenți cu polaritate relativ apropiată.

Rezultatele obținute cu preparatul imobilizat prin entraparea în sol-gel a lipazei Amano AK cu silani precursori OcTMOS și TMOS în raport molar de 1:1 și [Omim]BF₄ ca aditiv (AK₂₄), sunt prezentate în tabelele 2.40 și 2.41, iar pe baza lor s-au reprezentat diagramele din figurile 2.23 și 2.24, care prezintă conversia și excesele enantiomerice după 24 de ore de reacție.

Tabelul 2.40. Acilarea 2-hexanolului în mediu de solvent organic prin biocataliză cu lipază Amano AK entrapată în sol-gel cu OcTMOS/TMOS la raport molar de 1:1 și [Omim]BF₄ ca aditiv.

Mediu de reacție	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
Hexan	66	0,550	150	51	15
Izooctan	75	0,648	173	33	9
Metil- <i>terț</i> -butil-eter	62	0,511	135	60	17
Tetrahidrofuran	51	0,435	154	86	40
Toluen	68	0,555	141	45	9
Acetonitril	50	0,421	103	83	28
Acetonă	52	0,435	125	92	152
Acetat de vinil	62	0,503	105	59	15

Tabelul 2.41. Acilarea 2-hexanolului în mediu de lichid ionic prin biocataliză cu lipază Amano AK entrapată în sol-gel cu OcTMOS/TMOS la raport molar de 1:1 și [Omim]BF₄ ca aditiv.

Mediu de reacție	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	e.e. (%)	E
[Emim]BF ₄	72	0,631	38	9
[Pmim]BF ₄	64	0,527	56	19
[Bmim]BF ₄	56	0,461	78	44
[Omim]BF ₄	62	0,511	59	15
[Bmim]PF ₆	74	0,700	32	5
[Omim]PF ₆	70	0,586	42	10
[Bmim]Tf ₂ N	61	0,488	62	17
[Emim]OOCCH ₃	97	0,815	0,5	1
[Emim]OcSO ₄	56	0,459	76	16

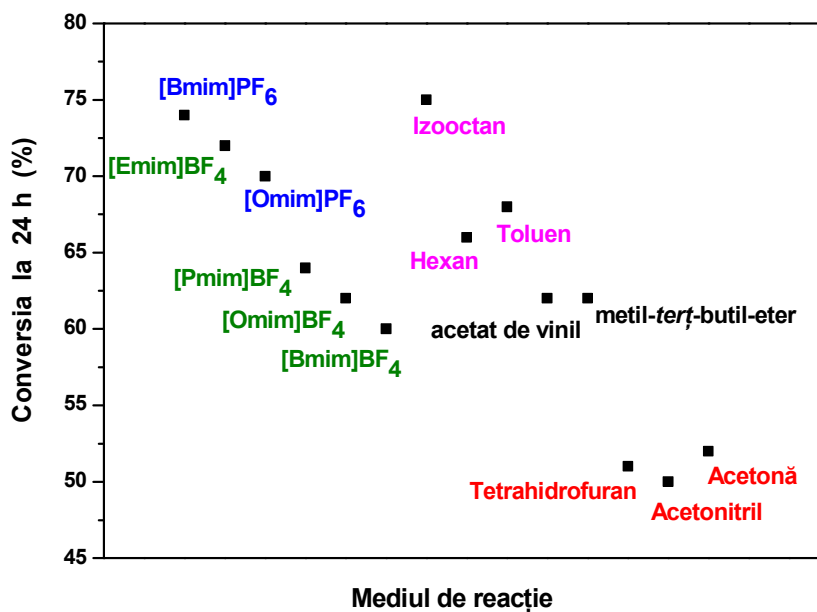


Figura 2.23. Dependența conversiei alcoolului de mediul de reacție utilizat la acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu lipază Amano AK entrapată în sol-gel cu OcTMOS/TMOS la raport molar de 1:1 și [Omim]BF₄ ca aditiv.

Spre deosebire de rezultatele precedente, așa cum se poate observa din Figura 2.23, corelarea dintre polaritatea solventului și activitatea, respectiv enantioselectivitatea enzimei este bună. În solvenții organici cu polaritate mai mare și miscibili cu apa (acetonă, tetrahidrofuran, acetonitril) activitatea a fost mai redusă, conversiile după 24 de ore fiind în jur de 50%. Acești solvenți având afinitate pentru apă, îndepărtează din zona enzimei apa necesară pentru menținerea conformației active. În același timp, în solvenți nepolari (izooctan, hexan, toluen) s-au înregistrat valori mari ale conversiei (în jur de 70% după 24 de ore).

Conversiile ridicate obținute sunt însoțite, evident, de enantioselectivități reduse (Figura 2.24), având loc acilarea ambilor enantiomeri ai alcoolului secundar. În solvenții cu polaritate mai ridicată, în special acetonă, s-au înregistrat enantioselectivități ridicate, cât și valori mari ale indicelui E (Tabelul 2.41).

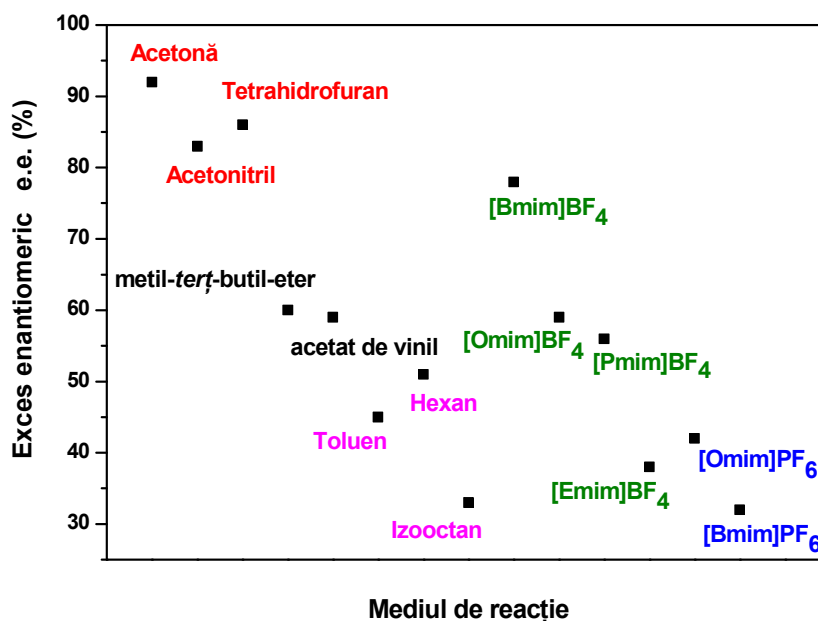


Figura 2.24. Dependența excesului enantiomeric de mediul de reacție utilizat la acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu lipază Amano AK entrapată în sol-gel cu OcTMOS/TMOS la raport molar de 1:1 și [Omim]BF₄ ca aditiv.

Natura lichidului ionic utilizat ca mediu de reacție influențează de asemenea eficiența procesului. Considerând lichidele ionice cu același anion (BF₄⁻), activitatea cea mai mare a enzimei și enantioselectivitatea cea mai mică s-au observat dacă în partea cationică a lichidului ionic a fost prezentă o grupare alchil mai scurtă (etil). Valorile optime (conversie în jur de 50% și enantioselectivitate ridicată) nu s-au înregistrat însă atunci când această grupare a fost cea cu hidrofobicitatea cea mai mare (octil), așa cum ne-am fi așteptat, ci în cazul grupării butil.

La lichidele ionice cu aceeași parte cationică ([Omim], respectiv [Bmim]) conversiile mai mari au fost favorizate de anionul PF₆, iar enantioselectivitățile mai ridicate de anionul BF₄. În cazul în care cationul a fost [Emim], prezența grupării octil în partea anionică a dus la enantioselectivitate chiar mai mare decât pentru BF₄⁻, în timp ce anionul acetat a determinat pierderea completă a enantioselectivității, corelată cu o acilare practic completă a ambilor enantiomeri ai substratului (Tabelul 2.40). Lichidul ionic [Emim]OOCCH₃, care s-a dovedit cel mai bun în calitate de aditiv, atunci când a fost utilizat ca mediu de reacție a determinat cea mai mare viteză de reacție și o conversie practic completă, ceea ce a însemnat pierderea enantioselectivității (Tabelul 2.41).

2.5.2. Studiul reacției de acilare a alcoolilor secundari alifatici în medii organice și de lichide ionice

Pe baza rezultatelor obținute în cazul folosirii ca substrat a 2-hexanolului s-a efectuat un studiu mai amplu pentru toată seria de alcooli secundari. Ca medii de reacție organice s-au utilizat hexanul, solventul folosit în mod obișnuit în aceste reacții și acetona care a dat cele mai mari valori de enantioselectivitate pentru 2-hexanol.

Dintre lichidele ionice, au fost selectate ca medii de reacție pentru acest studiu [Bmim]PF₆ și [Omim]BF₄. Imobilizarea s-a realizat prin entrapare în sol-gel (Metoda 2) cu OcTMOS și TMOS la raport molar de 1:1 și [Omim]BF₄ ca aditiv (preparatul AK₂₄) (Zarcu și colab., 2008^e).

Rezultatele sunt prezentate în tabelele 2.42 și 2.43. Se poate observa faptul că în medii de lichide ionice în general activitatea efectivă a lipazei, atât native cât și imobilizate a fost mai mare. În special preparatele imobilizate au avut activitate excelentă în mediu de lichid ionic, ajungându-se la o activitate totală relativă de 2-3 ori mai mare în mediu de [Omim]BF₄, comparativ cu lipaza nativă.

Tabelul 2.42. Acilarea alcoolilor secundari în diverse medii de reacție prin biocataliză cu lipaza Amano AK nativă.

Substrat	Mediu de reacție	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	e.e. (%)	E
2-BUTANOL	acetona	60	2,574	27	2
	hexan	60	2,458	7	1
	[Bmim]PF ₆	18	0,735	3	1
	[Omim]BF ₄	43	1,828	2	1
2-PENTANOL	acetona	51	2,020	74	15
	hexan	64	2,380	47	6
	[Bmim]PF ₆	72	4,400	38	9
	[Omim]BF ₄	26	0,925	61	5
2-HEXANOL	acetona	52	2,116	90	83
	hexan	54	2,446	73	17
	[Bmim]PF ₆	63	2,605	58	18
	[Omim]BF ₄	55	2,247	80	40
2-HEPTANOL	acetona	35	1,264	90	31
	hexan	31	2,630	74	9
	[Bmim]PF ₆	66	2,882	50	12
	[Omim]BF ₄	59	2,360	67	19
2-OCTANOL	acetona	57	2,323	75	39
	hexan	53	2,095	55	6
	[Bmim]PF ₆	59	2,415	23	2
	[Omim]BF ₄	39	1,568	40	3
2-NONANOL	acetona	50	2,842	84	30
	hexan	50	2,030	63	8
	[Bmim]PF ₆	69	2,921	35	5
	[Omim]BF ₄	55	2,483	55	8

Tabelul 2.43. Acilarea alcoolilor secundari în diverse medii de reacție prin biocataliză cu lipază Amano AK entrapată în sol-gel cu OcTMOS/TMOS la raport molar de 1:1 și [Omim]BF₄ ca aditiv.

Substrat	Mediu de reacție	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
2-BUTANOL	acetonă	53	0,415	108	31	3
	hexan	83	0,667	181	13	2
	[Bmim]PF ₆	68	0,714	648	0,5	1
	[Omim]BF ₄	60	0,508	185	5	1
2-PENTANOL	acetonă	48	0,343	113	84	27
	hexan	74	0,611	171	34	7
	[Bmim]PF ₆	77	0,638	97	15	2
	[Omim]BF ₄	20	0,322	232	48	4
2-HEXANOL	acetonă	52	0,435	137	92	152
	hexan	66	0,550	150	51	15
	[Bmim]PF ₆	74	0,700	179	32	5
	[Omim]BF ₄	62	0,511	152	59	15
2-HEPTANOL	acetonă	48	0,375	198	90	49
	hexan	61	0,508	129	63	20
	[Bmim]PF ₆	78	0,700	162	28	8
	[Omim]BF ₄	68	0,657	186	47	18
2-OCTANOL	acetonă	57	0,531	152	75	39
	hexan	73	0,738	235	36	8
	[Bmim]PF ₆	97	0,857	237	3	3
	[Omim]BF ₄	98	0,787	335	20	5
2-NONANOL	acetonă	48	0,391	92	86	32
	hexan	74	0,668	219	34	7
	[Bmim]PF ₆	91	0,784	179	9	3
	[Omim]BF ₄	79	0,624	168	26	6

Pe baza datelor din tabelele 2.42 și 2.43 s-au realizat figurile 2.25 și 2.26 în care sunt prezentate valorile enantioselectivităților obținute pentru fiecare dintre cele 4 medii de reacție, comparativ pentru lipaza nativă și imobilizată.

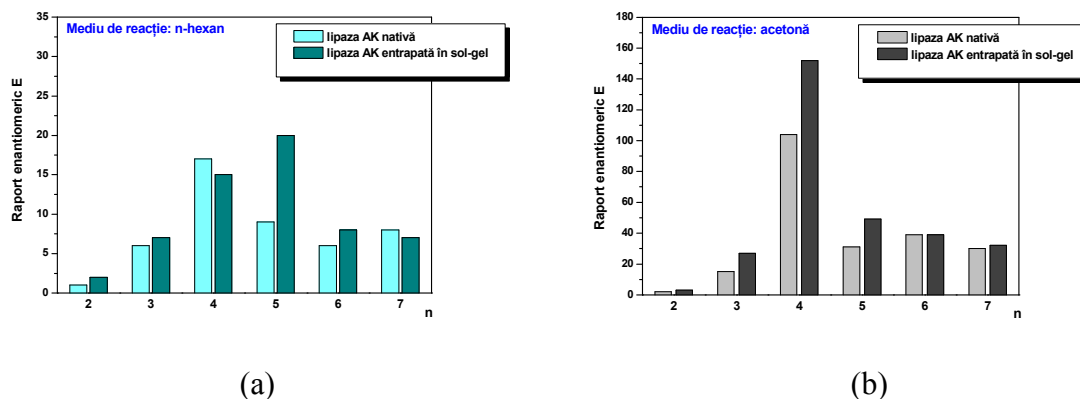


Figura 2.25. Dependența raportului enantiomeric (E) de numărul de atomi de carbon (n) din gruparea alchil a alcoolului secundar în reacțiile de acilare catalizate de lipaza Amano AK nativă și entrapată în sol-gel (AK₂₄) în mediu de: (a) n-hexan, (b) acetonă.

În cazul folosirii ca mediu de reacție a hexanului (Figura 2.25.a) se observă că enantioselectivitatea a fost foarte mică la 2-butanol, a crescut atingând valoarea maximă în cazul 2-heptanolului după care a scăzut din nou în cazul alcoolilor secundari cu grupări alchil mai lungi.

În cazul folosirii acetonei ca mediu de reacție (Figura 2.25.b) s-a constatat în principiu aceeași tendință în ce privește influența lanțului hidrocarbonat din gruparea alchil a alcoolului secundar. Pe ansamblu, se poate observa că valorile indicelui E sunt considerabil mai mari în acetonă decât în hexan, adică se confirmă pentru toată seria de alcooli secundari constatarea de la 2-hexanol, anume că solvenții mai polari, în special acetona, sunt medii de reacție care determină o enantioselectivitate mai mare decât solvenții nepolari în reacția de acilare a alcoolilor secundari, atunci când biocatalizatorul este lipaza din *Pseudomonas fluorescens* Amano AK. Se confirmă și faptul că enantioselectivitatea cea mai ridicată se înregistrează pe la mijlocul seriei, la 2-hexanol și 2-heptanol. În esență, imobilizarea nu este considerată o metodă care modifică enantioselectivitatea enzimei ci doar stabilitatea enzimei ei, însă ea poate induce și mici modificări conformaționale și acestea pot fi atât în favoarea cât și în defavoarea creșterii diferenței dintre vitezele de reacție ale celor doi enantiomeri. Această diferență poate crește fie prin accelerarea reacției enantiomerului favorizat, fie prin încetinirea reacției enantiomerului defavorizat și imobilizarea poate să aibă o anumită influență în oricare dintre aceste fenomene.

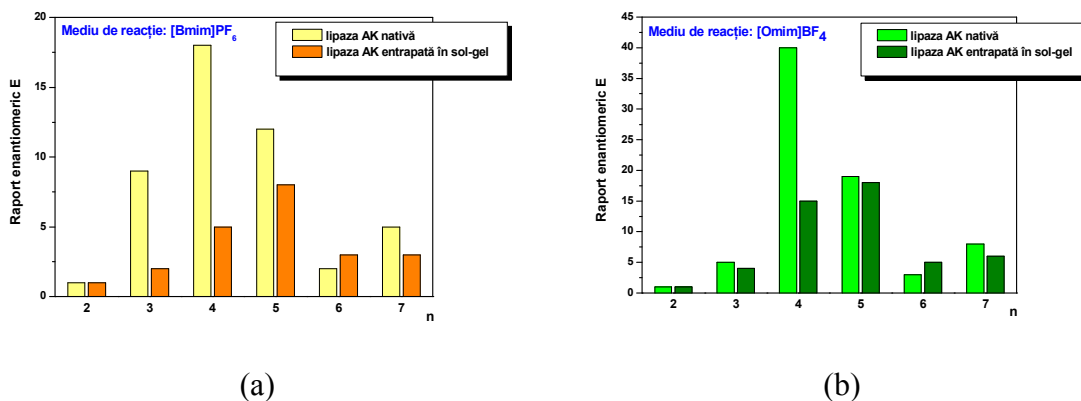


Figura 2.26. Dependența raportului enantiomeric de numărul de atomi de carbon (n) din gruparea alchil a alcoolului secundar în reacțiile de acilare catalizate de lipaza Amano AK nativă și entrapată în sol-gel (AK₂₄) în mediu de: (a) [Bmim]PF₆, (b) [Omim]BF₄.

Folosind ca mediu de reacție un lichid ionic (Figura 2.26.a și Figura 2.26.b), se confirmă o parte dintre tendințele observate la folosirea ca mediu de reacție a solvenților organici. Astfel, enantioselectivitatea este maximă dacă lanțul alchil al substituentului legat de α -carbonul alcoolului secundar este format din 4-5 atomi de carbon, însă în majoritatea cazurilor enantioselectivitatea enzimei imobilizate este mai mică decât cea a lipazei native. Din aceste date, cât și din cele prezentate anterior, rezultă rolul important al mediului de reacție utilizat pentru a obține o enantioselectivitate ridicată. Este necesar un studiu de optimizare pentru fiecare caz în parte, pentru că structurile enzimelor fiind diferite, atât structura substratului cât și mediul de reacție vor influența diferit enantioselectivitatea, dar și activitatea.

2.5.3. Influența mediului de reacție și a silanului precursor asupra capacității biocatalitice a lipazei Amano AK imobilizată prin metoda combinată

Imobilizarea prin metoda combinată a dat rezultate, așa cum rezultă din studiile precedente, în special în ce privește randamentul de regăsire a activității totale a lipazei imobilizate. Cele mai slabe rezultate în această privință au fost înregistrate la preparatele pe bază de precursori având grupare metil nehidrolizabilă, probabil din cauza structurii prea compacte a xerogelului rezultat. În cazul imobilizării prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție, sol-gelul care înglobează enzima se formează și se depune pe suprafața adsorbentului și dacă această depunere se face în strat subțire și uniform ar fi posibil ca efectul nefavorabil al structurii prea compacte să fie mai puțin pronunțat. Din acest motiv s-au sintetizat preparate cu concentrație crescătoare de grupări metil, până la un raport molar MeTMOS:TMOS de 5:1, efectul creșterii densității grupărilor metil putând fi de asemenea o creștere a activității. La imobilizare s-a lucrat conform metodei de entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite 545 (Metoda 8), cu [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare. Preparatele obținute au fost testate în mediile de reacție organice utilizate și în studiile precedente, hexan și acetonă (Croitoru, Zarcu și Péter, 2008).

Creșterea densității de grupări metil în matricea de sol-gel nu a dus însă la creșterea activității preparatului enzimatic decât în mică măsură, activitatea cea mai

mare fiind înregistrată atunci când raportul molar MeTMOS:TMOS a fost 3:1, iar mediul de reacție hexanul (Tabelul 2.44). În acest caz randamentul de regăsire a activității enzimaticice totale a fost de 73%. Spre deosebire de imobilizarea numai prin entrapare, excesele enantiomerice mai mari au fost obținute folosind ca mediu de reacție hexanul și nu acetona. Această scădere drastică a enantioselectivității în mediu de acetonă nu poate fi explicată, dar confirmă faptul că sistemele de reacție care utilizează enzime imobilizate trebuie optimizate pentru fiecare caz în parte. Excesul enantiomeric cel mai mare s-a obținut în mediu de n-hexan, la raport molar 2:1 al silanilor precursori. În condițiile în care parametrul cel mai important este indicele de enantioselectivitate, care ține cont atât de conversie cât și de excesul enantiomeric, se poate considera că raportul molar MeTMOS:TMOS de 2:1 este cel optim în cazul acestui tip de preparate.

Tabelul 2.44. Influența creșterii densității grupărilor metil în matricea de sol-gel asupra activității și enantioselectivității lipazei Amano AK imobilizată prin metoda combinată, folosind MeTMOS și TMOS ca precursori, [Omim]BF₄ ca aditiv și Celite 545 ca suport.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Mediu de reacție	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	acetona	52	2,116	-	90	83
		n-hexan	54	2,446	-	73	17
AK ₆₆	MeTMOS:TMOS 1:1	acetona	13	0,046	35	44	3
		n-hexan	20	0,081	53	84	14
AK ₆₇	MeTMOS:TMOS 2:1	acetona	15	0,051	41	54	4
		n-hexan	18	0,071	50	93	34
AK ₆₈	MeTMOS:TMOS 3:1	acetona	12	0,052	42	33	2
		n-hexan	26	0,106	73	83	14
AK ₆₉	MeTMOS:TMOS 4:1	acetona	8	0,032	25	68	6
		n-hexan	17	0,068	47	80	11
AK ₇₀	MeTMOS:TMOS 5:1	acetona	17	0,072	60	41	3
		n-hexan	18	0,073	53	85	15

Ceilalți precursori silanici, care în studiile precedente au dat activități mai mari decât cel cu grupare metil: PrTMOS, OctMOS și PhTMOS au fost studiați și folosind metoda combinată de imobilizare la raport molar de 1:1 față de TMOS, [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare și Celite 545 ca suport (Metoda 7) (Péter și colab., 2008). Preparatele obținute au fost testate în reacția de acilare a 2-hexanolului în medii organice și de lichid ionic (Tabelul 2.45).

Tabelul 2.45. Acilarea 2-hexanolului în medii de reacție organice și de lichid ionic, prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei Amano AK cu diverși precursori silanici în prezența [Omim]BF₄ ca și aditiv și Celite 545 ca suport.

Cod preparat	Silani precursori (raport molar)	Mediu de reacție	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	acetonă	52	2,116	-	90	83
		n-hexan	54	2,446	-	73	17
		[Bmim]PF ₆	63	2,605	-	58	18
		[Omim]BF ₄	55	2,247	-	80	40
AK ₆₃	PrTMOS:TMOS 1:1	acetonă	12	0,049	35	66	5
		n-hexan	17	0,067	41	83	13
		[Bmim]PF ₆	81	0,340	198	22	4
		[Omim]BF ₄	2	0,006	4	85	12
AK ₆₄	OcTMOS:TMOS 1:1	acetonă	47	0,190	150	67	9
		n-hexan	60	0,241	164	66	24
		[Bmim]PF ₄	71	0,279	179	39	8
		[Omim]BF ₄	62	0,252	187	59	15
AK ₆₅	PhTMOS:TMOS 1:1	acetonă	5	0,021	13	97	69
		n-hexan	21	0,084	43	87	18
		[Bmim]PF ₆	5	0,022	11	79	9
		[Omim]BF ₄	9	0,037	21	85	13

Și în cazul acestor preparate, dintre solvenții organici testați, hexanul a dus la activități și randamente de regăsire a activității enzimaticе totale mai mari decât acetona. Cele mai bune rezultate s-au obținut cu preparatul care conținea ca grupă nehidrolizabilă octil (AK₆₄), adică la o hidrofobicitate mai mare a matricei de sol-gel. Utilizarea de lichide ionice ca medii de reacție a dus la activități mai mari comparativ cu solvenții organici pentru preparatele care au avut în structura lor grupări propil (doar în mediu de [Bmim]PF₆) sau octil, iar în cazul preparatului cu grupare fenil, activitatea a avut valori apropiate cu cele obținute în solveți organici. Dintre cele două lichide ionice testate [Bmim]PF₆ a determinat aproape în toate cazurile obținerea unor activități mai mari decât [Omim]BF₄. Utilizarea acestui lichid ionic ca mediu de reacție a determinat însă valori mult mai mici ale excesului enantiomeric decât în

celelalte cazuri, deci nu reprezintă soluția optimă pentru obținerea de esteri și alcooli secundari optic activi prin această metodă.

Așa cum rezultă din valorile indicelui enantiomeric E (Figura 2.27) valori mari s-au obținut în special prin folosirea $[\text{Omim}]\text{BF}_4$ ca mediu de reacție, valorile mari pentru acetona în cazul preparatului enzimatic pe bază de PhTMOS ca silan precursor fiind datorate conversiei mici care a fost obținută după 24 de ore de reacție.

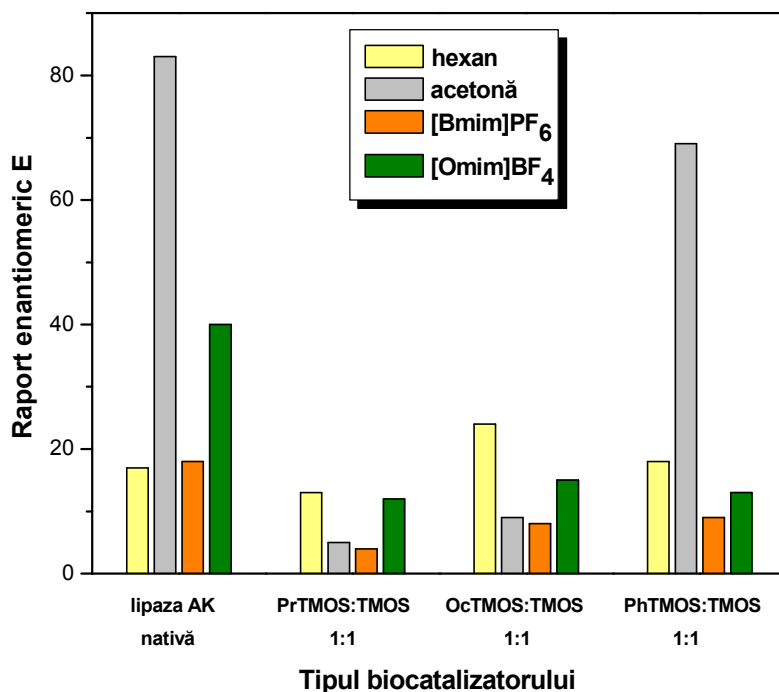


Figura 2.27. Dependența raportului enantiomeric de natura silanilor precursori și de mediul de reacție utilizat la acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu preparate obținute prin dubla imobilizare a lipazei Amano AK în prezența $[\text{Omim}]\text{BF}_4$ ca aditiv.

2.5.4. Evaluarea comparativă a capacității biocatalitice în medii organice și de lichide ionice a preparatelor de lipază AK imobilizate prin diferite metode

Studiul care urmează a fost realizat pentru a urmări activitatea și enantioselectivitatea în reacția de acilare a 2-hexanolului, în mai multe medii de reacție (solvenți organici și lichide ionice) folosind preparate imobilizate prin diferite metode (Zarcu și colab., 2008^b).

La imobilizare s-a lucrat conform metodei de entrapare în sol-gel cu silani precursori TMOS și PrTMOS sau OcTMOS la raport molar de 1:1, cu sau fără lichid ionic ca aditiv (Metoda 2) cât și prin entrapare combinată cu adsorbție, utilizând TMOS și OcTMOS la raport molar de 1:1 cu $[\text{Omim}]\text{BF}_4$ ca aditiv de imobilizare (Metoda 7). Preparatele obținute au fost testate în reacția de acilare a 2-hexanolului în diferite medii de reacție, iar rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 2.46.

Tabelul 2.46. Eficiența catalitică a lipazei Amano AK imobilizată prin diverse metode bazate pe entrapare în sol-gel în reacția de acilare a 2-hexanolului în medii de reacție organice sau lichide ionice.

Cod preparat	Caracteristici de imobilizare	Mediu de reacție	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	$\eta_{\text{regăsire}}$ (%)	e.e. (%)	E
AK _{nativă}	-	acetona	52	2,116	-	90	83
		n-hexan	54	2,446	-	73	17
		[Bmim]PF ₆	63	2,605	-	58	18
		[Omim]BF ₄	55	2,247	-	80	40
AK ₁₇	PrTMOS:TMOS 1:1 + [Bmim]PF ₆	acetona	47	0,383	95	94	85
		n-hexan	58	0,474	102	70	22
		[Bmim]PF ₆	65	0,541	109	52	12
		[Omim]BF ₄	58	0,492	115	72	34
AK ₇	OcTMOS:TMOS 1:1	acetona	51	0,444	101	95	201
		n-hexan	56	0,479	94	77	34
		[Bmim] PF ₆	76	0,683	124	31	7
		[Omim]BF ₄	59	0,496	106	67	20
AK ₂₄	OcTMOS:TMOS 1:1 + [Omim]BF ₄	acetona	52	0,435	125	92	152
		n-hexan	57	0,507	126	74	30
		[Bmim]PF ₆	74	0,700	163	32	5
		[Omim]BF ₄	62	0,511	138	59	15
AK ₆₄	OcTMOS:TMOS 1:1 + [Omim]BF ₄ + Celite 545	acetona	47	0,190	150	67	9
		n-hexan	60	0,241	164	66	24
		[Bmim]PF ₆	71	0,279	177	39	8
		[Omim]BF ₄	62	0,252	187	59	15

Folosind ca silan precursor atât PrTMOS cât și OcTMOS s-au obținut preparate cu activitate ridicată, randamentele de regăsire a activității enzimice totale fiind în general mai mari de 100% în toate mediile de reacție (Tabelul 2.46). Se poate spune că activitatea preparatului nu a fost influențată semnificativ de natura grupării alchil din precursorul de alchil-trimetoxisilan.

Enantioselectivitatea a fost puțin mai mare la preparatul cu PrTMOS dacă s-a lucrat în mediu de lichid ionic, iar la cele cu OcTMOS dacă s-a lucrat în mediu de solvent organic.

Preparatele au fost sintetizate folosind aceiași precursori (OcTMOS și TMOS) și diferite metode de imobilizare: entrapare obișnuită în sol-gel (AK₇), entrapare în sol-gel cu lichid ionic ([Omim]BF₄) ca aditiv (AK₂₄) și entrapare combinată cu adsorbție pe Celite 545 și cu lichid ionic ([Omim]BF₄) ca aditiv (AK₆₄). Rezultatele (Tabelul 2.46 și Figura 2.28) arată că cele mai mari valori ale randamentului de regăsire a activității enzimaticе s-au observat pentru preparatul obținut prin metoda combinată, în special în mediu de lichid ionic. Aceste valori ridicate ale eficienței imobilizării (>160%) sunt corelate însă cu o enantioselectivitate mai redusă în raport cu celelalte preparate, indiferent de mediul de reacție utilizat (Figura 2.29).

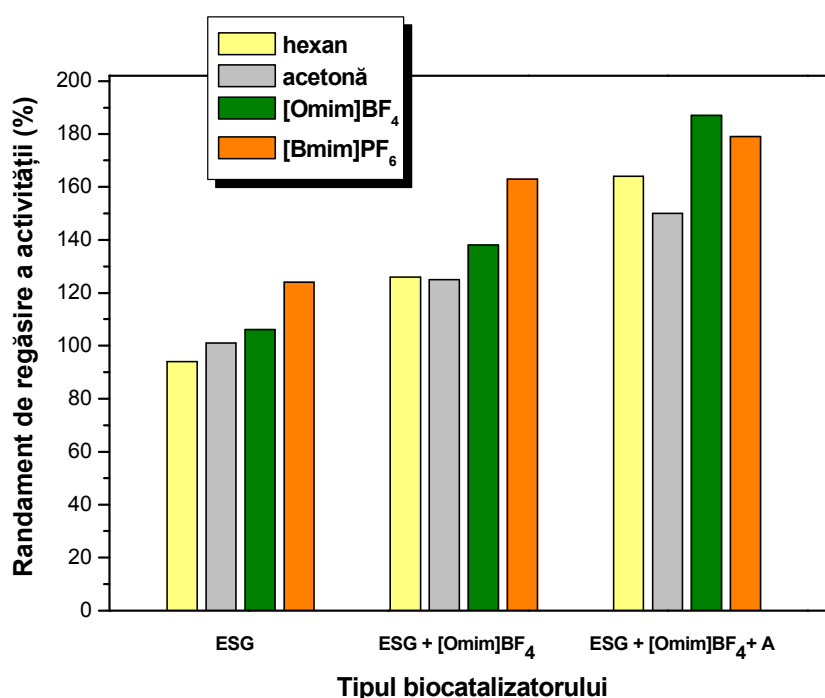


Figura 2.28. Dependența eficienței imobilizării de tipul biocatalizatorului, de metoda de imobilizare și mediul de reacție utilizat la acilarea enantioselectivă a 2-hexanolului (ESG = entrapare în sol-gel, A= adsorbție).

Așa cum s-a remarcat din datele prezentate, metoda combinată duce la o repartiție mai bună a enzimei în matricea de sol-gel, însă diferențierea dintre enantiomeri prin discriminare cinetică se face mai greu. Din Figura 2.29 se mai poate observa că, doar pe baza considerentului enantioselectivității, folosirea lichidelor ionice ca mediu de reacție nu este justificată, existând solvenți organici (în cazul nostru acetona) în care se pot obține enantioselectivități mai mari.

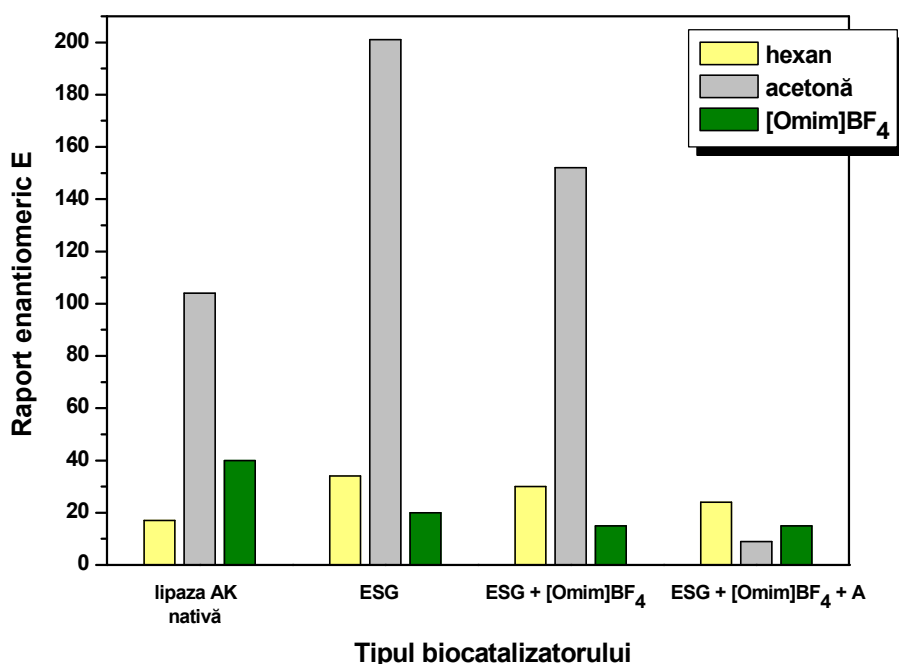


Figura 2.29. Dependența raportului enantiomeric de tipul biocatalizatorului, de metoda de imobilizare și mediul de reacție utilizat la acilarea enantioselectivă a 2-hexanolului (ESG = entrapare în sol-gel, A= adsorbție).

Așadar, utilizarea lichidelor ionice ca medii de reacție poate oferi avantaje comparativ cu solvenții organici în ce privește posibilitatea reutilizării repetate sau termostabilității enzimei (care este subiectul altui studiu), însă nu are efecte favorabile în ce privește enantioselectivitatea ei.

2.5.5. Concluzii

În cazul preparatelor de lipază Amano AK entrapate în sol-gel

1. În solvenții organici cu polaritate mai mare (acetona, tetrahidrofuran, acetonitril) activitatea a fost mai redusă, conversiile după 24 de ore au fost în jur de 50%. În același timp, în solvenți nepolari (izooctan, hexan, toluen) s-au înregistrat valori mari ale conversiei (în jur de 70% după 24 de ore).

2. Acetatul de vinil poate avea și rolul de mediu de reacție la acilarea alcoolilor secundari, însă nu favorizează obținerea unor excese enantiomerice ridicate.

3. Dintre solvenții organici obișnuiți, acetona este aceea care duce la obținerea enantioselectivității celei mai ridicate, atât în cazul lipazei AK native cât și imobilizate.

4. Natura lichidului ionic utilizat ca mediu de reacție influențează de asemenea eficiența procesului. Considerând lichidele ionice cu același anion (BF_4^-), activitatea cea mai mare a enzimei s-a înregistrat dacă în partea cationică a lichidului ionic a fost prezentă o grupare alchil mai scurtă (etil), însă valorile optime (conversie în jur de 50% și enantioselectivitate ridicată) s-au obținut atunci când această grupare a fost (butil).

5. La lichidele ionice cu aceeași parte cationică ([Omim], respectiv [Bmim]) conversiile mai mari au fost favorizate de anionul PF_6^- , iar enantioselectivitățile mai ridicate de anionul BF_4^- .

6. În cadrul studiului reacției de acilare a alcoolilor secundari alifatici în solvenți organici (hexan și acetonă) s-a observat că enantioselectivitatea a fost foarte mică la 2-butanol, a crescut atingând valoarea maximă în cazul 2-hexanolului sau 2-heptanolului, după care a scăzut din nou în cazul alcoolilor secundari cu grupări alchil mai lungi. Valorile indicelui E au fost considerabil mai mari în acetonă decât în hexan.

7. Folosind ca mediu de reacție un lichid ionic, se confirmă o parte dintre tendințele observate la folosirea ca mediu de reacție a solvenților organici. Astfel, enantioselectivitatea este maximă dacă lanțul alchil al substituentului legat de α -carbonul alcoolului secundar este format din 4-5 atomi de carbon, însă în majoritatea cazurilor enantioselectivitatea enzimei imobilizate a fost mai mică decât cea a lipazei native.

În cazul preparatelor de lipază Amano AK imobilizate prin metoda combinată

1. Creșterea densității de grupări metil în matricea de sol-gel nu a dus la creșterea activității preparatului enzimatic dublu imobilizat decât în mică măsură, activitatea cea mai mare fiind înregistrată atunci când raportul molar MeTMOS:TMOS a fost 3:1, iar mediul de reacție hexanul. Din punct de vedere al enantioselectivității, se poate considera că raportul molar MeTMOS:TMOS de 2:1 este cel optim în cazul acestui tip de preparate.

2. Utilizarea de lichide ionice ca medii de reacție a dus la activități mai mari comparativ cu solvenții organici pentru preparatele dublu imobilizate care au avut în structura lor grupări propil (doar în mediu de [Bmim] PF_4) sau octil, iar în cazul preparatului cu grupare fenil, activitatea a avut valori apropiate cu cele obținute în solvenți organici. [Bmim] PF_6 a determinat aproape în toate cazurile obținerea unor activități mai mari decât [Omim] BF_4 .

3. Valori ridicate ale indicelui enantiomeric E s-au obținut în special prin folosirea [Omim] BF_4 ca mediu de reacție.

4. Prin folosirea lichidului ionic [Omim] BF_4 în rol dublu, de aditiv la formarea sol-gelului și mediu de reacție pentru acilarea 2-hexanolului, s-a obținut un randament de regăsire a activității enzimatic totale de aproximativ 180% și un indice enantiomeric E de 15.

Evaluarea comparativă a preparatelor de lipază Amano AK immobilizate prin diferite metode

1. Cele mai mari valori ale randamentului de regăsire a activității enzimaticice s-au observat pentru preparatul obținut prin metoda combinată, în special în mediu de lichid ionic. Aceste valori ridicate ale eficienței immobilizării (>160%) sunt corelate însă cu o enantioselectivitate mai redusă în raport cu celelalte preparate, indiferent de mediul de reacție utilizat.

2. Pe baza considerentului enantioselectivității, folosirea lichidelor ionice ca mediu de reacție nu este justificată, existând solvenți organici (în cazul nostru acetona) în care se pot obține enantioselectivități mai mari.

2.6. Studiul termostabilității lipazei Amano AK nativă sau immobilizată în reacția de acilare a 2-hexanolului

Pierderea activității catalitice a enzimelor la temperaturi ridicate se datorează unor modificări conformaționale ireversibile care au loc la nivelul structurii terțiare. Astfel menținerea activității enzimelor la peste 40-50°C este un obiectiv important al catalizei enzimaticice, deoarece pierderea activității la temperaturi ridicate este unul dintre motivele principale care împiedică aplicarea industrială a biocatalizatorilor. Immobilizarea poate fi o metodă de creștere a termostabilității enzimelor, așa cum s-a demonstrat în mai multe cazuri.

În acest studiu s-a urmărit influența temperaturii în intervalul 30-60°C asupra performanțelor catalitice a unor preparate enzimaticice cu lipază Amano AK din *Pseudomonas fluorescens* în reacția de acilare a 2-hexanolului, în n-hexan (Zarcula și colab., 2008^d). Pentru a se putea compara eficiența diferitelor metode de immobilizare în această privință, au fost utilizate preparate enzimaticice care au fost obținute prin adsorbție (Metoda 1), entrapare în sol-gel (Metoda 2) și entrapare combinată cu adsorbție (Metoda 6). S-au folosit în toate cazurile aceiași silani precursori, PrTMOS și TMOS la raport molar de 1:1, iar ca aditivi PEG sau un lichid ionic. Studiul de temperatură s-a realizat și cu enzima nativă, pentru a obține valorile de referință în ce privește stabilitatea termică.

În cazul lipazei Amano AK native (Tabelul 2.47), conversia după 24 de ore și activitatea de transesterificare cresc odată cu creșterea temperaturii în intervalul 30-60°C. Pe de altă parte, excesul enantiomeric și raportul enantiomeric E au tendință descrescătoare, deoarece și viteza de reacție a izomerului mai puțin reactiv este mai mare la temperatură mai ridicată. Excesul enantiomeric este de 1,4 ori mai mic la 60°C decât la 30°C.

Tabelul 2.47. Acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu lipaza Amano AK nativă

Nr. crt.	Temperatură (°C)	Conv. (%)	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	e.e. (%)	E
1.	30	36	1,425	85	20
2.	40	54	2,446	73	17
3.	50	57	2,366	70	19
4.	55	57	2,296	69	17
5.	60	61	2,440	62	17

În cazul preparatului imobilizat doar prin adsorbție pe Celite 545 (suport solid, neporos) se poate observa o scădere a activității de transesterificare precum și a excesului enantiomeric, de 1,8 ori respectiv 1,3 ori la 60°C comparativ cu valorile înregistrate la 30°C (Tabelul 2.48).

Tabelul 2.48. Acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu preparatul (AK₁) obținut prin imobilizarea lipazei Amano AK prin adsorbție pe Celite 545.

Nr. crt.	Temperatură (°C)	Conv. (%)	Activitate (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	e.e. (%)	E
1.	30	70	0,569	42	10
2.	40	79	0,345	26	6
3.	50	77	0,313	29	6
4.	55	75	0,306	32	6
5.	60	75	0,316	32	6

În cazul preparatelor imobilizate prin metodele de entrapare în sol-gel cu diferiți aditivi (Tabelele 2.49, 2.50 și 2.51) și entrapare combinată cu adsorbție (Tabelul 2.52), la creșterea temperaturii se observă aceeași tendință de creștere a conversiei și activității de transesterificare, asociată cu scăderea excesului enantiomeric și a enantioselectivității. Creșterea de activitate pe intervalul 30-40°C este urmată de o ușoară scădere la 50°C și apoi de o creștere de până la 1,4 ori la 60°C decât la 30°C. Pentru toate preparatele imobilizate testate (excepție cel imobilizat doar prin adsorbție) scăderea excesului enantiomeric este mai puțin pronunțată decât în cazul enzimei native.

Tabelul 2.49. Acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu preparatul (AK₅) obținut prin imobilizarea lipazei Amano AK prin entrapare în sol-gel (PrTMOS/TMOS la un raport molar de 1:1 și PEG ca aditiv).

Nr. crt.	Temperatură (°C)	Conv. (%)	Activitate (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	e.e. (%)	E
1.	30	27	0,219	95	55
2.	40	27	0,235	91	29
3.	50	22	0,179	81	12
4.	55	35	0,288	79	13
5.	60	41	0,315	79	15

Tabelul 2.50. Acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu preparatul (AK₁₈) obținut prin imobilizarea lipazei Amano AK prin entrapare în sol-gel (PrTMOS/TMOS la un raport molar de 1:1 și [Omim]BF₄ ca aditiv).

Nr. crt.	Temperatură (°C)	Conv. (%)	Activitate (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	e.e. (%)	E
1.	30	46	0,380	85	27
2.	40	54	0,483	77	24
3.	50	43	0,354	78	15
4.	55	53	0,434	75	18
5.	60	54	0,436	73	17

Tabelul 2.51. Acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu preparatul (AK₁₉) obținut prin imobilizarea lipazei Amano AK prin entrapare în sol-gel (PrTMOS/TMOS la un raport molar de 1:1 și [Bmim]PF₆ ca aditiv).

Nr. crt.	Temperatură (°C)	Conv. (%)	Activitate (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	e.e. (%)	E
1.	30	54	0,424	80	31
2.	40	58	0,474	70	22
3.	50	59	0,489	68	23
4.	55	59	0,483	68	23
5.	60	59	0,496	67	19

Tabelul 2.52. Acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu preparatul (AK₅₅) obținut prin imobilizarea lipazei Amano AK prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (PrTMOS/TMOS la un raport molar de 1:1).

Nr. crt.	Temperatură (°C)	Conv. (%)	Activitate (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)	e.e. (%)	E
1.	30	23	0,096	91	51
2.	40	26	0,106	84	15
3.	50	24	0,097	86	17
4.	55	23	0,090	84	15
5.	60	27	0,114	82	14

Pe baza datelor din tabelele 2.47. - 2.52. s-a realizat Figura 2.30 care prezintă excesul enantiomeric după 24 de ore de reacție la acilarea 2-hexanolului prin biocataliză cu lipaza Amano AK nativă și imobilizată prin mai multe metode.

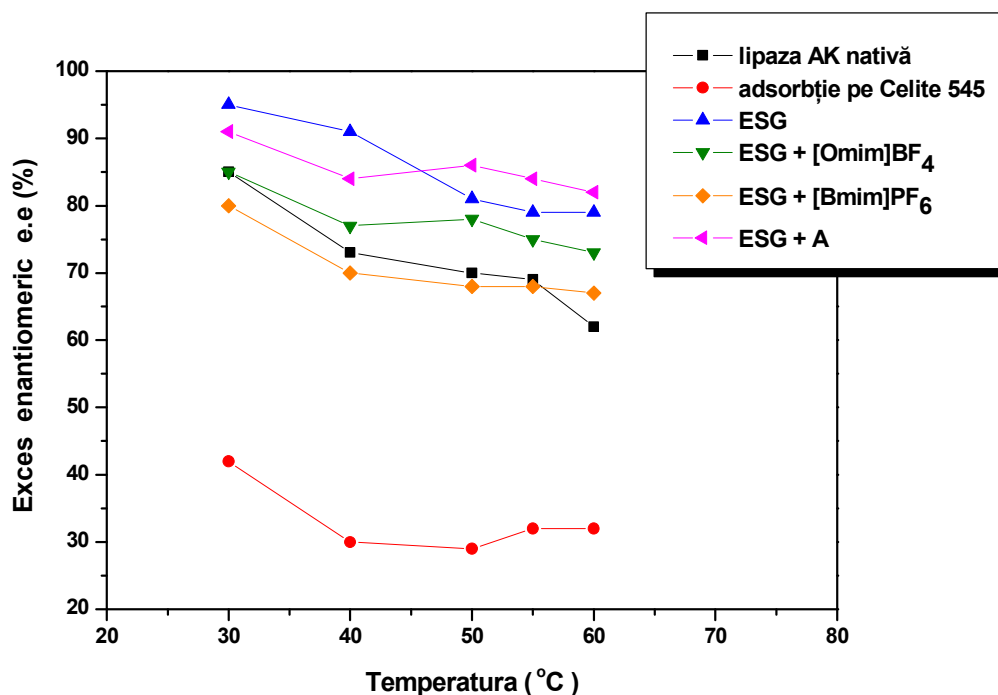


Figura 2.30. Influența temperaturii asupra enantioselectivității lipazei Amano AK nativă și imobilizată prin diferite metode, în reacția de acilare a 2-hexanolului.

Din Figura 2.30 se poate observa scăderea enantioselectivității la creșterea temperaturii pe intervalul studiat, scădere mai pronunțată pentru enzima nativă decât în cazul preparatelor imobilizate prin entrapare și entrapare combinată cu adsorbție. Făcând o comparație între preparatele entrapate cu sau fără lichid ionic ca și aditiv, se poate observa că cele imobilizate în prezență de lichid ionic au dat valori mai mici ale excesului enantiomeric, însă stabilitatea termică pe intervalul studiat a fost mai bună decât în cazul enzimei entrapate cu PEG ca aditiv. Preparatul imobilizat doar prin adsorbție pe Celite 545 a dat cele mai mici valori ale enantioselectivității. Prin imobilizare folosind metoda de entrapare combinată cu adsorbție s-a obținut cea mai bună stabilitate termică, scăderea excesului enantiomeric la creșterea temperaturii este foarte lentă și mult mai puțin pronunțată decât în cazul enzimei native. Acest preparat a avut însă activități mai mici decât cele obținute prin entrapare simplă.

2.6.1. Concluzii

1. În cadrul studiului de termostabilitate, s-a observat o tendință de creștere a conversiei și a activității de transesterificare a preparatelor enzimaticе odată cu creșterea temperaturii de reacție pe intervalul 30-60°C, asociată cu o scădere mai puțin pronunțată a enantioselectivității comparativ cu enzima nativă.

2. Preparatele imobilizate prin entrapare în sol-gel în prezență de lichid ionic ca și aditiv au dat valori mai mici ale excesului enantiomeric, însă stabilitatea termică pe intervalul studiat a fost mai bună decât în cazul preparatului obținut cu PEG ca aditiv.

3. Utilizând metoda de imobilizare combinată s-a obținut cea mai bună stabilitate termică, scăderea excesului enantiomeric odată cu creșterea temperaturii a fost foarte lentă.

2.7. Studiul reutilizării lipazei imobilizate prin entrapare în sol-gel, simplă sau combinată

2.7.1. Reutilizarea în mediu organic

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 pînă cînd activitatea sa scade la mai puțin de 25% din cea inițială.

În acest studiu s-a urmărit influența numărului de reutilizări, în mediu de solvent organic (n-hexan), asupra performanțelor lipazei Amano AK din *Pseudomonas fluorescens* nativă și imobilizată prin metoda de entrapare în sol-gel (Metoda 2) și entrapare combinată cu adsorbție pe Celite 545 (Metoda 6), în reacția de acilare a 2-hexanolului (Zarcu și colab., 2008^f). Ca și silani precursori s-au folosit TMOS și OcTMOS sau PhTMOS la un raport molar de 1:1. După fiecare reutilizare, preparatul enzimatic a fost recuperat prin filtrare și spălare cu n-hexan și uscat la temperatura camerei.

Întrucât nu a fost posibilă recuperarea întregii cantități de preparat enzimatic, s-a recalculat rețeta de lucru în funcție de cantitatea de enzimă recuperată astfel încât raportul molar între reactanți să rămână același. Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele 2.53 și 2.54.

Tabelul 2.53. Reutilizarea lipazei Amano AK nativă și imobilizată prin metoda sol-gel (ESG) sau combinată cu adsorbție pe Celite 545 (ESG+A), utilizând ca silani precursori OcTMOS/TMOS la un raport molar de 1:1, în reacția de acilare a 2-hexanolului în n-hexan.

Număr reutilizare	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)			Activitate totală relativă ¹			Exces enantiomeric e.e. (%)		
	Lipaza nativă	ESG ²	ESG+A ³	Lipaza nativă	ESG ²	ESG+A ³	Lipaza nativă	ESG ²	ESG+A ³
0	2,446	0,479	0,273	1	1	1	73	77	60
1	1,840	0,655	0,340	0,75	1,03	1,08	79	77	59
2	1,204	0,840	0,360	0,49	0,82	1,02	82	81	63
3	1,064	1,002	0,317	0,20	0,83	0,86	80	81	77
4	1,505	1,150	0,382	0,14	0,71	0,90	83	83	73
5	-	1,268	0,387	-	0,53	0,80	-	96	77

¹Raportată la activitatea din primul ciclu de reacție

²Imobilizată prin entrapare în sol-gel (preparatul AK₇)

³Imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (preparatul AK₅₆)

Tabelul 2.54. Reutilizarea lipazei Amano AK nativă și imobilizată (ESG și ESG+A) utilizând ca și silani precursori PhTMOS/TMOS la un raport molar de 1:1, în reacția de acilare a 2-hexanolului în n-hexan.

Număr reutilizare	Activitate ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)			Activitate totală relativă ¹			Exces enantiomeric e.e. (%)		
	Lipaza nativă	ESG ²	ESG+A ³	Lipaza nativă	ESG ²	ESG+A ³	Lipaza nativă	ESG ²	ESG+A ³
0	2,446	0,137	0,237	1	1	1	73	99	71
1	1,840	0,159	0,278	0,75	0,86	1,11	79	84	71
2	1,204	0,166	0,297	0,49	0,45	1,0	82	83	77
3	1,064	0,146	0,332	0,20	0,20	0,96	80	99	76
4	1,505	0,154	0,377	0,14	0,12	0,95	83	99	76
5	-	0,112	0,382	-	0,04	0,89	-	99	77

¹Raportată la activitatea din primul ciclu de reacție

²Imobilizată prin entrapare în sol-gel (preparatul AK₉)

³Imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (preparatul AK₅₇)

Din (tabelele 2.53 - 2.54) se poate observa că activitatea de transesterificare a enzimei a crescut cu fiecare ciclu de reutilizare, în cazul dublei imobilizării (de 1,12 – 1,61 ori la ultima reutilizare). Aceasta arată că anumiți compuși cu rol inhibitor (posibil silani nereacționați) au fost îndepărtați încet din matricea de sol-gel în timpul desfășurării reacției.

Activitatea totală relativă în mai multe cicluri de reutilizare a fost reprezentată în diagrama din Figura 2.31. Se remarcă faptul că în cazul lipazei native această activitate a scăzut pronunțat de la prima reutilizare și a fost de numai 14% după 4 reutilizări, ceea ce s-a datorat mai ales pierderilor fizice, întrucât activitatea efectivă a scăzut doar în mică măsură. Recuperarea enzimei native după fiecare ciclu de reacție a fost însă dificilă, ținând cont de cantitățile mici care s-au folosit.

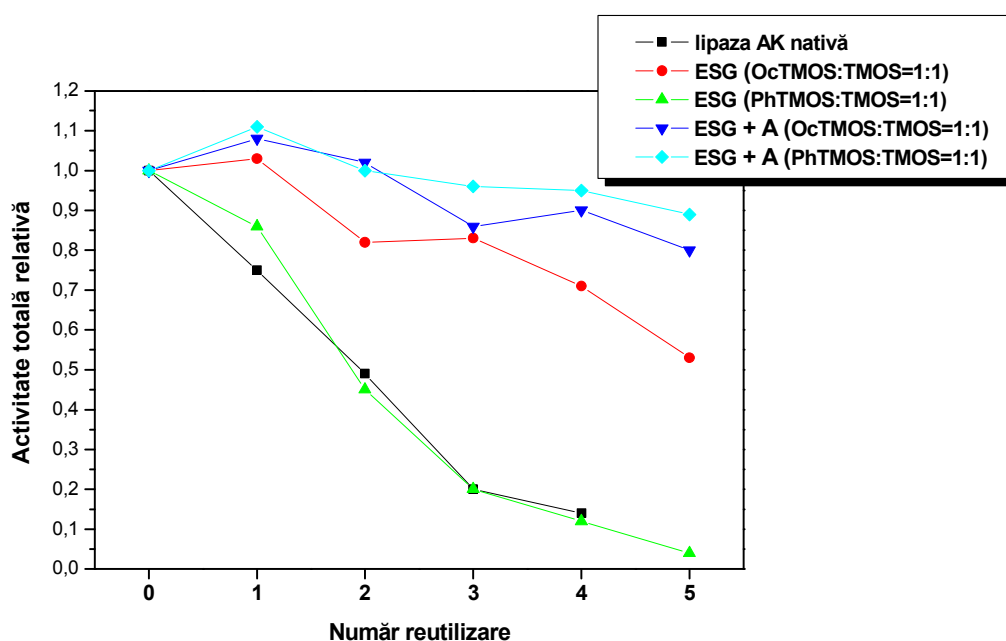


Figura 2.31. Influența reutilizării asupra activității totale relative a lipazei Amano AK nativă și imobilizată prin entrapare în sol-gel (ESG) și entrapare combinată cu adsorbție (ESG + A), în reacția de acilare a 2-hexanolului în n-hexan.

În aceleași condiții, preparatele imobilizate au păstrat cel puțin 50%, din activitatea totală inițială după 5 reutilizări, cu excepția preparatului obținut prin entrapare și cu grupări fenil în matricea de sol-gel, care și-a pierdut activitatea foarte repede ajungând la aceeași activitate totală relativă după numai două reutilizări. Preparatele obținute prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție au avut o stabilitate operațională mai mare decât cele obținute prin entrapare simplă.

Explicația poate fi că imobilizarea prin entrapare și depunere pe un adsorbent reduce pierderile fizice de enzimă prin spălarea ei din rețeaua de sol-gel în timpul reacției. Astfel, numărul de cicluri de reutilizare pentru care activitatea relativă s-a menținut la peste 50% din activitatea inițială a fost de 2 în cazul enzimei native, iar pentru majoritatea preparatelor imobilizate a fost de 5.

Enantioselectivitatea enzimei native a crescut la reutilizări, dar acest lucru este normal pentru că activitatea enzimei scăzând s-au înregistrat conversii mai mici după același timp de reacție (24 de ore). Trebuie remarcat efectul pozitiv pe care l-a avut imobilizarea, excesul enantiomeric al produsului fiind mai mare după 5 reutilizări decât în momentul inițial, această creștere fiind asociată cu menținerea în mare măsură a activității catalitice. Excepția a constituit-o, așa cum s-a arătat, preparatul obținut prin entrapare pe bază de PhTMOS și TMOS ca silani precursori.

2.7.2. Reutilizarea în mediu de lichid ionic

Pentru acest studiu, lipaza Amano AK din *Pseudomonas fluorescens* a fost imobilizată prin entrapare în sol-gel (Metoda 2) și entrapare combinată cu adsorbție pe Celite 545 (Metoda 6), cu [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare. Reacția studiată a fost acilarea 2-hexanolului cu acetat de vinil, în mediu de lichid ionic ([Bmim]PF₆ sau [Omim]BF₄) (Zarcu și colab., 2008^d). Ca silani precursori s-au folosit TMOS și OcTMOS la un raport molar de 1:1. După fiecare reutilizare (24 de ore de reacție) s-a realizat extracția produsului din mediul de reacție cu n-hexan, conform modului de lucru descris la partea experimentală (a se vedea Cap. 3.3.2.2.). Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelele 2.55 - 2.56.

Tabelul 2.55. Reutilizarea lipazei Amano AK nativă și imobilizată (ESG și ESG+A) utilizând ca silani precursori OcTMOS/TMOS la un raport molar de 1:1 și [Omim]BF₄ ca aditiv, în reacția de acilare a 2-hexanolului în mediu de [Bmim]PF₆.

Număr reutilizare	Activitate (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)			Activitate totală relativă ¹			Exces enantiomeric e.e. (%)		
	Lipaza nativă	ESG ²	ESG+A ³	Lipaza nativă	ESG ²	ESG+A ³	Lipaza nativă	ESG ²	ESG+A ³
0	2,605	0,700	0,279	1	1	1	58	32	39
1	1,928	0,609	0,277	0,74	0,87	0,99	49	34	48
2	2,084	0,492	0,228	0,80	0,70	0,82	50	39	48
3	2,162	0,503	0,241	0,83	0,72	0,86	52	55	61
4	2,084	0,482	0,233	0,80	0,69	0,84	61	63	69
5	2,006	0,465	0,227	0,77	0,66	0,81	64	68	73

¹Raportată la activitatea din primul ciclu de reacție

²Imobilizată prin entrapare în sol-gel (preparatul AK₂₄)

³Imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (preparatul AK₆₄)

Tabelul 2.56. Reutilizarea lipazei Amano AK nativă și imobilizată (ESG și ESG+A) utilizând ca și silani precursori OcTMOS/TMOS la un raport molar de 1:1 și [Omim]BF₄ ca aditiv, în reacția de acilare a 2-hexanolului în mediu de [Omim]BF₄.

Număr reutilizare	Activitate (μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹)			Activitate totală relativă ¹			Exces enantiomeric e.e. (%)		
	Lipaza nativă	ESG ²	ESG+A ³	Lipaza nativă	ESG ²	ESG+A ³	Lipaza nativă	ESG ²	ESG+A ³
0	2,247	0,511	0,252	1	1	1	80	59	59
1	2,362	0,502	0,259	1,05	0,98	1,03	71	58	52
2	2,018	0,438	0,238	0,90	0,86	0,94	73	57	63
3	2,388	0,483	0,245	1,06	0,95	0,97	63	57	59
4	2,288	0,469	0,235	1,02	0,92	0,93	62	65	70
5	2,302	0,459	0,239	1,02	0,90	0,95	69	67	72

¹Raportată la activitatea din primul ciclu de reacție

²Imobilizată prin entrapare în sol-gel (preparatul AK₂₄)

³Imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (preparatul AK₆₄)

Din tabelele 2.55 și 2.56 se poate observa că în mediu de lichide ionice stabilitatea operațională a lipazei native este mult mai mare decât în medii organice valoarea activității efective menținându-se apropiată de cea inițială, iar activitatea totală după 5 reutilizări este între 77-100% față de cea inițială. În ce privește preparatele imobilizate, stabilitatea operațională la reutilizare a fost mai bună atunci când mediul de reacție a fost [Omim]BF₄, indiferent de tehnica de imobilizare folosită. Considerând ambele lichide ionice utilizate, pierderile de activitate după 5 reutilizări au fost mai mici pentru preparatele dublu imobilizate (5-19 %) decât pentru cele obținute doar prin simpla entrapare (10-34%).

În ce privește influența reutilizării enzimei asupra enantioselectivității, s-a observat în general o enantioselectivitate mai mare a reacției atunci când ea a avut loc în [Omim]BF₄. În cazul enzimei native, în mediu de [Bmim]PF₆ enantioselectivitatea a crescut ușor, iar în [Omim]BF₄ s-a înregistrat o scădere a excesului enantiomeric pe parcursul reutilizărilor. La preparatele imobilizate, de fiecare dată excesul enantiomeric a fost mai mare după 5 reutilizări decât valoarea măsurată în primul ciclu. Această creștere a fost mai însemnată când lichidul ionic utilizat ca mediu de reacție a fost [Bmim]PF₆ unde excesul enantiomeric e.e. a crescut, față de prima utilizare, de până la 2,1 ori pentru preparatele entrapate în sol-gel (ESG) și respectiv de 1,9 ori pentru cele dublu imobilizate (ESG + A). Probabil că nu putem vorbi despre o creștere a enantioselectivității ca urmare a modificărilor din matricea de sol-gel, pentru că probabilitatea unor asemenea modificări este mică după ce rețeaua a fost formată. Creșterea performanțelor catalitice ale enzimelor imobilizate la reutilizare se datorește probabil faptului că o serie de componente ale sistemului de reacție de la imobilizare, de exemplu silani nereacționați sau metanol obținut în urma reacțiilor de policondensare, se pot adsorbi sau lega prin legături de hidrogen de suport, cu influență nefavorabilă asupra activității și enantioselectivității enzimei.

Prin reutilizarea repetată a enzimei, acești compuși sunt eliminați treptat, iar enzima poate să se așeze într-o configurație mai favorabilă pentru a crește viteza de reacție a izomerului favorizat.

2.7.3. Concluzii

1. Imobilizarea este o metodă eficientă care permite folosirea repetată a enzimei cu menținerea caracteristicilor biocatalitice. Metoda combinată este cea mai indicată deoarece imobilizarea prin efect dublu, de închidere a enzimei în rețea și depunere pe suport, reduce pierderile fizice de enzimă concomitent cu menținerea unei activități și enantioselectivități ridicate.

2. Entraparea combinată cu adsorbție determină o creștere însemnată a stabilității enzimei, activitatea reziduală după 4 reutilizări în mediu organic fiind 90-95% din cea inițială, în timp ce pentru enzima nativă această valoare este de numai 14%. De asemenea, enantioselectivitatea după reutilizare se menține la valori apropiate sau chiar mai mari comparativ cu primul ciclu de utilizare pentru preparatele imobilizate prin entrapare în sol-gel.

3. Și în cazul reutilizării în mediu de lichid ionic se remarcă avantajul important al imobilizării atunci când se intenționează folosirea repetată a enzimei. Metoda combinată este cea mai indicată, pierderile de activitate după 5 reutilizări au fost mai mici pentru preparatele dublu imobilizate (5-19 %) decât pentru cele obținute doar prin simpla entrapare (10-34%).

4. Indiferent de lichidul ionic utilizat ca mediu de reacție pentru reutilizare, preparatele imobilizate, în special cele obținute prin metoda combinată au prezentat valori ridicate ale excesului enantiomeric e.e., care au crescut odată cu creșterea numărului de reutilizări.

2.8. Caracterizarea preparatelor obținute prin metoda sol-gel

2.8.1. Investigarea structurii preparatelor imobilizate cu ajutorul microscopiei electronice de scanare cuplată cu microanaliză prin raze X (SEM-EDX)

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. În continuare va fi discutat unul dintre tipurile de preparate obținute, cel care s-a obținut din silanii precursori OcTMOS și TMOS la un raport molar 1:1, iar în Anexă sunt prezentate toate imaginile, împreună cu spectrele EDX (Energy-dispersive X-ray).

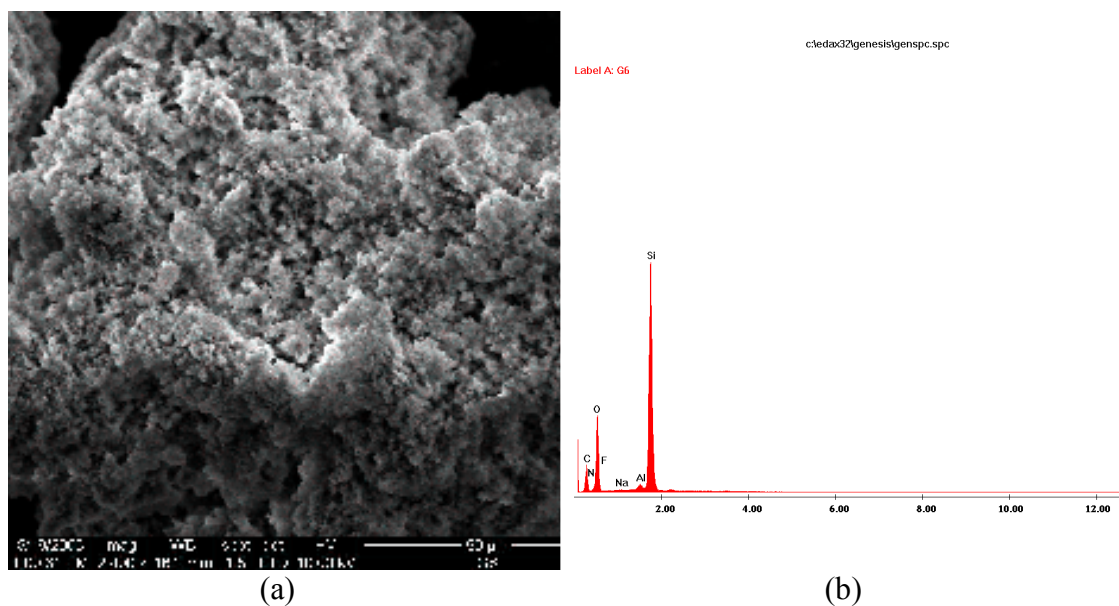


Figura 2.32. Imaginea SEM (a) și spectrul EDX (b) al sol-gelului martor obținut din precursorii OctMOS și TMOS.

Sol-gelul martor obținut din silanii precursori menționați prezintă o structură poroasă care conține nanoparticule sub formă de sfere într-o structură aglomerată (Figura 2.32.a). Principalele elemente care apar în spectrul EDX (Figura 2.32.b) sunt siliciul, oxigenul și carbonul, dar apare și azot, probabil provenit din soluția tampon cu care s-a spălat gelul cât și sodiu și fluor din catalizatorul de NaF care a fost utilizat.

În cazul în care sol-gelul martor s-a sintetizat cu lichid ionic în calitate de aditiv, imaginea SEM prezintă de asemenea o structură aglomerată, dar mult mai amorfă (Figura 2.33.a). Prezența lichidului ionic modifică morfologia suprafeței gelului. Compoziția elementală este aceeași ca și în cazul sol-gelului martor realizat fără lichid ionic (Figura 2.33.b).

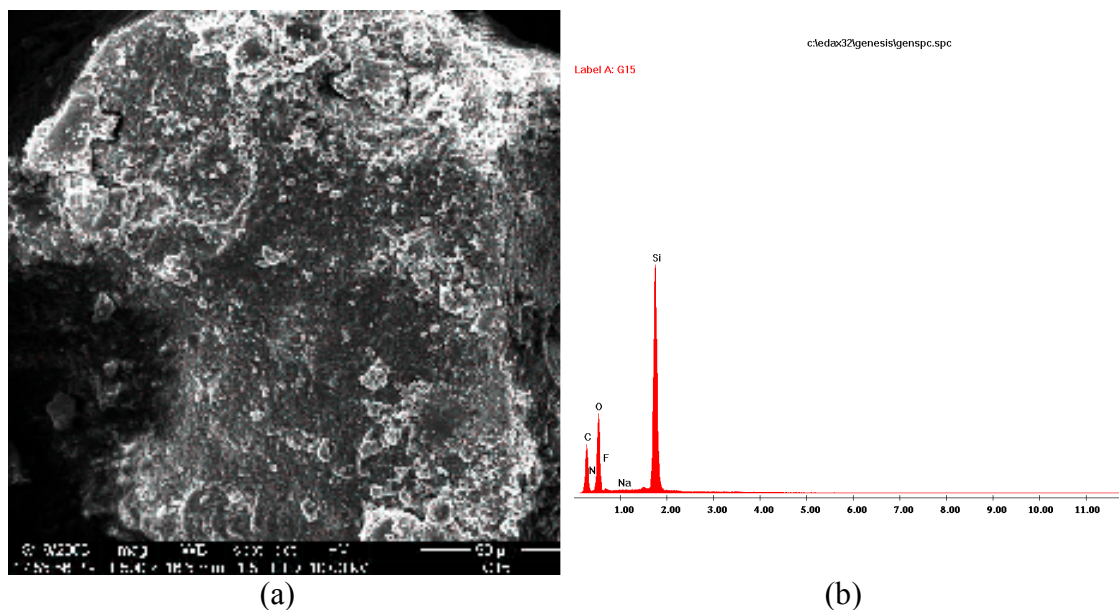


Figura 2.33. Imaginea SEM (a) și spectrul EDX (b) al sol-gelului martor obținut din precursorii OctMOS și TMOS cu [Omim]BF₄ ca aditiv.

În cazul lipazei AK imobilizate prin entrapare în sol-gel folosind ca aditiv polietilenglicol, imaginea SEM arată o structură mai poroasă decât în cazul gelului martor, nanoparticulele fiind și de data aceasta de formă sferică. În spectrul EDX (Figura 2.34.b), se observă creșterea conținutului de carbon comparativ cu sol-gelurile martor, ceea ce arată că în prezența enzimei și a acestui aditiv se modifică morfologia gelului care se formează, resturile octil fiind orientate în mai mare măsură spre zona de suprafață.

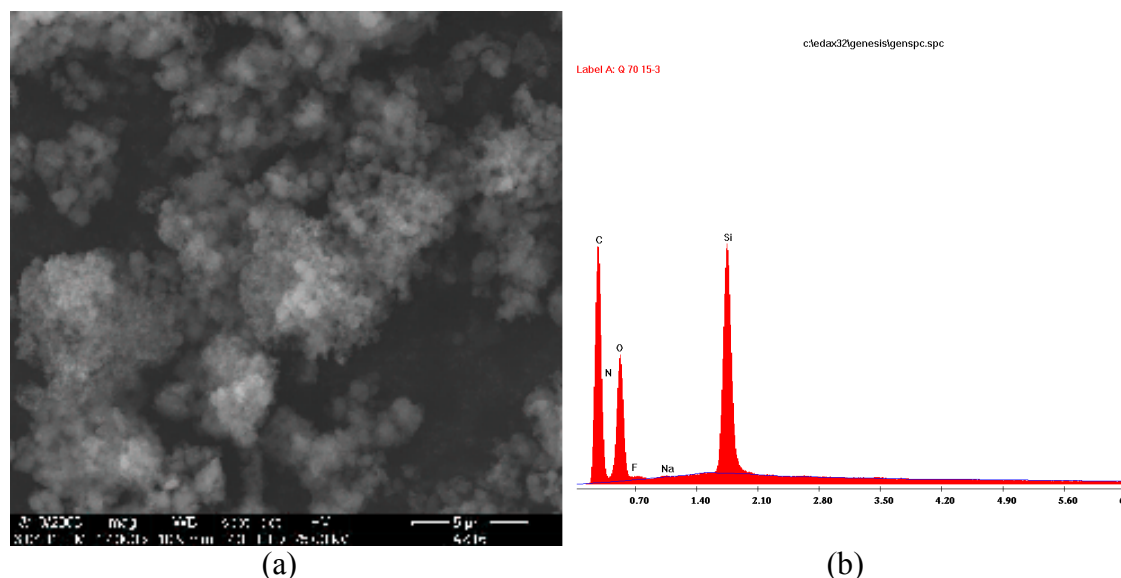


Figura 2.34. Imaginea SEM (a) și spectrul EDX (b) al lipazei AK entrapate în sol-gel obținut din precursorii OctMOS și TMOS.

Preparatul care s-a obținut folosind ca aditiv lichidul ionic [Bmim]PF₆ în loc de polietilenglicol arată o imagine SEM a suprafeței mult diferită față de cel precedent. Se poate observa o structură aglomerată, mult mai amorfă, sub formă de blocuri neregulate (Figura 2.35.a). Din spectrul EDX (Figura 2.35.b) rezultă că în zona de suprafață avem în majoritate silice, gruparea hidrofobă și enzima probabil că se găsesc de data aceasta în porii interiori ai structurii de sol-gel. Se mai observă prezența printre elemente a fosforului, ceea ce arată că o parte din lichidul ionic a fost înglobată în structura formată. Pe baza acestei structuri aglomerate și amorfe, s-ar putea presupune că activitatea va scădea din cauza împiedicării accesului reactanților la enzimă. În realitate nu s-a observat așa ceva, acest preparat având cea mai mare activitate dintre toate cele obținute prin entrapare pe bază de precursori OctMOS și TMOS, 0,648 μmoli·h⁻¹·mg⁻¹, comparativ cu 0,479 μmoli·h⁻¹·mg⁻¹ la preparatul obținut cu polietilenglicol ca aditiv (Zarcu și colab., 2009^b). Rezultă că analiza structurală doar a zonei de suprafață, deși oferă o serie de informații utile, nu este suficientă pentru a se putea trage concluzii asupra activității enzimei, pentru că nu permite localizarea enzimei.

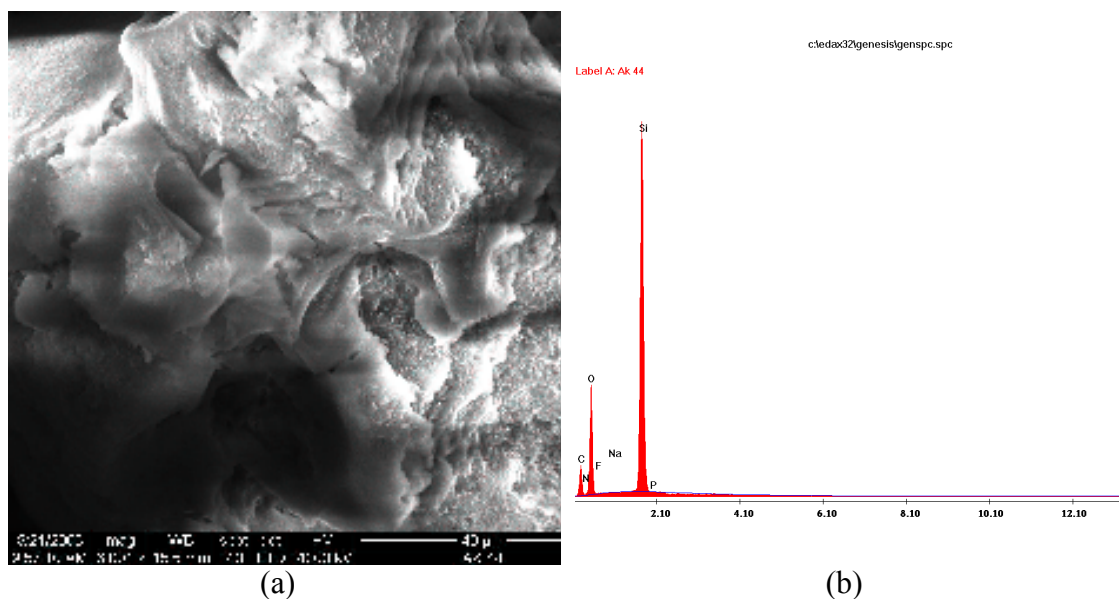


Figura 2.35. Imaginea SEM (a) și spectrul EDX (b) al lipazei AK entrapate în sol-gel obținut din precursorii OctTMOs și TMOs cu $[Bmim]PF_6$ ca aditiv.

Utilizarea ca aditiv a unui alt lichid ionic $[Omim]BF_4$ a dus la formarea unei structuri mai puțin amorfe, dar și de data aceasta ea rămâne neregulată, sub formă de blocuri (Figura 2.36.a). În spectrul EDX se observă prezența borului, deci și de data aceasta o parte a lichidului ionic a rămas în structura xerogelului obținut după spălare și uscare (Zarcu și colab., 2009^b). Se confirmă conținutul redus de carbon în zona de suprafață, care a fost constatat și la preparatul obținut cu celălalt lichid ionic (Figura 2.36.b).

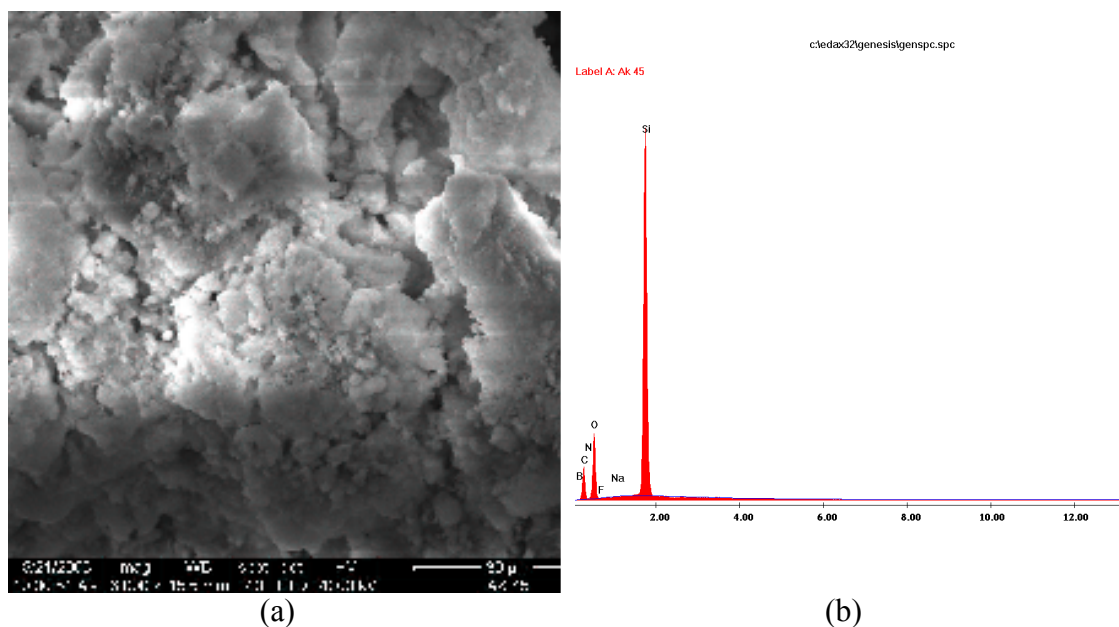


Figura 2.36. Imaginea SEM (a) și spectrul EDX (b) al lipazei AK entrapate în sol-gel obținut din precursorii OctTMOs și TMOs cu $[Omim]BF_4$ ca aditiv.

Utilizarea metodei combinate de entrapare și adsorbție pe Celite a dus la o structură total diferită a preparatului, așa cum de fapt era și de așteptat. Din imaginea SEM prezentată în Figura 2.37.a se poate observa că zonele poroase alternează cu structuri sub formă de sfere și fagure, acestea din urmă provenite de la suportul de Celite, așa cum dovedesc și imaginile altor preparate similare care au fost prezentate în Figura 2.17. Structura este mai puțin aglomerată decât în cazul preparatelor obținute prin entrapare simplă. În ce privește compoziția elementală dată de spectrul EDX (Figura 2.37.b), se observă prezența clorului și absența fluorului, întrucât acest preparat a fost obținut cu o rețetă care a folosit catalizator de HCl pentru hidroliza silanilor, iar gelifierea s-a realizat fără catalizator de NaF. Ionul de clorură s-a fixat preferențial în zona de suprafață a preparatului. Elementele Na, Al, Ca și K provin din Celite, care este un aluminosilicat cu conținut și de alte metale.

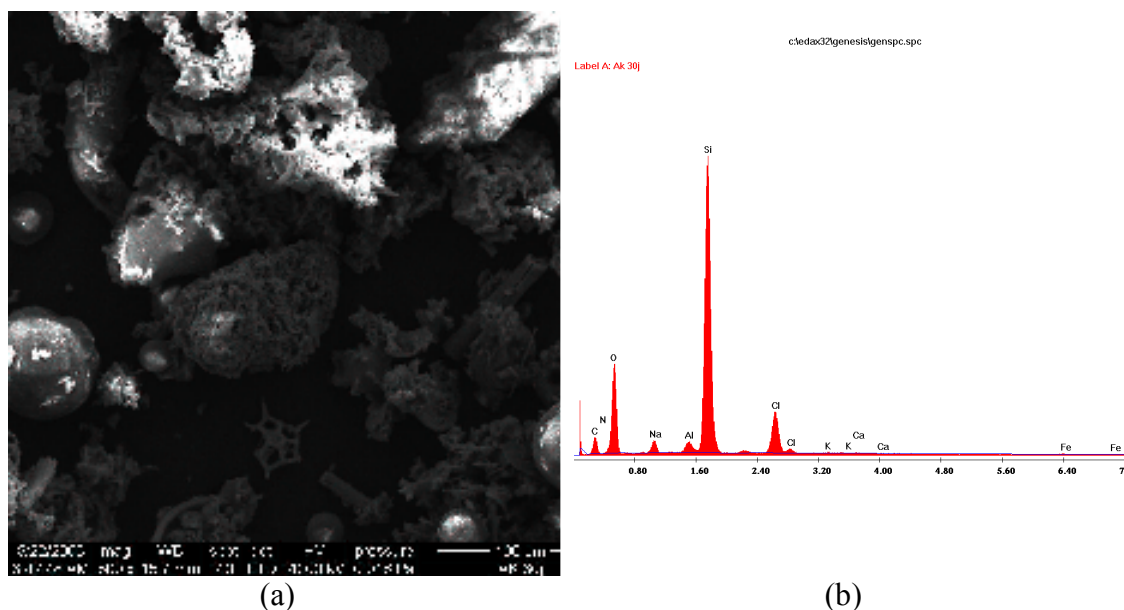


Figura 2.37. Imaginea SEM (a) și spectrul EDX (b) al lipazei AK imobilizate prin metoda combinată de entrapare în sol-gel cu precursorii OctMOS și TMOS și adsorbție pe Celite.

În Tabelul 2.57 sunt prezentate rezultatele analizei calitative a principalelor elemente identificate în toate preparatele care au fost supuse acestei investigații structurale și ale căror imagini SEM și spectre EDX sunt date în Anexă. Ele confirmă prezența componentelor utilizate în cursul procesului de imobilizare și în preparatul rezultat după spălare și uscare, ceea ce arată faptul că ele rămân parțial înglobate, fizic sau chimic, în xerogelul obținut. Astfel, toate preparatele conțin carbon, oxigen și siliciu care sunt componentele de bază ale matricii de sol-gel. Preparatele obținute prin metoda combinată conțin și aluminiu, care este un constituent al suportului de Celite. Dacă metoda de imobilizare a utilizat drept catalizator pentru gelifiere NaF, ambele aceste elemente se regăsesc și în xerogel, ceea ce dovedește faptul că fluorura de sodiu nu este complet spălată în faza de spălare a gelului, o parte rămânând probabil în pori. Sursă de fluor mai este și lichidul ionic utilizat ca aditiv. În funcție de utilizarea ca aditiv a lichidului ionic [Bmim]PF₆ sau [Omim]BF₄, printre elementele identificate se regăsește și fosfor, respectiv bor. Așadar și lichidul ionic rămâne parțial inclus în structura xerogelului, ceea ce înseamnă că în prezență de lichide ionice se schimbă morfologia suportului de imobilizare.

Deoarece s-a demonstrat că lichidele ionice au rol de protecție a enzimei împotriva denaturării, această modificare structurală nu poate fi dăunătoare.

În ce privește prezența enzimei în preparat, aceasta ar putea fi demonstrată de existența azotului printre elementele identificate. Azot se găsește într-adevăr în toate preparatele, însă nu numai în cele care conțin enzimă ci și în sol-gelurile martor, realizate fără enzimă. Proveniența sa se poate explica numai prin faptul că pentru spălarea gelurilor maturate s-a folosit și soluție tampon TRIS/HCl, care conține *tris*(hidroximetil)-aminometan, iar la uscarea gelului doar apa s-a evaporat și compusul respectiv a rămas adsorbit pe suprafața xerogelului. Prin urmare, dovada imobilizării enzimei rămâne în primul rând faptul că ea își menține activitatea după entrapare, chiar și după mai multe cicluri de reacție.

Tabelul 2.57. Analiza SEM-EDX a unor preparate de lipază Amano AK imobilizate prin metoda sol-gel și metoda combinată.

Cod preparat, caracteristici	Elemente prezente (%)								
	C	N	O	Na	Al	Si	F	P	B
Silani precursori: MeTMOS:TMOS (1:1)									
Sol-gel martor Catalizator NaF	14,84	1,85	48,54	0,07	-	34,36	0,34	-	-
AK ₃ Catalizator NaF	15,82	1,93	43,96	0,26	-	37,57	0,46	-	-
AK ₄₃ Sol cu etanol	42,95	2,87	36,39	-	0,70	17,09	-	-	-
AK ₁₆ Catalizator NaF Aditiv [Bmim]PF ₆	19,34	3,16	40,12	0,12	-	28,82	7,05	1,39	-
AK ₁₅ Catalizator NaF Aditiv [Omim]BF ₄	18,92	1,86	34,42	0,47	-	37,24	1,16	-	5,92
AK ₅₄ Metoda combinată Sol cu HCl, Celite	6,90	2,08	43,23	2,58	3,29	38,77	-	-	-
Silani precursori: MeTMOS:TMOS (2:1)									
AK ₄₄ Sol cu etanol	21,24	1,85	43,43	-	-	33,48	-	-	-
Silani precursori: PrTMOS:TMOS (1:1)									
Sol-gel martor Catalizator NaF	27,76	1,86	37,23	0,06	-	32,76	0,32	-	-
AK ₅ Catalizator NaF	28,47	2,03	36,85	0,27	-	31,97	0,41	-	-
AK ₁₉ Catalizator NaF Aditiv [Bmim]PF ₆	57,51	2,26	31,67	0,07	-	8,14	0,34	0,02	-

Contribuții originale

AK ₁₈ Catalizator NaF Aditiv [Omim]BF ₄	36,37	1,95	37,61	0,10	0,61	21,49	0,14	-	1,72
AK ₅₅ Metoda combinată Sol cu HCl, Celite	14,13	1,96	34,76	0,74	1,75	45,24	-	-	-
Silani precursori: OcTMOS:TMOS (1:1)									
Sol-gel martor Catalizator NaF	32,30	1,72	29,79	0,11	0,93	35,10	0,04	-	-
AK ₇ Catalizator NaF	58,13	2,81	18,52	0,14	-	19,79	0,60	-	-
AK ₂₅ Catalizator NaF Aditiv [Bmim]PF ₆	31,88	2,38	34,99	0,10	-	30,16	0,46	0,03	-
AK ₂₄ Catalizator NaF Aditiv [Omim]BF ₄	36,63	1,60	20,50	0,07	-	23,28	0,19	-	17,73
AK ₅₆ Metoda combinată Sol cu HCl, Celite	25,61	1,01	33,72	2,10	1,32	29,01	-	-	-
Silani precursori: PhTMOS:TMOS (1:1)									
Sol-gel martor Catalizator NaF	43,53	2,18	32,31	0,02	-	21,61	0,35	-	-
AK ₉ Catalizator NaF	41,10	1,68	28,87	1,70	-	24,24	0,42	-	-
AK ₃₁ Catalizator NaF Aditiv [Bmim]PF ₆	42,66	1,39	23,58	-	-	31,82	0,40	0,15	-
AK ₃₀ Catalizator NaF Aditiv [Omim]BF ₄	43,10	1,68	17,91	0,02	-	20,74	0,36	-	16,19
AK ₅₇ Metoda combinată Sol cu HCl, Celite	53,22	2,66	27,04	0,90	0,55	14,28	-	-	-

Intensitatea peakurilor din spectrul de raze X cu dispersie de energie (EDX) permite și o evaluare semicantitativă a prezenței elementelor respective. Valorile obținute pentru preparatele analizate sunt de asemenea prezentate în Tabelul 2.57. Aceste date semicantitative trebuie considerate însă doar simple estimări în cazul nostru, deoarece distribuția diferitelor componente în preparat nefiind uniformă ele depind mult de zona care a fost analizată, iar această zonă este doar o zonă de pe suprafață, a cărei alegere a fost aleatoare.

Teoretic, conținutul în carbon ar fi trebuit să crească la preparatele care au fost obținute din precursorul OctMOS cu catenă alchil mai lungă (octil), comparativ cu cele care au fost obținute pe bază de PrTMOS și MeTMOS. În realitate, nu se constată acest lucru, ceea ce ne duce la concluzia că distribuția grupărilor alchil la suprafață este foarte neuniformă. Acest lucru este confirmat și în cazul preparatelor obținute prin metoda combinată, la care ar trebui ca să avem un conținut de carbon considerabil mai mic decât la cele imobilizate doar prin entrapare, datorită prezenței suportului de Celite. Un asemenea conținut redus se constată doar la preparatul obținut pe bază de MeTMOS și TMOS, în timp ce la cel din PhTMOS și TMOS este chiar mai mare decât la cele simplu entrapate. De aici rezultă că în cazul metodei combinate, sol-gelul se depune preferențial pe suprafața suportului de Celite și nu în interiorul porilor, ceea ce este favorabil din punct de vedere al accesului reactanților la enzimă. Pentru unele preparate obținute folosind ca aditiv [Omim]BF₄ s-a obținut o valoare a conținutului de bor mult mai mare decât cea care ar fi putut rezulta din cantitatea de lichid ionic ce a fost adăugată. Această anomalie poate fi de asemenea explicată prin faptul că lichidul ionic rămâne adsorbit preferențial la suprafața sol-gelului, ceea ce de fapt se poate observa și din imaginile SEM ale acestor preparate.

2.8.2. Caracterizarea preparatelor imobilizate prin spectroscopie IR

Spectroscopia IR poate oferi informații structurale importante despre xerogelurile rezultate în urma imobilizării lipazei prin metoda sol-gel. Dificultățile care apar sunt generate de faptul că fiind vorba despre amestecuri și nu compuși puri apar numeroase suprapuneri între benzile caracteristice diferitelor grupări, ceea ce face ca în numeroase publicații să existe interpretări eronate.

Rolul cel mai important al oricărei analize structurale ar fi acela de a pune în evidență în primul rând prezența enzimei, dar și a altor componente al căror rol după formarea xerogelului nu este încă bine clarificat. Astfel, nu se știe dacă diverșii aditivi folosiți pentru a favoriza formarea unei rețele poroase de un anumit tip (micro-, mezo- sau macroporoase) sau de a proteja rețeaua de o posibilă colapsare în timpul uscării rămân legați fizic sau sunt înglobați în gel prin formarea unor legături chimice.

Spectrul IR al enzimei native (Figura 2.38) a fost realizat prin tehnica de transmisie, în pastilă de KBr. El prezintă toate benzile caracteristice proteinelor, cele mai importante fiind cele care pot fi atribuite grupării amidice. Acestea apar în următoarele domenii:

- 3400-3200 cm⁻¹, banda corespunzătoare vibrațiilor de valență N-H. În spectrul din Figura 2.38 această bandă apare la 3310 cm⁻¹.

- 1700-1600 cm⁻¹, banda corespunzătoare vibrațiilor de valență C=O (în cea mai mare parte) și vibrațiilor de valență C-N amidice. În proteine, poziția exactă a acestei benzi depinde de conformația catenei polipeptidice de bază și de poziția legăturilor de hidrogen. În cazul nostru ea este situată la 1655 cm⁻¹.

- 1580-1510 cm⁻¹, banda care se datorește în cea mai mare parte vibrațiilor de deformare în plan ale grupării N-H. În Figura 2.38 se poate observa la 1549 cm⁻¹.

- 1450-1200 cm⁻¹, un grup complex de vibrații care depind mult de natura catenelor secundare și de legăturile de hidrogen din proteină. Ele nu pot fi în general folosite în scop de identificare deoarece în această regiune apar și o serie de alte benzi.

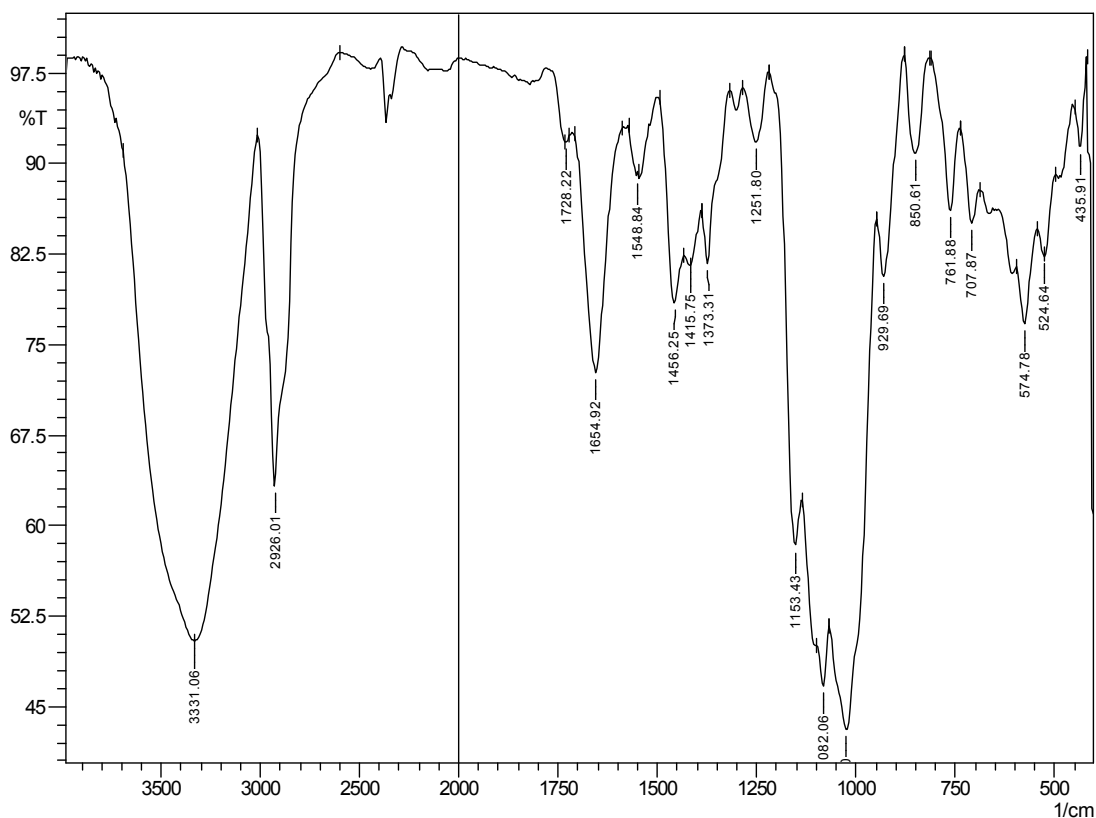


Figura 2.38. Spectrul IR al lipazei Amano AK native.

Benzile caracteristice grupărilor din catenele secundare ale aminoacizilor ce compun proteina sunt extrem de numeroase, datorită numărului mare al acestor grupări. Dintre cele care apar cu intensitate mare în spectrul din Figura 2.38 se pot menționa: banda de la 2926 cm^{-1} datorată vibrației de valență a grupării CH_3 prezentă în mai multe resturi de aminoacizi și cele de la 1020 cm^{-1} , 1082 cm^{-1} și 1153 cm^{-1} care corespund vibrațiilor de valență C-O din alcooli și acizi carboxilici, dar și grupările amino alifatică dau vibrații de valență C-N în acest domeniu.

Preparatele imobilizate de lipază Amano AK au fost caracterizate prin spectroscopie de IR, iar pentru comparație s-a realizat spectrul unui sol-gel martor în care nu s-a introdus enzimă. Aceste spectre au fost realizate prin tehnica ATR. Conform literaturii de specialitate, benzile de vibrație caracteristice pentru compușii cu siliciu sunt următoarele: $3700\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ (Si-OH, valență), $1275\text{-}1260$ (Si-CH₃, deformare în plan simetrică), $1110\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ (Si-O-CH₃, valență asimetrică), $1090\text{-}1030\text{ cm}^{-1}$ (Si-O-Si, valență asimetrică), $850\text{-}800$ (Si-O-CH₃, valență simetrică), 765 cm^{-1} (Si-CH₃, valență) (Pretsch, Bühlmann și Affolter, 2000). Spectrele obținute (Figura 2.39) au prezentat aceste benzi la $3700\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ (bandă largă), 1279 cm^{-1} , $1080\text{-}1060\text{ cm}^{-1}$ (mai multe benzi) și 779 cm^{-1} .

Nu se pot observa diferențe semnificative între benzile din spectrul sol-gelului martor și al preparatului care conține și enzimă, doar că majoritatea acestor benzi sunt mai intense ceea ce se poate datora și tehnicii ATR care a fost folosită. În mod surprinzător, în spectrul sol-gelului martor apare o bandă la 1635 cm^{-1} , deci prezența acestei benzi în spectrul preparatului enzimatic nu poate fi atribuită grupării amidice a enzimei, așa cum s-a procedat de alți cercetători (Pinheiro și colab., 2008). De fapt, banda corespunzătoare vibrației de valență a grupării C=O amidice s-a observat anterior că apare la un număr de undă puțin mai mare (1655 cm^{-1}) însă ea nu se poate distinge, fiind acoperită de o altă bandă mai intensă în condițiile în care concentrația enzimei în matricea de sol-gel nu este mai mare de 2-3%. Banda de la 1635 cm^{-1} se datorește probabil vibrației de deformare în plan a grupării OH din apa rămasă în preparat, întrucât preparatele nu au fost uscate decât la temperatura camerei.

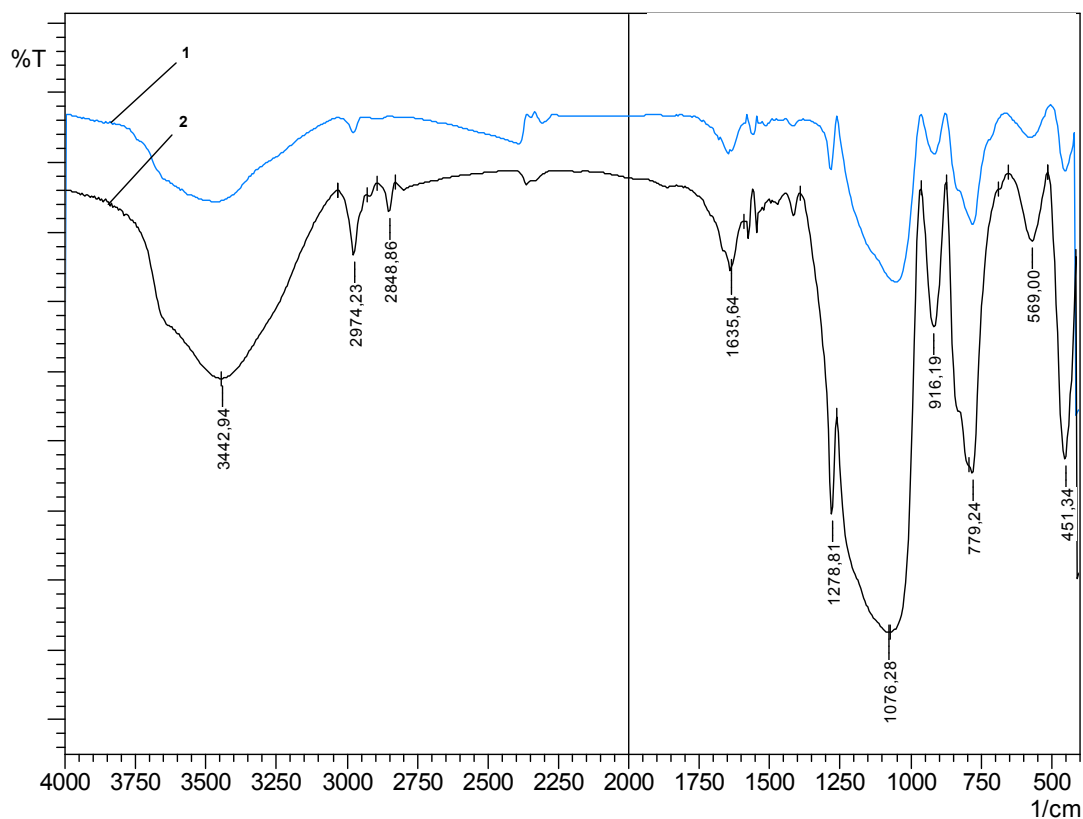


Figura 2.39. Spectrele IR pentru: **1.** matricea sol-gel martor cu MeTMOS:TMOS=1:1, **2.** preparatul obținut prin entraparea lipazei Amano AK în sol-gel cu MeTMOS:TMOS=1:1.

Dacă se studiază comparativ spectrele IR a două preparate obținute din aceeași precursori cu și fără adaos de lichid ionic (Figura 2.40), în spectrul preparatului cu lichid ionic (spectrul 2 din Figura 2.40) se poate observa prezența benzilor de la 1562 cm^{-1} și 1463 cm^{-1} caracteristice vibrației de valență a inelului imidazolinic (conform literaturii: 1550 cm^{-1} și $1500\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$) (Pretsch, Bühlmann și Affolter, 2000), ceea ce demonstrează că lichidul ionic a rămas în structura matricei de sol-gel și a protejat-o împotriva colapsării în timpul maturării și uscării.

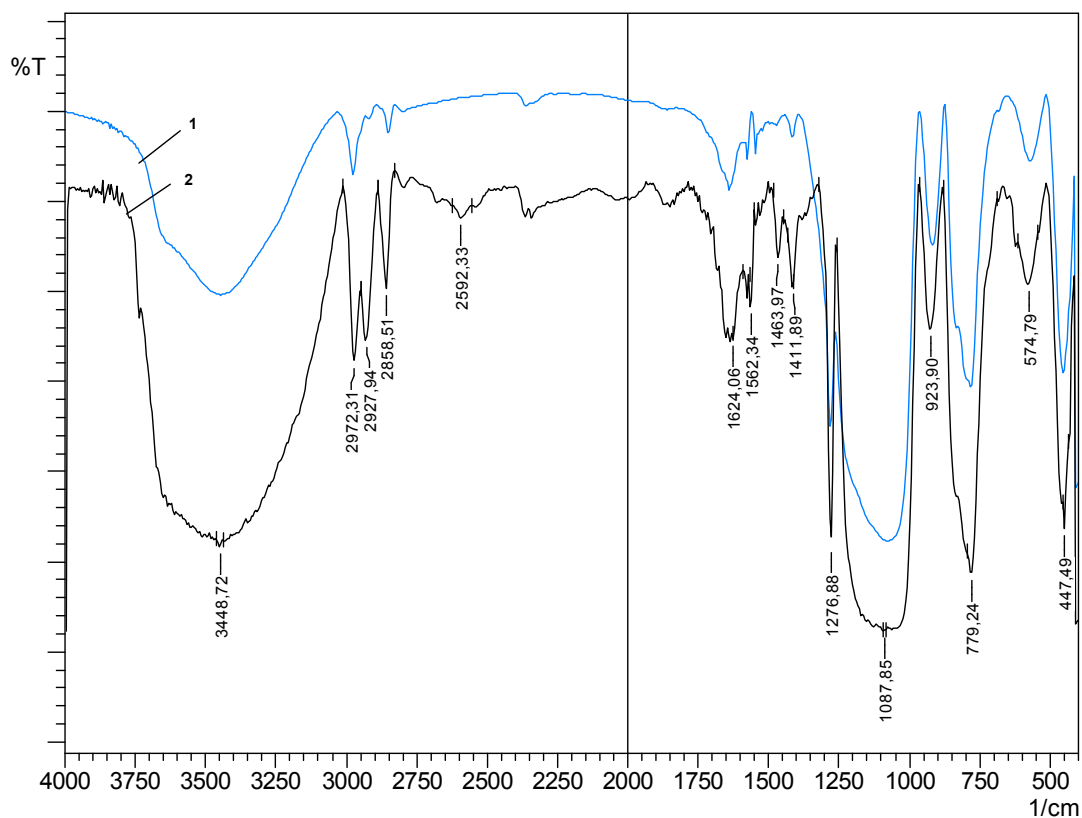


Figura 2.40. Spectrele IR pentru preparatele obținute prin entrapare în sol-gel cu: **1.** MeTMOS:TMOS=1:1 și **2.** MeTMOS:TMOS=1:1 și [Omim]BF₄ ca și aditiv.

În cazul preparatelor obținute din precursori silanici cu diferite grupări nehidrolizabile, (Figura 2.41) se poate observa intensitatea mult mai mare a benzilor caracteristice vibrațiilor de valență ale grupelor CH_3 și CH_2 de la 2950 cm^{-1} , respectiv 2850 cm^{-1} în preparatul cu grupare octil. În preparatul cu grupare fenil, se remarcă prezența benzilor de la 737 cm^{-1} și 696 cm^{-1} , pentru vibrația de deformare a grupării CH din inelul benzenic monosubstituit, respectiv pentru vibrația de schelet aromatic. Aceste rezultate confirmă structura presupusă a matricei de sol-gel.

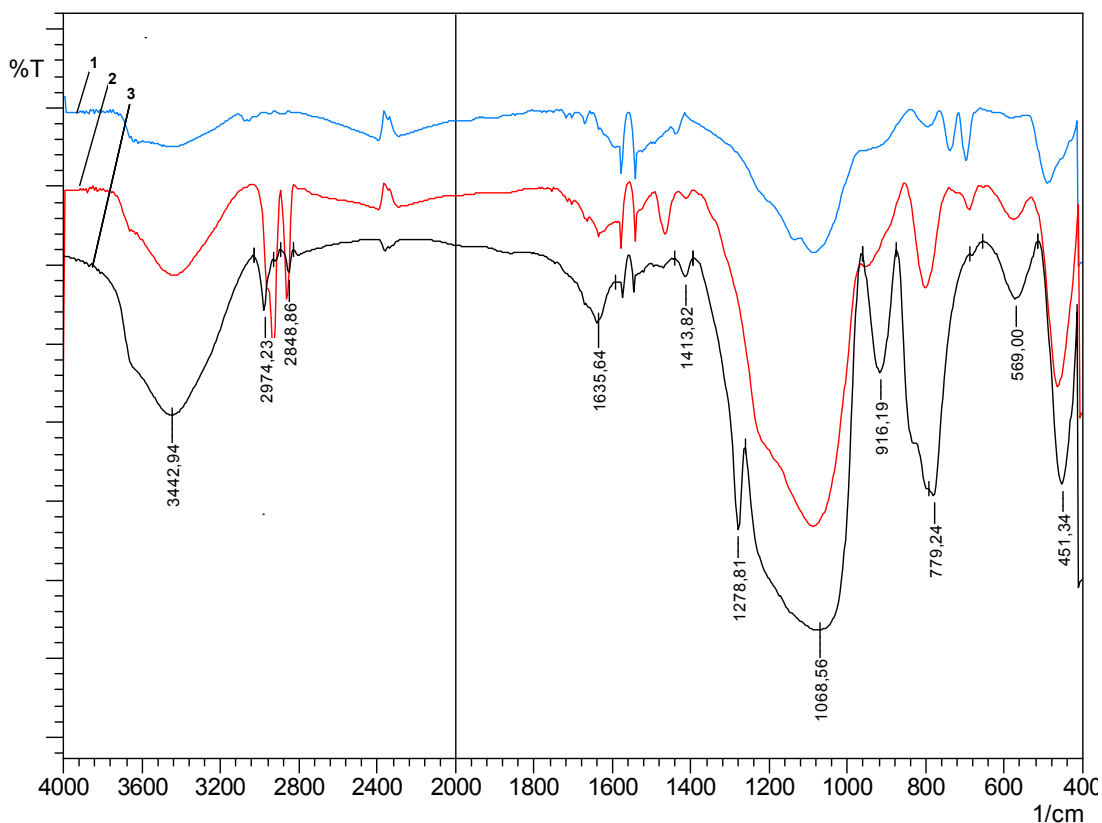


Figura 2.41. Spectrele IR pentru preparatele obținute prin entrapare în sol-gel cu: **1.** PhTMOS:TMOS=1:1, **2.** OcTMOS:TMOS=1:1 și **3.** MeTMOS:TMOS=1:1.

În cazul în care pentru immobilizare s-a utilizat metoda de entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (Figura 2.42), spectrul IR nu prezintă nici o diferență față de cel al preparatului obținut doar prin simplă entrapare, cu aceiași precursori (OcTMOS și TMOS). Acest lucru demonstrează faptul că sol-gelul s-a format într-adevăr și s-a depus pe suportul de Celite, de preferință pe suprafața acestuia.

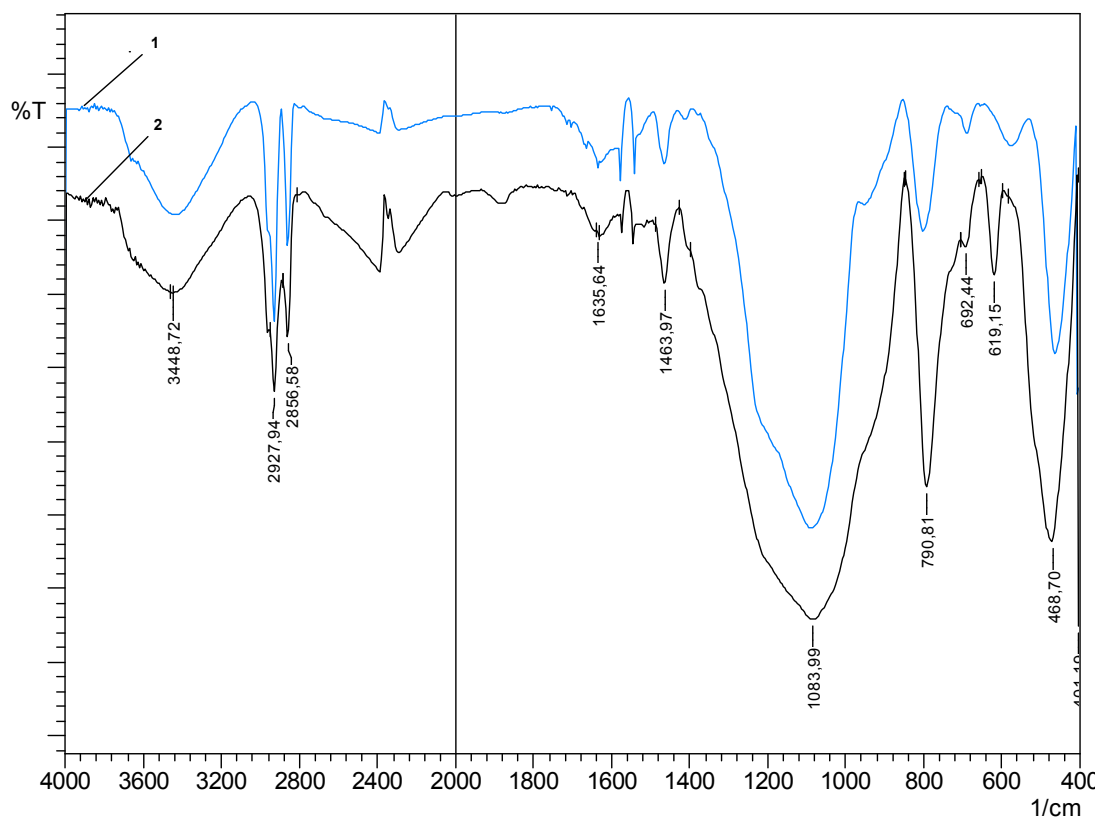


Figura 2.42. Spectrele IR pentru preparatele obținute prin: **1.** entrapare în sol-gel cu OcTMOS:TMOS=1:1, **2.** entrapare în sol-gel cu OcTMOS:TMOS=1:1 urmată de depunere pe Celite 545.

2.8.3. Concluzii

1. Imaginile SEM oferă informații utile despre microstructura, porozitatea și textura probelor analizate.

2. Imaginile SEM ale preparatelor immobilizate prin entrapare în sol-gel arată o structură mai poroasă, comparativ cu cea a gelului martor, iar din spectrele EDX, s-a observat o creștere a conținutului de carbon față de sol-gelurile martor, ceea ce confirmă prezența enzimei în xerogelurile obținute.

3. Prezența lichidului ionic ca aditiv modifică morfologia suprafeței gelului, iar prin prezența borului și a fosforului observată din spectrele EDX, se confirmă faptul că o parte a lichidului ionic a rămas în structura xerogelului obținut după spălare și uscare.

4. Utilizarea metodei combinate de entrapare și adsorbție pe Celite a dus la o structură total diferită a preparatului, imaginea SEM prezintă zone poroase ce alternează cu structuri sub formă de sfere și fagure.

5. Rezultatele analizei calitative a principalelor elemente identificate în toate preparatele care au fost supuse investigațiilor structurale confirmă prezența componentelor utilizate în cursul procesului de imobilizare și în preparatul rezultat după spălare și uscare, ceea ce arată faptul că ele rămân parțial înglobate, fizic sau chimic, în xerogelul obținut.

6. Spectroscopia IR este o metodă utilă pentru a confirma structura preparatelor obținute prin metoda sol-gel, deși prezența enzimei nu poate fi demonstrată datorită unor benzi care se suprapun peste benzile caracteristice grupării amidice.

7. Din spectrele IR rezultă că o parte din lichidul ionic folosit ca aditiv rămâne atașat sau încorporat de matricea de sol-gel.

8. Formarea xerogelurilor are loc cu încorporarea precursorului silanic ce conține gruparea hidrofobă nehidrolizabilă, benzile caracteristice acestuia regăsimu-se în spectrul preparatului.

9. La metoda combinată gelul care se formează se depune pe suprafața adsorbentului utilizat, fapt demonstrat de identitatea spectrelor celor două tipuri de preparate.

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), propiltrimetoxisilan PrTMOS 97% (Fluka), octiltrimetoxisilan OctTMOS 95% (Fluka), feniltrimetoxisilan PhTMOS 99% (Fluka), tetraetoxisilan (TEOS) 98% (Fluka), metiltriethoxisilan MeTEOS 99% (Aldrich), etiltriethoxisilan EtTEOS 96% (Aldrich), feniltriethoxisilan PhTEOS 98% (Aldrich), alcool etilic absolut 99,2% (Chimopar), alcool izopropilic 99,7% (Chimopar), acid clorhidric 1M (Chimopar), polietilenglicol (PEG M=20000 de la Fluka), florură de sodiu (Fluka), amoniac soluție 25% (Chimopar), 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 200 108/02/5 (Purolite), Celuloză AVICEL PH-101 (Aldrich), n-hexan 98% (Merck).

Lichide ionice: [Emim]BF₄ (Merck), [Bmim]BF₄ (Merck), [Hmim]BF₄ (Merck), [Omim]BF₄ (Fluka), [Bmim]PF₆ (Merck), [Emim]OOCF₃ (Merck), [Pmim]BF₄, [Omim]PF₆, [Bmim]Tf₂N și [Emim]OOCCH₃ au fost obținute de la Universitatea din Bremen.

Enzimele folosite au fost: lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (AK "AMANO" 20) și *Burkholderia cepacia* (PS "AMANO" SD) de la Amano Enzyme Inc. (Japonia), iar lipaza din pancreas de porc (PPL) a provenit de la Sigma Chemical Co.(USA).

3.1.1. Imobilizarea prin adsorbție

Metoda 1.

150 mg lipază a fost ampastată cu 3 ml tampon TRIS-HCl de pH=8.0 și adăugată sub agitare peste 1 g suport solid (Celite 545, Celite 521, Celite C22, CaCO₃, Purolite MN 200 108/02/5, Celuloză microcristalină AVICEL PH-101). S-a mai adăugat 1 ml tampon TRIS-HCl de pH=8.0 și s-a continuat agitarea încă aproximativ 1 oră când s-a adăugat în picături și sub agitare cu bagheta 20 ml acetonă la -15°C. Amestecul s-a filtrat pe frită și s-a mai spalat cu 20 ml acetonă la -15°C. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei timp de câteva zile.

Prin această metodă de imobilizare s-au obținut 6 preparate enzimatică cu PPL și unul cu lipază Amano AK.

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

Nr. crt.	Cod preparat	Suportul solid	Cantitate de preparat obținut (mg)
1.	PPL ₁	Celite 545	1028,4
2.	PPL ₂	Celite 521	1043,3
3.	PPL ₃	Celite C22	1057,4
4.	PPL ₄	CaCO ₃	982,8
5.	PPL ₅	Purolite MN 200	452,4
6.	PPL ₆	Celuloză AVICEL	1073,1
7.	AK ₁	Celite 545	1479,3

3.1.2. Imobilizarea prin entrapare în sol-gel

Metoda 2.

S-a preparat o soluție de lipază (100 mg/ ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0), soluția rezultată a fost centrifugată, iar supernatantul a fost folosit pentru imobilizare.

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 780 μl supernatant de lipază, 200 μl soluție PEG 4% cu M=20000 sau lichid ionic, 100 μl soluție florură de sodiu 1 M și 200 μl alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menținut 5 minute pe agitatorul magnetic pentru omogenizare, după care s-au introdus precursorii silanici (6 mmoli) la diferite rapoarte molare cu menținerea agitării până la gelifiere (în unele cazuri s-a folosit baia de gheață).

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 timp de câteva zile.

Prin această metodă de imobilizare s-au obținut 41 preparate enzimaticice cu lipază Amano AK și 12 cu lipază Amano PS.

Tabelul 3.2. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu lipază Amno AK obținute prin Metoda 2.

Nr. crt.	Cod preparat	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
1.	AK ₂	78	TMOS	NaF, PEG	214,5
2.	AK ₃	78	MeTMOS:TMOS=1:1	NaF, PEG	428,9
3.	AK ₄	78	MeTMOS:TMOS=2:1	NaF, PEG	423,1
4.	AK ₅	78	PrTMOS:TMOS=1:1	NaF, PEG	366,3
5.	AK ₆	78	PrTMOS:TMOS=2:1	NaF, PEG	301,2
6.	AK ₇	78	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, PEG	375,6
7.	AK ₈	78	OcTMOS:TMOS=2:1	NaF, PEG	299,1
8.	AK ₉	78	PhTMOS:TMOS=1:1	NaF, PEG	507,6
9.	AK ₁₀	78	PhTMOS:TMOS=1:1	NaF, PEG	550,1

Partea experimentală

10.	AK ₁₁	78	MeTMOS:TMOS=1:1 (cu răcire)	NaF, PEG	416,8
11.	AK ₁₂	78	TMOS:MeTMOS=1:1	NaF, PEG	396,6
12.	AK ₁₃	78	TMOS:MeTMOS=1:1 (cu răcire)	NaF, PEG	398,6
13.	AK ₁₄	39	MeTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Bmim]BF ₄	201,9
14.	AK ₁₅	39	MeTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Omim]BF ₄	210,0
15.	AK ₁₆	39	MeTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Bmim]PF ₆	222,5
16.	AK ₁₇	78	PrTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Bmim]BF ₄	450,0
17.	AK ₁₈	78	PrTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Omim]BF ₄	430,3
18.	AK ₁₉	78	PrTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Bmim]PF ₆	410,0
19.	AK ₂₀	78	PrTMOS:TMOS=2:1	NaF, [Bmim]BF ₄	416,7
20.	AK ₂₁	78	PrTMOS:TMOS=2:1	NaF, [Omim]BF ₄	436,5
21.	AK ₂₂	78	PrTMOS:TMOS=2:1	NaF, [Bmim]PF ₆	387,3
22.	AK ₂₃	78	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Bmim]BF ₄	603,2
23.	AK ₂₄	78	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Omim]BF ₄	773,3
24.	AK ₂₅	78	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Bmim]PF ₆	336,1
25.	AK ₂₆	78	OcTMOS:TMOS=2:1	NaF, [Bmim]BF ₄	390,1
26.	AK ₂₇	78	OcTMOS:TMOS=2:1	NaF, [Omim]BF ₄	310,0
27.	AK ₂₈	78	OcTMOS:TMOS=2:1	NaF, [Bmim]PF ₆	171,1
28.	AK ₂₉	78	PhTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Bmim]BF ₄	232,4
29.	AK ₃₀	78	PhTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Omim]BF ₄	568,7
30.	AK ₃₁	78	PhTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Bmim]PF ₆	253,6
31.	AK ₃₂	78	PhTMOS:TMOS=2:1	NaF, [Bmim]BF ₄	535,0
32.	AK ₃₃	78	PhTMOS:TMOS=2:1	NaF, [Omim]BF ₄	622,0
33.	AK ₃₄	78	PhTMOS:TMOS=2:1	NaF, [Bmim]PF ₆	615,1
34.	AK ₃₅	78	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Emim]BF ₄	541,2
35.	AK ₃₆	78	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Pmim]BF ₄	488,0
36.	AK ₃₇	78	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Hmim]BF ₄	613,2
37.	AK ₃₈	78	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Omim]PF ₆	556,3
38.	AK ₃₉	78	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Bmim]Tf ₂ N	588,6
39.	AK ₄₀	78	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Emim]OOCCH ₃	606,7
40.	AK ₄₁	78	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, [Emim]OOCF ₃	523,1
41.	AK ₄₂	78	PhTEOS:TEOS=1:1	NaF, PEG	309,0

Tabelul 3.3. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu lipază Amano PS obținute prin Metoda 2.

Nr. crt.	Cod preparat	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
1.	PS ₁	78	TMOS	NaF, PEG	452,8
2.	PS ₂	78	MeTMOS:TMOS=1:1	NaF, PEG	839,8
3.	PS ₃	78	MeTMOS:TMOS=2:1	NaF, PEG	876,5
4.	PS ₄	78	PrTMOS:TMOS=1:1	NaF, PEG	821,4
5.	PS ₅	78	PrTMOS:TMOS=2:1	NaF, PEG	636,6
6.	PS ₆	78	OcTMOS:TMOS=1:1	NaF, PEG	754,4
7.	PS ₇	78	OcTMOS:TMOS=2:1	NaF, PEG	518,4

Partea experimentală

8.	PS ₈	78	PhTMOS:TMOS=1:1	NaF, PEG	1038,0
9.	PS ₉	78	PhTMOS:TMOS=1:1	NaF, PEG	974,6
10.	PS ₁₀	78	MeTMOS:TMOS=1:1 (cu răcire)	NaF, PEG	438,6
11.	PS ₁₁	78	TMOS:MeTMOS=1:1 (cu răcire)	NaF, PEG	392,0
12.	PS ₁₂	78	TMOS:MeTMOS=1:2 (cu răcire)	NaF, PEG	414,6

Metoda 3.

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-a preparat un SOL prepolimer prin amestecarea timp de 15 minute pe un agitator magnetic a 6 mmoli precursori silanici la diferite rapoarte molare și a 0,5 ml alcool etilic.

În altă fiolă s-au introdus o soluție de lipază obținută prin ampastarea a 75 mg lipază cu 1,1 ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0 și aditivul 200 μl PEG 20000 (4%) sau lichid ionic. Amestecul rezultat s-a menținut 15 minute pe agitatorul magnetic pentru omogenizare.

Compoziția celor 2 fiole de sticlă s-a amestecat și s-a menținut agitarea 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 câteva zile.

Prin această metodă de imobilizare s-au obținut 8 preparate enzimatică cu lipază Amano AK și unul cu lipază Amano PS.

Tabelul 3.4. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu lipază Amano AK și a celui cu lipază Amano PS obținute prin Metoda 3.

Nr. crt.	Cod preparat	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
1.	AK ₄₃	75	MeTMOS:TMOS=1:1	PEG	327,0
2.	AK ₄₄	75	MeTMOS:TMOS=2:1	PEG	266,7
3.	AK ₄₅	75	MeTMOS:TMOS=1:1	[Bmim]BF ₄	396,0
4.	AK ₄₆	75	MeTMOS:TMOS=1:1	[Omim]BF ₄	344,5
5.	AK ₄₇	75	MeTMOS:TMOS=1:1	[Bmim]PF ₆	399,1
6.	AK ₄₈	75	MeTMOS:TMOS=2:1	[Bmim]BF ₄	381,0
7.	AK ₄₉	75	MeTMOS:TMOS=2:1	[Omim]BF ₄	249,0
8.	AK ₅₀	75	MeTMOS:TMOS=2:1	[Bmim]PF ₆	170,4
9.	PS ₁₃	75	MeTMOS:TMOS=1:1	PEG	358,3

Metoda 4.

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 6 mmoli precursori silanici la diferite rapoarte molare, 0,2 ml apă distilată, 0,5 ml alcool etilic și a 11 μ l acid clorhidric 0,04 M.

SOL-ul apos obținut s-a trecut într-o fiolă de sticlă de 8 ml peste care s-a mai introdus sub agitare o soluție de lipază obținută prin ampastarea a 75 mg lipază cu 1,1 ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0 și 50 μ l soluție de florură de sodiu 1M, continuând agitarea 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 câteva zile

Prin această metodă de imobilizare s-au obținut un preparat enzimatic cu lipază Amano AK și unul cu lipază Amano PS.

Tabelul 3.5. Condiții de imobilizare a preparatului cu lipază Amano AK și a celui cu lipază Amano PS obținute prin Metoda 4.

Nr. crt.	Cod preparat	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
1.	AK ₅₁	75	MeTMOS:TMOS=1:1	NaF, EtOH	422,4
2.	PS ₁₄	75	MeTMOS:TMOS=1:1	NaF, EtOH	369,6

Metoda 5.

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-a preparat un SOL prepolimer prin amestecarea timp de două ore pe un agitator magnetic a 6 mmoli precursori silanici la diferite rapoarte molare, 0,5 ml apă distilată, 50 μ l acid clorhidric 0,1 M și a 200 μ l lichid ionic.

În altă fiolă s-a introdus o soluție de lipază obținută prin ampastarea a 75 mg lipază cu 1,1 ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0 și s-a menținut 15 minute pe agitatorul magnetic pentru omogenizare.

Compoziția celor 2 fiole de sticlă s-a amestecat și s-a menținut agitarea 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 15 ml n-hexan, după care s-a filtrat pe frită. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei timp de câteva zile.

Prin această metodă de imobilizare s-au obținut 2 preparate enzimatice cu lipază Amano AK.

Tabelul 3.6. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu lipază Amano AK obținute prin Metoda 5.

Nr. crt.	Cod preparat	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
1.	AK ₅₂	75	MeTMOS:TMOS=1:1	[Omim]BF ₄	738,9
2.	AK ₅₃	75	MeTMOS:TMOS=1:1	[Bmim]BF ₄	727,2

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

Metoda 6.

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, 0,5 ml alcool etilic (sau fără) și a 11 μl acid clorhidric 0,04 M.

SOL-ul apos obținut s-a trecut într-o fiolă de sticlă de 8 ml peste care s-a mai introdus sub agitare o soluție de lipază obținută prin amestecarea a 75 mg lipază cu 1,1 ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0 și 200 μl soluție de florură de sodiu 1M sau 100 μl soluție de amoniac 25% (sau fără). Agitarea s-a menținut până când amestecul a gelificat moment în care s-a adăugat 0,5 g suport solid. Gelul obținut a fost păstrat la temperatura camerei (sau în frigider) 24 de ore pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost spălat cu 7 ml tampon TRIS-HCl de pH=8.0, 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 câteva zile.

Prin această metodă de imobilizare s-au obținut 23 preparate enzimaticice cu PPL și 9 cu lipază Amano AK.

Tabelul 3.7. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu PPL obținute prin Metoda 6.

Nr. crt.	Cod preparat	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Suport solid	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
1.	PPL ₇	150	MeTEOS:TEOS=1:1	Celite 545 (1000mg)	NH ₃ , -	1290,1
2.	PPL ₈	150	PhTEOS:TEOS=1:1		NaF, EtOH	1713,3
3.	PPL ₉	150	PhTEOS:TEOS=1:1		NH ₃ , EtOH	1557,9
4.	PPL ₁₀	150	PhTEOS:TEOS=1:1		NH ₃ , -	1123,5
5.	PPL ₁₁	75	MeTEOS:TEOS=1:1	Celite 521 (500mg)	NaF, EtOH	693,9
6.	PPL ₁₂	75	MeTEOS:TEOS=1:1		NH ₃ , EtOH	649,9
7.	PPL ₁₃	75	MeTEOS:TEOS=1:1		NH ₃ , -	680,0
8.	PPL ₁₄	75	PhTEOS:TEOS=1:1		NaF, EtOH	747,3
9.	PPL ₁₅	75	PhTEOS:TEOS=1:1		NaF, -	660,3
10.	PPL ₁₆	75	PhTEOS:TEOS=1:1		NH ₃ , EtOH	667,5

Partea experimentală

11.	PPL ₁₇	75	PhTEOS:TEOS=1:1		NH ₃ , -	1002,0
12.	PPL ₁₈	75	MeTEOS:TEOS=1:1	CeliteC22 (500mg)	NaF, -	723,1
13.	PPL ₁₉	75	MeTEOS:TEOS=1:1		NH ₃ , -	680,1
14.	PPL ₂₀	75	MeTEOS:TEOS=1:1	CaCO ₃ (500mg)	NaF, -	664,7
15.	PPL ₂₁	75	MeTEOS:TEOS=1:1		NH ₃ , -	599,3
16.	PPL ₂₂	75	MeTEOS:TEOS=1:1	Purolite MN 200 (500mg)	NaF, -	413,5
17.	PPL ₂₃	75	MeTEOS:TEOS=1:1		NH ₃ , -	422,3
18.	PPL ₂₄	75	MeTEOS:TEOS=1:1	AVICEL (500mg)	NaF, -	748,6
19.	PPL ₂₅	75	MeTEOS:TEOS=1:1		NH ₃ , -	714,3
20.	PPL ₂₆	75	*MeTEOS:TEOS=1:1	CeliteC22 (500mg)	NaF, -	749,3
21.	PPL ₂₇	75	*MeTEOS:TEOS=1:1		NH ₃ , -	683,1
22.	PPL ₂₈	75	*MeTEOS:TEOS=1:1	CaCO ₃ (500mg)	NaF, -	604,1
23.	PPL ₂₉	75	*MeTEOS:TEOS=1:1		NH ₃ , -	589,2

* maturare gel la 5 °C

Tabelul 3.8. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu lipază Amano AK obținute prin Metoda 6.

Nr. crt.	Cod preparat	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Suport solid	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
1.	AK ₅₄	75	MeTMOS:TMOS=1:1	Celite 545 (500mg)	-, EtOH	715,5
2.	AK ₅₅	75	PrTMOS:TMOS=1:1		-, EtOH	713,9
3.	AK ₅₆	75	OcTMOS:TMOS=1:1		-, EtOH	780,1
4.	AK ₅₇	75	PhTMOS:TMOS=1:1		-, EtOH	678,7
5.	AK ₅₈	75	MeTEOS:TEOS=1:1		-, EtOH	620,4
6.	AK ₅₉	75	MeTEOS:TEOS=2:1		-, EtOH	627,4
7.	AK ₆₀	75	MeTEOS:TEOS=4:1		-, EtOH	622,4
8.	AK ₆₁	75	EtTEOS:TEOS=1:1		-, EtOH	756,2
9.	AK ₆₂	75	PhTEOS:TEOS=1:1		-, EtOH	797,2

Metoda 7.

S-a preparat o soluție de lipază AK 100 mg/ ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0, soluția rezultată a fost centrifugată, iar supenatantul a fost folosit pentru imobilizare.

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 780 μl supenatant de lipază, 200 μl lichid ionic, 100 μl soluție florură de sodiu 1 M și 200 μl alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menținut 5 minute pe agitatorul magnetic pentru omogenizare, după care s-au introdus precursorii silanici (6 mmoli) la diferite rapoarte molare, continuând agitarea până la gelifiere, moment în care s-a introdus 0,5 g suport solid.

Gelul obținut a fost păstrat în frigider timp de 24 de ore, pentru o polimerizare completă. 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 G₂. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei timp de câteva zile.

Prin această metodă de imobilizare s-au obținut 3 preparate enzimatiche cu lipază Amano AK.

Tabelul 3.9. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu lipază Amano AK obținute prin Metoda 7.

Nr. crt.	Cod preparat	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Suport solid	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
1.	AK ₆₃	78	PrTMOS:TMOS=1:1	Celite 545 (500mg)	NaF, [Omim]BF ₄	1181,7
2.	AK ₆₄	78	OcTMOS:TMOS=1:1		NaF, [Omim]BF ₄	1300,3
3.	AK ₆₅	78	PhTMOS:TMOS=1:1		NaF, [Omim]BF ₄	986,3

Metoda 8.

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-a preparat un SOL prepolimer prin amestecarea timp de 15 minute pe un agitator magnetic a 6 mmoli precursori silanici la diferite rapoarte molare și a 0,5 ml alcool etilic.

În altă fiolă s-au introdus o soluție de lipază obținută prin ampastarea a 75 mg lipază cu 1,1 ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0 și 200 μl lichid ionic. Amestecul rezultat s-a menținut 15 minute pe agitatorul magnetic pentru omogenizare.

Compoziția celor 2 fiole de sticlă s-a amestecat, peste aceasta s-a adăugat 100 μl soluție florură de sodiu 1 M și s-a menținut agitarea până la gelifiere, moment în care s-a introdus 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 câteva zile.

Prin această metodă de imobilizare s-au obținut 5 preparate enzimaticice cu lipază Amano AK.

Tabelul 3.10. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu lipază Amano AK obținute prin Metoda 8.

Nr. crt.	Cod preparat	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Suport solid	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
1.	AK ₆₆	75	MeTMOS:TMOS=1:1	Celite 545 (500mg)	[Omim]BF ₄	1249,5
2.	AK ₆₇	75	MeTMOS:TMOS=2:1		[Omim]BF ₄	1335,0
3.	AK ₆₈	75	MeTMOS:TMOS=3:1		[Omim]BF ₄	1319,4
4.	AK ₆₉	75	MeTMOS:TMOS=4:1		[Omim]BF ₄	1312,1
5.	AK ₇₀	75	MeTMOS:TMOS=5:1		[Omim]BF ₄	1372,6

3.1.4. Imobilizarea prin adsorbție urmată de entrapare în sol-gel

Metoda 9.

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 11 μ l acid clorhidric 0,04 M.

SOL-ul apos obținut s-a trecut într-o fiolă de sticlă de 8 ml peste care s-a mai introdus sub agitare 1,1 ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0 și 200 μ l soluție de florură de sodiu 1M sau 100 μ l soluție de amoniac 25%. Agitarea s-a menținut până când amestecul a gelificat moment în care s-a adăugat 0,5 g lipază imobilizată prin adsorbție pe suport solid. Gelul obținut a fost păstrat la temperatura camerei 24 de ore pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost spălat cu 15 ml n-hexan după care s-a filtrat pe frită. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei timp de câteva zile.

Prin această metodă de imobilizare s-au obținut 5 preparate enzimactice cu PPL.

Tabelul 3.11. Condiții de imobilizare ale preparatelor cu PPL obținute prin Metoda 9.

Nr. crt.	Cod preparat	Cantitate de lipază introdusă la imob. (mg)	Silani precursori	Suport solid	Catalizator, Aditiv	Cantitate de preparat obținut (mg)
1.	PPL ₃₀	65,22	MeTEOS:TEOS=1:1	Celite 521	NH ₃ , -	654,9
2.	PPL ₃₁	65,22	MeTEOS:TEOS=1:1	Celite C22	NaF, -	674,6
3.	PPL ₃₂	65,22	MeTEOS:TEOS=1:1		NH ₃ , -	699,9
4.	PPL ₃₃	65,22	MeTEOS:TEOS=1:1	CaCO ₃	NH ₃ , -	630,3
5.	PPL ₃₄	65,22	MeTEOS:TEOS=1:1		NaF, -	524,3

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 căreia 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 (manual sau prin integrare automată)
- 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 această lucrare, 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.

Determinările cromatografice au fost efectuate pe un cromatograf de gaze DANI GC 86.10 echipat cu detector cu ionizare în flacără și coloană capilară chirală cu dimensiunile 25 m x 0,32 mm cu fază staționară CYDEX-B de grosime 0,25 μm (SGE, Australia).

Condiții de analiză pentru probe:

- temperatură injector: 240°C
- temperatură detector: 280°C
- gaz purtător: heliu cu debitul 0,815 ml/min sau 1,13 ml/min
- program de temperatură: diferit pentru fiecare compus etalon

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 3.12 se pot observa parametrii dreptelor de etalonare pentru compușii studiați.

Tabelul 3.12. Parametrii dreptelor de etalonare

Nr.crt.	Compus etalon	Standard intern	a	b
1.	2-butanol	Decan	- 0,1772	0,8783
2.	2-pentanol	Decan	-0,1198	0,7768
3.	2-hexanol	Dodecan	-0,0013	0,8535
4.	2-heptanol	Decan	0,0049	0,7777
5.	2-octanol	Decan	0,0031	0,7383
6.	2-nonanol	Decan	-0,0189	0,8134
7.	Acetat de butil	Decan	- 0,0893	0,6319
8.	Acetat de pentil	Decan	- 0,0010	0,5877
9.	Acetat de octil	Decan	0,0139	0,5671
10	Laurat de octil	Hexadecan	-0,1298	0,6835

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 Lowry de determinare a proteinelor

Principiul metodei

Dozarea proteinelor (domeniu 25-500 μg) se bazează pe formarea unui complex cupric în urma reacției proteinei cu un reactiv alcalin de cupru (reacția biuretului) și pe reducerea fosfomolibdaților și fosfowolframaților din reactivul Folin-Ciocalteu de către compușii fenolici din proteină (în special tirozina).

Etalonarea soluției de BSA prin metoda Lowry.

Reactivi și soluții

- *Reactiv Folin-Ciocalteu.* Înainte de întrebuințare se diluează o parte reactiv și două părți apă distilată;
- *Soluție alcalină A.* Se dizolvă 4 g NaOH, 10 g Na_2CO_3 și 0,2 g tartrat dublu de sodiu și potasiu în apă distilată și se aduce la 1000 ml în balon cotat;
- *Soluție B.* Soluție CuSO_4 0,5%;
- *Reactiv alcalin de cupru.* Se prepară înainte de folosire amestecând 50 ml soluție alcalină A cu 1 ml soluție B,
- *Soluție etalon de albumină serică de bovină (BSA)* în apă distilată (1 mg/ml).

Mod de lucru

S-au luat cote parte din soluția etalon de BSA și s-au introdus în 10 eprubete completând cu apă distilată la 0,2 ml. S-a adăugat în ordine 5 ml reactiv alcalin de cupru și 0,5 ml reactiv Folin-Ciocalteu. Probele astfel obținute s-au lăsat la temperatura camerei 30 minute, apoi s-a citit extincția la lungimea de undă de 660 nm față de un martor obținut în aceleași condiții, dar cu înlocuirea soluției de BSA cu apă distilată. Pentru siguranța determinării s-au făcut două probe în paralel. Rezultatele s-au trecut în tabelul de mai jos.

Tabelul 3.13. Etalonarea soluției de BSA prin metoda Lowry.

Nr. crt.	Soluția de BSA (ml)	Apă distilată (ml)	Extincție	Cantitate proteină (mg)
1(martor)	-	0,20	-	0,00
2.	0,02	0,18	0,0496	0,02
3.	0,04	0,16	0,0957	0,04
4.	0,06	0,14	0,1442	0,06
5.	0,08	0,12	0,2022	0,08
6.	0,10	0,10	0,2538	0,10
7.	0,12	0,08	0,2838	0,12
8.	0,14	0,06	0,3342	0,14
9.	0,16	0,04	0,3562	0,16
10.	0,18	0,02	0,4349	0,18
11.	0,20	-	0,4169	0,20

S-a făcut reprezentarea grafică a extincției în funcție de cantitatea de proteină. Această reprezentare este de forma unei drepte cu ecuația:

$$E = b \cdot C_p$$

unde:

E = extincție

b = panta dreptei

C_p = cantitate de proteină, (mg)

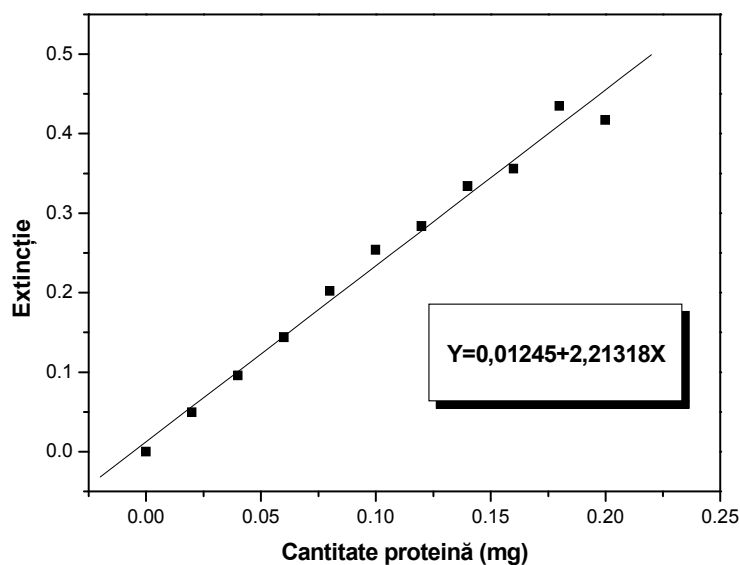


Figura 3.1. Caracteristica de etalonare a soluției de BSA prin metoda Lowry

Determinarea conținutului în proteine dintr-o probă necunoscută

Mod de lucru

Într-o eprubetă s-au introdus 0,1-0,5 ml probă, apă distilată (aceleși volum ca cel de probă), 5 ml reactiv alcalin de cupru și 0,5 ml reactiv Folin-Ciocalteu. S-a lasat la temperatura camerei 30 minute, apoi s-a citit extincția la 660 nm față de un martor obținut în aceleași condiții, dar cu înlocuirea probei cu apă distilată. Pentru siguranța determinării s-au făcut două probe în paralel. Rezultatele s-au trecut în tabelul de mai jos.

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

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

unde:

d = diluția probei la 1 ml

Cantitatea totală de proteine din filtrat s-a obținut prin produsul dintre concentrația de proteină și volumul de filtrat obținut.

Randamentul de imobilizare s-a calculat prin raportarea cantității de proteină imobilizată la cea inițială. Cantitatea de proteină inițială supusă imobilizării din 0,78 ml soluție de lipază Amano AK (100 mg/ml) a fost de 19,3 mg.

$$\eta_{\text{imobilizare}} (\%) = \frac{\text{cantitate proteină inițială} - \text{cantitate totală proteine}}{\text{cantitate proteină inițială}} \cdot 100$$

Determinările în UV-VIS s-au efectuat cu ajutorul unui spectrofotometru Specord M-40 (Carl Zeiss Jena, Germania).

3.2.3. Microscopie electronică de scanare (SEM) cuplată cu spectrometrie de raze X cu dispersie de energie (EDX)

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 și spectrele EDX au fost înregistrate folosind tehnica microscopiei electronice de scanare (SEM) cuplată cu spectrometrie de raze X cu dispersie de energie (EDX), 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 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 > 2μA

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.

Mod de lucru – analiză semi-cantitativă prin spectrometrie de raze X cu dispersie de energie (EDX)

Pentru obținerea spectrului EDX s-a folosit un spectrometru fotoelectronic cu dispersie. Această tehnică constă în iradierea probei aflate într-un spațiu cu vid ultraînalt cu radiații X, iar fotoelectronii emiși sunt separați în funcție de energiile lor cinetice într-un spectrometru fotoelectronic. Identificarea elementelor se face în funcție de valorile nivelelor energetice ale fotoelectronilor emiși. După identificarea elementelor în spectrul EDX s-a realizat și o cuantificare a acestora, obținându-se astfel date de compoziție semicantitativă.

3.2.4. Spectroscopie de IR

Spetrele IR s-au înregistrat pe un spectrofotometru FT-IR Prestige21 (Shimadzu, Japonia), pe domeniul de lungime de undă $4000-400 \text{ cm}^{-1}$, utilizând metoda reflexiei difuze (ATR - attenuated total reflectance).

Elementele componente ale spectrofotometrului IRPrestige21 sunt:

Sursa: tuburi ceramice

Interferometru: interferometru Michaelson

Detector: DLATGS echipat cu control al temperaturii

Domeniu de lungime de undă: $7800-350 \text{ cm}^{-1}$

Rezoluție: $0,5 - 16 \text{ cm}^{-1}$

Raport semnal/zgomot = 40000:1

Mod de lucru

Utilizând metoda reflexiei difuze, la probele solide nu mai este necesară obținerea de pastile de KBr. Astfel un vârf de spatulă din proba de analizat s-a mojarat cu aproximativ 100 mg KBr, s-a introdus într-o cupă pentru probă și apoi aceasta a fost plasată în compartimentul de probă în vederea obținerii spectrului.

3.3. Rețete de lucru

Deoarece scopul principal al obținerii unor preparate cu lipaze immobilizate prin diverse metode este utilizarea acestora ca biocatalizatori în diverse procese de sinteză, acestea au fost testate în reacții de esterificare și transesterificare în mediu de solvenți organici sau de lichid ionic.

3.3.1. Reacții de esterificare

Determinarea activității de esterificare a lipazei din pancreas de porc PPL immobilizată prin diverse metode s-a realizat pentru reacția de esterificare a 1-octanolului cu acidul lauric în n-hexan la 40°C.

Materiale și aparatură

În reacțiile de esterificare s-au folosit: 1-octanol 95% (Fluka), acid lauric (Fluka), n-hexan 98% (Merck), n-hexadecan 99% (Merck), agitator orbital MIR S-100 Sanyo E&E (Japonia) și incubator POL EKO-CLN 115 STD.

Catalizator: lipaza din pancreas de porc PPL (Sigma Chemical Co.USA) nativă și immobilizată.

Determinările cromatografice pentru probele din reacțiile de esterificare au fost efectuate pe un cromatograf de gaze DANI GC 86.10 echipat cu detector cu ionizare în flacără și coloană capilară cu dimensiunile 15 m x 0,32 mm cu fază staționară BPX - 5 chimic legată, de grosime 1 μm (SGE, Australia).

Condiții de analiză pentru probe:

- temperatură injector: 300°C
- temperatură detector: 350°C
- gaz purtător: azot cu debitul 1,47 ml/min
- program de temperatură: 100-300°C cu viteza de încălzire de 20°C/min.

Mod de lucru

Într-o fiolă de sticlă de 4 ml s-au introdus 0,2 mmoli acid lauric, 0,4 mmoli 1-octanol, 2 ml n-hexan (solvent) și 30 μl hexadecan (standard intern). La momentul zero al reacției s-a introdus 50 mg preparat enzimatic. 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 cu ajutorul unei micropipete, care s-au diluat cu solvent după caz. Pe baza analizelor efectuate, prin metoda standardului intern s-a calculat masa de ester, randamentul de ester și activitatea preparatelor immobilizate la 24 de ore de reacție. Pentru calculul randamentelor de regăsire ale activității enzimatice după imobilizare, s-a efectuat o sinteză în aceleași condiții, în care s-a utilizat 10 mg lipază nativă.

$$\text{Activitate} = \frac{\mu\text{moli ester format}}{24 \cdot m} \text{ (U/mg)}$$

unde:

m = cantitatea de preparat enzimatic introdus în reacție

Randamentul de regăsire al activității enzimatice după imobilizare s-a calculat, prin raportarea activității totale a enzimei imobilizate (egală cu produsul dintre activitatea de esterificare a enzimei și cantitatea de preparat obținut după imobilizare) la activitatea totală a enzimei native (egală cu produsul dintre activitatea de esterificare a enzimei native și cantitatea de enzimă supusă imobilizării).

$$\text{Randament de regăsire (\%)} = \frac{\text{Activitate totală enzimă imobilizată}}{\text{Activitate totală enzimă nativă}} \cdot 100$$

3.3.2. 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), metil-*tert*-butil-eter 99,2% (Rompetrol), 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), [Pmim]BF₄, [Omim]PF₆, [Bmim]Tf₂N, [Emim]COOCH₃ și [Emim]OcSO₄ au fost obținute de la Universitatea din Bremen, 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 (Amano Enzyme Inc.), *Candida antarctica* B Novozyme 435 (Novo) și din *Candida cylindracea* (Aldrich).

Determinările cromatografice pentru probele din reacțiile de transesterificare au fost efectuate pe un cromatograf de gaze DANI GC 86.10 echipat cu detector cu ionizare în flacără și coloană capilară chirală cu dimensiunile 25 m x 0,32 mm cu fază staționară CYDEX-B de grosime 0,25 μm (SGE, Australia).

Condiții de analiză pentru probe:

- temperatură injector: 240°C
- temperatură detector: 280°C
- gaz purtător: heliu cu debitul 0,815 ml/min sau 1,13 ml/min
- 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 (50 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. 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 enzimatice la 24 de ore de reacție. Pentru calculul randamentelor de regăsire ale activității enzimatice după imobilizare, s-a efectuat o sinteză în aceleași condiții, în care s-a utilizat 5 mg lipază nativă.

Pe baza datelor din literatură (Bornscheuer și Kazlauskas, 1999; Paizs și colab., 2003), s-a presupus că lipazele Amano AK și Amano PS 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.

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

Raportul enantiomeric (E) a fost calculat în conformitate cu (Chen și colab., 1987), folosind relația:

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

unde

e.e.p = excesul enantiomeric al produsului

c = conversia alcoolului

3.3.2.1. Reutilizarea preparatelor enzimatice în reacții de transesterificare în mediu organic

Materiale și aparatură

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

Catalizator: lipaza din *Pseudomonas fluorescens* Amano AK (Amano Enzyme Inc.) nativă sau imobilizată prin diverse metode.

Mod de lucru

Într-o fiolă de sticlă de 8 ml s-au introdus 1,5 mmoli alcool secundar (2-hexanol), 4,5 mmoli acetat de vinil, 3 ml n-hexan și 45 μ l n-dodecan (standard intern). La momentul zero al reacției s-a introdus 15 mg lipază Amano AK nativă, 75 mg preparat enzimatic obținut prin entrapare în sol-gel sau 150 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 preparatul enzimatic a fost recuperat prin spălare cu 15 ml n-hexan, filtrare pe frită și uscare la temperatura camerei. Deoarece nu a fost posibilă recuperarea întregii cantități de preparat enzimatic, s-a recalculat rețeta de lucru în funcție de cantitatea de preparat recuperat astfel încât raportul molar între reactanți să rămână același.

Pe baza analizelor 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).

3.3.2.2. Reutilizarea preparatelor enzimatice în reacții de transesterificare în mediu de lichid ionic

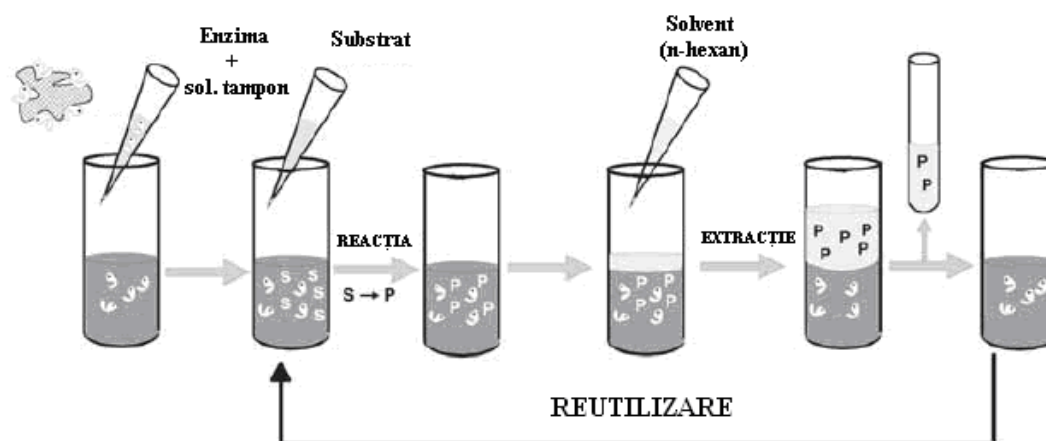
Materiale și aparatură

S-au folosit: 2-hexanol 98% (Fluka), acetat de vinil (Fluka), [Omim]BF₄ (Fluka), [Bmim]PF₆ (Merck), n-hexan 98% (Merk), n-dodecan (Merck), agitator orbital MIR S-100 Sanyo E&E (Japonia) și incubator POL EKO-CLN 115 STD.

Catalizator: lipaza din *Pseudomonas fluorescens* Amano AK (Amano Enzyme Inc.) nativă sau imobilizată prin diverse metode.

Mod de lucru

Într-o fiolă de sticlă de 8 ml s-au introdus 1,5 mmoli alcool secundar (2-hexanol), 4,5 mmoli acetat de vinil, 3 ml lichid ionic (mediu de reacție) și 45 μ l n-dodecan (standard intern). La momentul zero al reacției s-a introdus 15 mg lipază Amano AK nativă, 75 mg preparat enzimatic obținut prin entrapare în sol-gel sau 150 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 introdus 1 ml n-hexan pentru a realiza extracția produsului din mediul de reacție.



Schema 3.1.

După prelevarea probei din stratul superior, acesta a fost îndepărtat cu ajutorul unei micropipete. În fiola de reacție a rămas doar stratul de lichid ionic împreună cu preparatul enzimatic sau lipaza nativă, ce fost introdus pentru 30 min într-o etuvă de vid, pentru îndepărtarea totală a hexanului. Peste stratul rămas în fiola de reacție s-a introdus 1,5 mmoli alcool secundar (2-hexanol), 4,5 mmoli acetat de vinil și 45 μ l n-dodecan (standard intern), amestecul rezultat a fost reintrodus într-un nou ciclu de reacție (Schema 3.1)

Pe baza analizelor 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).

4. CONCLUZII FINALE

În prima parte a tezei este prezentat un studiu de literatură cu privire la structura și proprietățile catalitice ale lipazelor, imobilizarea acestora prin entrapare în sol-gel, influența parametrilor de imobilizare asupra performanțelor catalitice, modalitățile de îmbunătățire a proprietăților lipazelor entrapate, precum și utilizarea preparatelor imobilizate în reacții biocatalitice în medii organice sau de lichide ionice. Acest studiu, adus tot timpul la zi în perioada realizării tezei, a reprezentat fundamentul științific pentru obiectivele care au fost urmărite în partea de cercetări experimentale.

Studiile realizate în cadrul contribuțiilor originale au avut următoarele obiective:

- Elaborarea de noi metode de imobilizare prin entraparea în sol-gel a lipazelor din pancreas de porc PPL, *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) și *Burkholderia cepacia* (Amano PS)
- Optimizarea parametrilor de imobilizare pentru obținerea de biocatalizatori cu eficiență catalitică îmbunătățită
- Imobilizarea prin entrapare combinată cu adsorbție și evaluarea comparativă a metodelor de imobilizare
- Studiul capacității catalitice a preparatelor imobilizate în reacții de esterificare și acilare enantioselective
- Studiul influenței lichidelor ionice ca aditivi în timpul procesului de imobilizare prin metoda sol-gel
- Studiul proceselor de transesterificare enantioselectivă în lichide ionice, comparativ cu medii organice
- Studiul influenței temperaturii asupra performanțelor catalitice a lipazelor imobilizate prin metoda sol-gel
- Reutilizarea preparatelor enzimatiche imobilizate în mediu organic sau de lichid ionic
- Caracterizarea preparatelor obținute la imobilizarea prin entrapare în so-gel și prin metoda combinată folosind metode instrumentale de analiză structurală.

Au fost realizate 8 noi metode de imobilizare a lipazelor prin: entrapare în sol-gel, entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție și adsorbție urmată de entrapare în sol-gel, iar prin utilizarea acestora s-au obținut 111 preparate enzimatiche a căror activitate biocatalitică a fost evaluată în diferite condiții de substrat, mediu de reacție și temperatură. Din studiile experimentale, efectuate în conformitate cu obiectivele stabilite, au rezultat următoarele concluzii:

Reacții de esterificare catalizate de lipaza pancreatică imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție

Lipaza din pancreas de porc (PPL) a fost imobilizată prin: adsorbție, entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție și adsorbție urmată de entrapare în sol-gel, pornindu-se de la precursori etoxisilanici. Performanțele catalitice ale preparatelor cu PPL evaluate în reacția de esterificare a acidului lauric cu 1-octanol, au fost influențate de natura suportului solid, silanii precursori, catalizatorul de gelifiere, precum și de temperatura de maturare a gelului. Dintre suporturile de adsorbție utilizate, cele mai bune s-au dovedit a fi cele de tip Celite și carbonatul de calciu, atât la imobilizarea prin adsorbție cât și la entraparea în sol-gel urmată de adsorbție. S-au obținut randamente de regăsire a activității totale de peste 100%, dacă al doilea silan precursor alături de TEOS a fost MeTEOS și NH₃ a fost utilizat drept catalizator. Folosind drept catalizator de gelifiere NaF randamentele de regăsire au fost mai mici comparativ cu NH₃, iar adăugarea etanolului ca aditiv a condus la scăderea sau chiar la pierderea totală a activității. Maturarea gelului la rece (5°C) în loc de temperatura camerei a determinat doar într-un singur caz o ușoară creștere a activității enzimei imobilizate, ceea ce a dus la concluzia că nu dezactivarea termică în timpul acestei etape este cauza pierderii de activitate. Inversarea secvenței de imobilizare efectuând mai întâi adsorbția și apoi entraparea enzimei în sol-gel nu a dus la rezultatele așteptate.

Imobilizarea lipazelor microbiene prin entrapare în sol-gel

Dintre lipazele microbiene disponibile, cele mai bune activități și enantioselectivități în reacția de transesterificare cu acetat de vinil a alcoolilor secundari alifatici le-au avut cele din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) și *Burkholderia cepacia* (Amano PS), cu valori apropiate sau chiar mai mari decât cea mai performantă enzimă comercială imobilizată.

La imobilizarea lipazei Amano AK prin entrapare în sol-gel cu precursori metoxisilanici, prezența grupei nehidrolizabile octil în rețeaua sol-gel a dus la cele mai mari valori ale conversiei și ale randamentului de regăsire a activității în reacțiile de acilare ale alcoolilor secundari studiați. Valori ridicate ale enantioselectivității au fost obținute, în special pentru substratul 2-hexanol, atunci când pentru imobilizare s-au utilizat precursori silanici cu grupe nehidrolizabile propil și fenil, iar silanul precursor cu cele mai bune performanțe catalitice a fost propil-trimetoxisilanul (PrTMOS).

În cazul lipazei Amano PS, prezența grupei nehidrolizabile fenil în rețeaua sol-gel a dus la cele mai mari valori ale conversiei și ale randamentului de regăsire a activității. Dacă pentru imobilizare s-au utilizat precursori silanici cu grupa nehidrolizabilă propil și fenil, au fost obținute valori ridicate ale enantioselectivității pentru toate substraturile cu excepția 2-butanolului. Ținând cont atât de eficiența imobilizării cât și de enantioselectivitate, se poate spune că cel mai bun silan precursor a fost fenil-trimetoxisilanul (PhTMOS).

Imobilizarea lipazei din Pseudomonas fluorescens prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție

Entraparea în sol-gel combinată cu adsorbție a lipazei Amano AK a determinat creșterea stabilității și activității în timp ce enantioselectivitatea preparatelor enzimatică nu s-a modificat în mod semnificativ comparativ cu lipaza nativă. Pentru toate substraturile folosite, cele mai mari valori ale randamentului de regăsire a activității enzimatică s-au obținut atunci când silanii precursori au fost OcTMOS/TMOS la un raport molar de 1:1 (în cazul metoxisilanilor), respectiv MeTEOS/TMOS la un raport de 2:1 (în cazul etoxisilanilor). Între alcoolii studiați se observă diferențe semnificative în ceea ce privește enantioselectivitatea preparatelor enzimatică. În cazul 2-butanolului s-au obținut valori foarte mici ale excesului enantiomeric, așa cum s-a observat și în studiile anterioare. 2-Hexanolul și 2-heptanolul au fost acilați cu enantioselectivitate mai ridicată decât 2-pentanolul și 2-octanolul.

Pentru substratul 2-hexanol, natura grupării nehidrolizabile din silanii precursori (etoxisilani sau metoxisilani la un raport molar de 1:1) a avut o influență considerabilă asupra eficienței biocatalizatorilor obținuți prin metoda combinată. Creșterea lanțului alchil a fost benefică pentru activitate, grupările fenil au fost cele mai eficiente pentru preparatele obținute cu precursori etoxisilanici, iar cele octil în cazul preparatelor cu precursori metoxisilanici. La utilizarea de silani precursori cu o grupare nehidrolizabilă fenil, precursorii etoxisilanici au fost mai eficienți în ceea ce privește randamentul de regăsire a activității preparatelor enzimatică rezultate, în timp ce preparatele obținute cu precursori metoxisilanici au dus la enantioselectivități mai ridicate.

Comparând rezultatele obținute cu preparate de lipază Amano AK imobilizate prin metoda de entrapare în sol-gel cu cele prin metoda combinată cu adsorbție, a rezultat că depunerea enzimei entrapate în sol-gel pe Celite 545 duce la randamente de regăsire a activității mai ridicate. În ceea ce privește enantioselectivitatea, aceasta a fost mai ridicată pentru preparatele obținute doar prin închidere în sol-gel, dar și cele obținute prin metoda combinată au avut valori puțin mai ridicate decât în cazul lipazei native.

Utilizarea lichidelor ionice ca aditivi de imobilizare

A fost demonstrată eficiența utilizării lichidelor ionice în calitate de aditivi pentru imobilizarea prin entrapare în sol-gel. Folosind noua tehnică de entrapare a lipazei Amano AK în sol-gel, în prezență de lichide ionice s-au obținut preparate enzimatică cu activitate ridicată, reflectată în randamente de regăsire a activității totale după imobilizare de peste 100%. Pentru lichidele ionice cu același anion (BF_4^-) activitatea preparatelor imobilizate a crescut odată cu creșterea hidrofobicității și a lungimii grupării alchil din partea cationică, de la etil la octil. Lichidul ionic cu grupare alchil mai hidrofobă (octil) $[\text{Omim}]\text{BF}_4$ a dus obținerea celor mai mari valori ale randamentului de regăsire a activității. În ceea ce privește lichidele ionice cu același cation, prezența în partea anionică a unor substituenți mai voluminoși a determinat scăderea activității și enantioselectivității preparatelor obținute. Enantioselectivitatea preparatelor imobilizate reflectată de raportul enantiomeric E a crescut în raport cu enzima nativă pentru majoritatea preparatelor, iar cea mai mare valoare s-a înregistrat pentru acetatul de 1-metil-3-etil-imidazoliu.

În prezență de lichid ionic, creșterea lungimii grupării alchil nehidrolizabile din molecula silanului precursor de la metil la octil a dus la creșterea activității, iar creșterea densității acestor grupări nehidrolizabile în rețeaua de sol-gel a avut efect favorabil asupra activității doar până la o anumită limită.

În reacțiile de acilare a alcoolilor secundari alifatici folosind preparate imobilizate de tip sol-gel obținute cu precursorii OcTMOS/TMOS (1:1) și tetrafluoroborat de 1-metil-3-octil-imidazoliu ca aditiv, eficiența biocatalizatorului a fost influențată de lungimea lanțului alchil al alcoolului. Valorile cele mai mari pentru randamentul de regăsire a activității enzimatică s-au obținut în cazul 2-octanolului și 2-nonanolului, iar valori ridicate ale raportului enantiomeric E s-au observat în special în cazul 2-hexanolului și 2-heptanolului.

Prin alegerea potrivită a condițiilor de imobilizare se pot obține în prezența lichidelor ionice preparate enzimatică cu proprietăți superioare enzimei native. Se poate alege fie obținerea unei enzime imobilizate foarte active, fie a uneia cu enantioselectivitate mai mare, după necesitățile procesului respectiv.

Influența mediului de reacție asupra eficienței biocatalitice

În urma studiului influenței mediului de reacție asupra eficienței biocatalitice a lipazei Amano AK nativă sau imobilizată prin entrapare în sol-gel, s-a observat că în reacția de acilare a 2-hexanolului în solvenți organici cu polaritate mai mare (acetona, tetrahidrofuran, acetonitril) activitatea a fost mai redusă, conversiile după 24 de ore au fost în jur de 50%, în timp ce în solvenți nepolari (izooctan, hexan, toluen) s-au înregistrat valori mari ale conversiei (în jur de 70% după 24 de ore). Dintre solvenții organici obișnuiți, acetona este aceea care duce la obținerea enantioselectivității celei mai ridicate, atât în cazul lipazei AK native cât și imobilizate.

În cazul utilizării unui lichid ionic drept mediu de reacție, natura acestuia influențează de asemenea eficiența procesului. Considerând lichidele ionice cu același anion (BF_4^-), activitatea cea mai mare a enzimei s-a înregistrat dacă în partea cationică a lichidului ionic a fost prezentă o grupare alchil mai scurtă (etil), însă valorile optime, reprezentând conversie în jur de 50% și enantioselectivitate ridicată, s-au obținut atunci când această grupare a fost butil. La lichidele ionice cu aceeași parte cationică, de exemplu 1-metil-3-octil-imidazoliu, conversiile mai mari au fost favorizate de anionul hexafluorofosfat (PF_6^-), iar enantioselectivitățile mai ridicate de anionul tetrafluoroborat (BF_4^-).

Reacția de acilare în mediu de solvenți organici a alcoolilor secundari alifatici cu lipază Amano AK entrapată în sol-gel a decurs cu valori ale indicelui enantiomeric E considerabil mai mari în acetona decât în hexan. Enantioselectivitatea a fost foarte mică la 2-butanol, a crescut atingând valoarea maximă în cazul 2-hexanolului și 2-heptanolului, după care a scăzut din nou în cazul alcoolilor secundari cu grupări alchil mai lungi. Dacă mediul de reacție a fost un lichid ionic, s-au confirmat o parte dintre tendințele observate la folosirea solvenților organici. Astfel, enantioselectivitatea enzimei imobilizate a fost maximă în cazul substraturilor 2-hexanol și 2-heptanol, însă în majoritatea cazurilor ea fost mai mică decât cea a lipazei native.

La preparatele dublu imobilizate (entrapare și adsorbție) realizarea reacțiilor în mediu de lichid ionic a condus de asemenea la activități totale relative mai mari comparativ cu solvenții organici, iar valori mai ridicate ale indicelui enantiomeric E s-au obținut prin folosirea $[\text{Omim}]\text{BF}_4$ ca mediu de reacție. Dacă acest lichid ionic a fost utilizat cu rol dublu, de aditiv la formarea sol-gelului și mediu de reacție pentru

acilarea 2-hexanolului, s-a obținut un randament de regăsire a activității enzimaticice totale de aproximativ 180% și un indice enantiomeric E de 15.

Comparând variantele de imobilizare, s-a constatat că la acilarea 2-hexanolului în mediu de lichid ionic cele mai mari valori ale randamentului de regăsire a activității enzimaticice totale s-au obținut pentru preparatul obținut prin metoda combinată. Aceste valori ridicate, de peste >160%, sunt însoțite însă de o enantioselectivitate mai redusă în raport cu celelalte preparate, indiferent de mediul de reacție utilizat. Doar pe baza considerentului enantioselectivității, folosirea lichidelor ionice ca mediu de reacție nu este justificată, existând solvenți organici (în cazul nostru acetona) în care se pot obține enantioselectivități mai mari.

Influența imobilizării asupra termostabilității lipazei

Creșterea stabilității operaționale la temperaturi de lucru mai ridicate reprezintă una dintre principalele avantaje ale imobilizării, datorându-se în general unui efect de protecție pe care îl are suportul mai ales în cazul unor supraîncălziri locale de scurtă durată cauzate de efectul termic al reacției. Studiul termostabilității lipazelor imobilizate prin metodele prezentate anterior a arătat că prin entrapare în sol-gel se obține o creștere a conversiei și activității de transesterificare odată cu creșterea temperaturii de reacție pe intervalul 30-60°C, asociată cu o scădere mai puțin pronunțată a enantioselectivității reacției de acilare a 2-hexanolului, comparativ cu enzima nativă. Preparatele entrapate cu lichid ionic ca aditiv au prezentat valori mai mici ale excesului enantiomeric, însă stabilitatea termică pe intervalul studiat a fost mai bună decât în cazul lipazei entrapate în sol-gel folosind ca aditiv polietilenglicolul.

Posibilități de reutilizare multiplă a lipazei imobilizate în sol-gel

Creșterea numărului posibil de reutilizări a enzimei este un alt obiectiv important, urmărit prin orice metodă de imobilizare. Entraparea în sol-gel și-a demonstrat eficiența și sub acest aspect. Nu a constituit o surpriză faptul că tehnica de imobilizare combinată s-a dovedit a fi cea mai eficientă, deoarece imobilizarea prin efect dublu, de închidere a enzimei în rețea și depunere pe suport, reduce pierderile fizice de enzimă concomitent cu menținerea unei activități și enantioselectivități ridicate ca urmare a disponerii enzimei pe o suprafață mai mare, fără a forma agregate. Astfel s-a obținut o creștere însemnată a stabilității enzimei, activitatea reziduală după 4 reutilizări fiind 90-95% din cea inițială, în timp ce pentru enzima nativă această valoare a fost de numai 14%.

Și în cazul reacțiilor realizate în mediu de lichid ionic s-a demonstrat avantajul important al imobilizării pentru folosirea repetată a enzimei. Metoda combinată a fost cea mai performantă, pierderile de activitate după 5 reutilizări fiind mai mici pentru preparatele dublu imobilizate (5-19 %) decât pentru cele obținute doar prin simplă entrapare (10-34%).

Enantioselectivitatea preparatelor imobilizate prin entrapare în sol-gel s-a menținut după reutilizare la valori apropiate sau chiar mai mari comparativ cu primul ciclu de utilizare, probabil datorită unor modificări în sens favorabil a conformației enzimei imobilizate în timpul folosirii mai îndelungate. Un asemenea efect a fost observat atât în medii organice cât și în lichide ionice.

Investigarea structurală a preparatelor imobilizate

Utilizând microscopia electronică de scanare (SEM) cuplată cu spectrometria de raze X cu dispersie de energie (EDX) pentru caracterizarea preparatelor imobilizate, s-au obținut informații utile despre microstructura, porozitatea și textura acestora, precum și o evaluare semicantitativă a prezenței elementelor existente în preparatele respective. Astfel, imaginile SEM ale preparatelor imobilizate prin entrapare în sol-gel arată o structură mai poroasă, comparativ cu cea a gelului martor, iar din spectrele EDX, s-a observat o creștere a conținutului de carbon față de sol-gelurile martor, ceea ce confirmă prezența enzimei în xerogelurile obținute. Lichidul ionic utilizat ca aditiv modifică morfologia suprafeței gelului, iar prin prezența borului și a fosforului observată din spectrele EDX, se confirmă faptul că o parte a lichidului ionic a rămas în structura xerogelului obținut după spălare și uscare. Utilizarea metodei combinate de entrapare și adsorbție pe Celite a dus la o structură total diferită a preparatului, imaginea SEM prezintă zone poroase ce alternează cu structuri sub formă de sfere și fagure.

Rezultatele analizei calitative a principalelor elemente identificate în toate preparatele care au fost supuse investigațiilor structurale confirmă prezența componentelor utilizate în cursul procesului de imobilizare și în preparatul rezultat după spălare și uscare, ceea ce arată faptul că ele rămân parțial înglobate, fizic sau chimic, în xerogelul obținut.

Spectrofotometria în infraroșu s-a dovedit a fi o metodă utilă pentru a confirma structura preparatelor obținute prin metoda sol-gel, deși prezența enzimei nu poate fi demonstrată datorită unor benzi care se suprapun peste benzile caracteristice grupării amidice. Și din spectrele IR ale preparatelor se confirmă că o parte din lichidul ionic folosit ca aditiv rămâne atașat sau încorporat de matricea de sol-gel. S-a demonstrat și faptul că formarea xerogelurilor a avut loc cu încorporarea precursorului silanic ce conține gruparea hidrofobă nehidrolizabilă, benzile caracteristice acestuia regăsindu-se în spectrul preparatului.

Rezultatele obținute în cadrul studiilor din această teză au constituit subiectul unui număr de 7 lucrări științifice publicate în reviste de specialitate sau volumele unor manifestări științifice și 10 lucrări comunicate la manifestări științifice din țară și străinătate.

Lucrări publicate și comunicate pe baza rezultatelor prezentate în teză:

1. Péter F., **Zarcuța C.**, Kiss C., Csunderlik C., “Enantioselective acylation of secondary alcohols by sol-gel entrapped lipases” *Conference of Chemical Engineering, Veszprém, 2007*, 118-122.
2. Péter F., **Zarcuța C.**, Kiss C., Csunderlik C., “Enhancement of lipases enantioselectivity by entrapment in hydrophobic sol-gel materials: influence of silane precursors and immobilization parameters” *The 13th European Congress on Biotechnology, Barcelona, 2007, Journal of Biotechnology*, 131S, S109, ISI Web of Science, factor de impact 2,565 (2007).
3. Kiss C., **Zarcuța C.**, Csunderlik C., Péter F., “Acilarea enantioselectivă a unor alcooli secundari prin biocataliză cu lipază din *Pseudomonas fluorescens* imobilizată prin metoda sol-gel” *Revista de Chimie, 2007*, 58 (8), 799-804, ISI Web of Science, factor de impact 0,281 (2007).

4. **Zarcula C.**, Corîci L., Croitoru R., Péter F., “Kinetic resolution of secondary alcohols in lipase-catalyzed transesterification reactions” *Annals of West University of Timisoara*, **2007**, Series of Chemistry 16 (4), 107-112, revistă cotate CNCSIS B.
5. Pașka O., **Zarcula C.**, Péter F., “Optical resolution of 2-pentanol and 2-hexanol transesterification reactions catalyzed by *Burkholderia cepacia* (PS) lipase” *Annals of West University of Timisoara*, **2007**, Series of Chemistry 16 (4), 73-78, revistă cotate CNCSIS B.
6. **Zarcula C.**, Péter F., “Enantiomer resolution by solid-phase biocatalysis” *The 12th International Symposium for Students in Chemistry*, Timișoara, **2007**, 19.
7. **Zarcula C.**, Croitoru R., Fițigău F., Kakasi-Zsurka S., Péter F., “Improvement of Enzyme Stability by an Integrated Technique of Sol-Gel Entrapment and Adsorption” *International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, Timișoara, **2008**, P309.
8. **Zarcula C.**, Croitoru R., Csunderlik C., Péter F., “Ionic Liquids as Immobilization Additives and Reaction Media for Lipase-Catalyzed Reaction” *International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, Timișoara, **2008**, P310.
9. **Zarcula C.**, Croitoru R., Csunderlik C., Péter F., “Influence of solvents and nonstructural ionic liquid templates on activity and enantioselectivity of sol-gel entrapped lipases” *The 2nd International Conference „Biocatalysis in Non-Conventional Media”*, Moscova, **2008**, 9.
10. **Zarcula C.**, Croitoru R., Csunderlik C., Péter F., “Ionic liquids and sol-gel immobilized lipases: possible synergism” *The 4th International Congress on Biocatalysis 2008*, Hamburg, **2008**, P171, 293-294.
11. **Zarcula C.**, Croitoru R., Csunderlik C., Péter F., “Influența mediului de reacție asupra acilării unor alcooli secundari” *The XXXth Romanian Chemistry Conference*, Calimănești-Căciulata, **2008**, P.S.I. 28, 64.
12. Péter F., **Zarcula C.**, Kakasi-Zsurka S., Croitoru R., Davidescu C., Csunderlik C., “Solid-phase lipase biocatalysts for kinetic resolutions” *The 13th International Biotechnology Symposium (IBS)*, Dalian, **2008**, *Journal of Biotechnology*, 136S, S374, ISI Web of Science, factor de impact 2,565 (2007).
13. **Zarcula C.**, Corîci L., Croitoru R., Péter F., “Double immobilization of porcine pancreas lipase” *Annals of West University of Timisoara*, **2008**, Series of Chemistry 17 (3), 61-66.
14. Croitoru R., **Zarcula C.**, Péter F., “Influence of reaction medium on kinetic resolution of secondary alcohols catalyzed by immobilized lipases” *The 13th International Symposium for Students in Chemistry*, Timișoara, **2008**, 13.

15. **Zarcu C.**, Corîci L., Croitoru R., Csunderlik C., Péter F., “Improvement of lipase catalytic properties by immobilization in hybrid matrices” *Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology*, **2009**, 40, în curs de publicare, citată în baze de date internaționale (Google Scholar).
16. **Zarcu C.**, Kiss C., Corîci L., Croitoru R., Csunderlik C., Péter F., “Combined sol-gel entrapment and adsorption method to obtain solid-phase lipase biocatalysts” *Revista de Chimie*, **2009**, în curs de publicare, ISI Web of Science, factor de impact 0,281 (2007).
17. **Zarcu C.**, Corîci L., Croitoru R., Csunderlik C., Péter F., “Preparation and catalytic properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during immobilization of lipase by the sol-gel method” *The 9th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations*, Berna, **2009**, în curs de publicare.

5. BIBLIOGRAFIE

- Aghajari N., Feller G., Gerday C., Haser R., *Structure*, **1998**, *6*, 1503-1516.
- Allenmark S., Ohlsson A., *Biocatalysis*, **1992**, *6*, 211-221.
- Alquati C., De Gioia L., Santarossa G., Alberghina L., Fantucci P., Lotti M., *Eur. J. Biochem.*, **2002**, *269*, 3321-3328.
- Altreuter D. H., Dordick J. S., Clark D. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 1871-1876.
- Anderson E. M., Larsson K. M., Kirk O., *Biocatal. Biotransform.*, **1998**, *16*, 181-204.
- Ariga O., Suzuki T., Sano Y., Murakami Y., *J. Ferment. Bioeng.*, **1996**, *82*, 341-345.
- Armon R., Dosoretz C., Starosvetsky J., Orshansky F., Saadi I., *J. Biotechnol.*, **1996**, *51(3)*, 279-285.
- Avnir D., *Acc. Chem. Res.*, **1995**, *28*, 328-334.
- Avnir D., Braun S., Lev O., Ottolenghi M., *Chem. Mater.*, **1994**, *6*, 1605-1614.
- Avnir D., Coradin T., Lev O., Livage J., *J. Mater. Chem.*, **2006**, *16*, 1013-1030.
- Baker G.A., Jordan J.D., Bright F.V., *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **1998**, *11*, 43-54.
- Balcao V. M., Paiva A. L., Malcata F. X., *Enzyme Microb. Technol.*, **1996**, *18*, 392-416.
- Balkenhohl F., Ditrich K., Hauer B., Ladner W., *J. Prakt. Chem./Chem.-Ztg.*, **1997**, *339*, 381-384.
- Bélafi-Bako' K., Dörmo N., Gubicza L., *Desalination*, **2002**, *149*, 267-268.
- Bhatia R.B., Brinker C. J., Gupta A.K., Singh A.K., *Chem. Mater.*, **2000**, *12*, 2434-2441.
- Bianchi D., Cesti P., *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 5657-5659.
- Bianchi D., Rosetti A., Cesti P., Golini P., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 3231-3234.
- Bogel-Lukasik R., *Monatshefte für Chemie*, **2007**, *138*, 1137-1144.
- Bommarius A. S., Riebel B. R., *Biocatalysis, Fundamentals and Applications*, **2004**, Editura Wiley-VCH, Weinheim.
- Bornscheuer U. T., Kazlauskas R. J., *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio-Or Stereoselective Transformations*, **1999**, Editura Wiley-VCH, Weinheim.
- Bosley J., *Biochem. Soc. Trans.*, **1997**, *25*, 174-178.
- Bovara R., Carrea G., Ottolina G., Riva S., *Biotechnol. Lett.*, **1993**, *15*, 169-174.
- Brady L., Brzozowski A. M., Derewenda Z. S., Dotson G., Tolley S., Turkenburg J. P., Christiansen L., Hüge-Jensen B., Norskov L., Thim L., Menge U., *Nature*, **1990**, *343*, 767-770.
- Braun S., Rappoport S., Zusman R., Avnir D., Ottolenghi M., *Mater. Lett.*, **1990**, *10*, 1-5.
- Brennan J. D., Benjamin D., DiBattista E., Gulcev M. D., *Chem. Mater.*, **2003**, *15*, 737-745.
- Brinker C. J., Scherer G. W., *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, **1990**, Editura Academic Press, San Diego.
- Brocca S., Grandori R., Breviario D., Lotti M., *Curr. Genet.*, **1995**, *28*, 454-457.
- Brockhoff H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1968**, *159*, 296-303.
- Brockman H. L., Law J. H., Kezdy F. J., *J. Biol. Chem.*, **1973**, *248*, 965-970.
- Bryan P. N., *Biotechnol. Adv.*, **1987**, *5*, 221-234.
- Brzozowski A. M., Derewenda U., Derewenda Z. S., Dodson G. G., Lawson D. M., Turkenburg J. P., Bjorkling F., Hüge-Gensen B., Patkar S. A., Thim L., *Nature*, **1991**, *351*, 491-497.
- Buchholz K., Kasche V., Bornscheuer U. T., *Biocatalysts and Enzyme Technology*, **2005**, Editura Wiley-VCH, Weinheim.

- Buchholz K., Poulson P. B., *Overview of History of Applied Biocatalyst in : Applied Biocatalysis*, **2000**, Editura Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Campostrini R., Carturan G., Caniato R., Piovan A., Filippini R., Innocenti G., Cappelletti E. M., *J. Sol-gel Sci. Technol.*, **1996**, 7, 87-97.
- Cao L., *Carrier-bound Immobilized Enzymes, Principles, applications and Design*, **2005**, Editura Wiley-VCH, Weinheim.
- Cao X., Yang J., Shu L., Yu B., Yan Y., *Process Biochemistry*, **2009**, 44, 177-182.
- Carturan G., Campostrini R., Diré S., Scardi V., De Alteriis E., *J. Mol. Catal.*, **1989**, 57(1), L13-L16.
- Chadha A., Manohar M., *Tetrahedron: Asymetry*, **1995**, 6, 651-652.
- Chamorro S., Sánchez-Montero J. M., Alcántara A. R., Sinisterra J. V., *Biotechnol. Lett.*, **1998**, 20, 499-505.
- Chang C. S., Hsu C. S., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2005**, 80, 537-544.
- Chaubey A., Parshad R., Koul S., Taneja S. C., Quazi G. N., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**, 73, 598-606.
- Chen C. S., Wu S. H., Girdaukas G., Sih C. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, 109, 2812-2817.
- Chen J. P., Lin W. S., *Enzyme Microb. Technol.*, **2003**, 32, 801-811.
- Chen Q., Kenausis G.L., Heller A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 4582-4585.
- Chenevert R., Gagnon R., *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 1054-1057.
- Chin J. T., Wheeler S. L., Klibanov A. M., *Biotechnol Bioeng*, **1994**, 44, 140-145.
- Colton I. J., Ahmed S. N., Kazlauskas R. J., *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 212-217.
- Creighton T. E., *Proteins*, **1984**, Editura Freeman, Oxford.
- Croitoru R., **Zarcula C.**, Péter F., *The 13th International Symposium for Students in Chemistry*, Timișoara, **2008**, 13.
- Cygler M., Schrag J. D., Sussman J. L., Harel M., Silman I., Gentry M. K., Doctor B. P., *Protein Sci.*, **1993**, 2, 366-382.
- Dave B. C., Dunn B., Valentine J. S., Zink J. I., *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 1120A-1127A.
- Dave B., Soyez H., Miller J. M., Dunn B., Valentine J. S., Zink J. I., *Chem. Mater.* **1995**, 7, 1431-1434.
- De los Ríos A. P., Hernández-Fernández F. J., Martínez F. A., Rubio M., Villora G., *Biocatal. Biotrans.*, **2007**, 25, 151-156.
- Derewenda U., Brzozowski A. M., Lawson D. M., Derewenda Z. S., *Biochemistry*, **1992**, 31, 1532-1541.
- Derewenda U., Swenson L., Wei Y., Green R., Kobos P. M., Joerger R., Haas M. J., Derewenda Z. S., *J. Lipid. Res.*, **1994**, 35, 524-534.
- Dickey F. H., *J. Phys. Chem.*, **1955**, 59, 695-707.
- Dragomirescu M., Oros B., Preda G., Péter F., *Rev. Chim.*, **2005**, 57(6), 610-614.
- Eckstein M., Vilella F. M., Liese A., Kragl U., *Chem. Commun.*, **2004**, 1084-1085.
- Eckstein M., Wasserscheid P., Kragl U., *Biotechnol. Lett.*, **2002**, 24, 763-767
- Edmiston P. L., Wambolt C. L., Smith M. K., Saavedra S. S., *J. Colloid Interface Sci.* **1994**, 163, 395-406.
- Egloff M. P., Marguet F., Buono G., Verger R., Cambillau C., van Tilbeurgh H., *Biochemistry*, **1995**, 34, 2751-2762.
- Ellerby L. M., Nishida C. R., Nishida F., Yamanaka S. A., Dunn B., Valentine J. S., Zink J. I., *Science*, **1992**, 255, 1113-1115.
- Ema T., Maeno S., Takaya Y., Sakai T., Utaka M., *Tetrahedron: Asymetry*, **1996**, 7, 625-628.

- Engbersen J. F. J., Broos J., Verboom W., Reinhoudt D. N., *Pure Appl. Chem.*, **1996**, *68*, 2171-2178.
- Entressangles B., Desnuelle P., *Biochim. Biophys. Acta*, **1974**, *341*, 437-446.
- Erbeldinger M., Mesiano A. J., Russel A.J. *Biotechnol. Prog.*, **2000**, *16*, 1129-1131.
- Flora K., Brennan J. D., *Chem. Mater.*, **2001**, *13*, 4170-4179.
- Foelsche E., Hickel A., Hönig H., Seuffer-Wasserthal P., *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 1749-1753.
- Foglia T. A., Villeneuve P., *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **1997**, *74*, 1447-1450.
- Forestia M. L., Alimentib G. A., Ferreira M. L., *Enzyme Microbial Technol.*, **2005**, *36*, 338-349.
- Freemantle M., *Chem. Eng. News*, **2004**, *82*, 44-49.
- Furukawa S. Y., Kawakami K., *J. Ferment. Bioeng.*, **1998**, *85*, 240-242.
- Furukawa S. Y., Ono T., Ijima H., Kawakami K., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2001**, *15*, 65-70.
- Furukawa S. Y., Ono T., Ijima H., Kawakami K., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2002^a**, *17*, 23-28.
- Furukawa S. Y., Ono T., Ijima H., Kawakami K., *Biotechnology Letters*, **2002^b**, *24*, 13-16.
- Georgens U., Schneider M. P., *J. Chem. Soc.*, **1991**, 1064.
- Gerstein M., Lesk A. M., Chothia C., *Biochemistry*, **1994**, *33*, 6739-6749.
- Ghanem A., Schurig V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, *14*, 2547-2555.
- Ghanem A., *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 1721-1754.
- Ghosh D., Wawrzak Z., Pletnev V. Z., Li N., Kaiser R., Pangborn W., Jornvall H., Erman M., Duax W.L., *Structure*, **1995**, *3*, 279-288.
- Gill I., Ballesteros A., *Ann. New York Acad. Sci.*, **1996**, *799*, 697-700.
- Gill I., Ballesteros A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 8587-8598.
- Gill I., Ballesteros A., *Trends Biotech.*, **2000**, *18*, 282-296.
- Gill I., *Chem. Mater.*, **2001**, *13* (10), 3404-3421.
- Giordani R., Muolin A., Verger R., *Phytochemistry*, **1991**, *30*, 1069-1072.
- Glad M., Norrloew O., Sellergren B., Siegbahn N., Mosbach K., *J. Chromatogr.*, **1985**, *347*, 11-23.
- González-Navarro H., Braco L., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **1997**, *3*, 111-119.
- Gonçalves A. P. V., Lopes J. M., Lemos F., Ramoa Ribeiro F., Prazeres D. M. F., Cabral J. M. S., Aires-Barros M. R., *Enzyme Microb. Technol.*, **1997**, *20*, 93-101.
- Goto M., Ogawa H., Isobe T., Kawasaki M., Kometani T., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2003**, *24/25*, 67-73.
- Gotor V., *Biocatal. Biotransform.*, **2000**, *18*, 87-103.
- Gottfried D. S., Kagan A., Hoffman B. M., Friedman J. M., *J. Phys. Chem. B*, **1999**, *103*, 2803-2807.
- Griebenow K., Laureano Y. D., Santos A. M., Clemente I. M., Rodriguez L., Vidal M. W., Barletta G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 8157-8163.
- Grochulski P., Bouthiller F., Kazlauskas R. J., Serreqi A. N., Schrag J. D., Ziomek E., Cygler M., *Biochemistry*, **1994^a**, *33*, 3494-3500.
- Grochulski P., Li Y., Schrag J. D., Cygler M., *Protein Sci.*, **1994^b**, *3*, 82-91.
- Guisan J. M., *Immobilization of Enzymes and Cells*, **2006**, ediția a II-a, Editura Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Gupta M. N., *Eur. J. Biochem.*, **1992**, *203*, 25-32.
- Gupta R., Chaudhury N. K., *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, *22*, 2387-2399.
- Hartnett A. M., Ingersoll C. M., Baker G. A., Bright F. V., *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 1215-1224.

- Hecht H. J., Sobek H., Haag T., Pfeifer O., van Pee K. H., *Nat. Struct. Biol.*, **1994**, *1*, 532-537.
- Hinckley G., Mozhaev V. V., Budde C., Khmelnsky Y. L., *Biotechnol. Lett.*, **2002**, *24*, 2083-2087.
- Hirose Y., Kariya Y., Nakanishi Y., Kurono Y., Archiwa K., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 1063-1066.
- Hjorth A., Carrière F., Cudrey C., Wöldike H., Boel E., Lawson D. M., Ferrato F., Cambillau C., Dodson G. G., Thim L., Verger R., *Biochemistry*, **1993**, *32*, 4702-4707.
- Holmquist M., *Current Protein and Peptide Science*, **2000**, *1*, 209-235.
- Holverda K., Holverdaerkade P. E., Willingen A. H. A., *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1936**, *55*, 43-57.
- Howarth J., James P., Dai J., *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 7517-7519.
- Hui D. Y., Kissel J. A., *FEBS Lett.*, **1990**, *276*, 131-134.
- Husum T. L., Jorgensen C. T., Christensen M.W., Kirk O., *Biocatal. Biotransform.*, **2001**, *19*, 331-338.
- Inama L., Diré S., Carturan G., Cavazza A., *J. Biotechnol.*, **1993**, *30(2)*, 197-210.
- Itoh T., Akasaki E., Kudo K., Shirakami S., *Chem. Lett.*, **2001**^a, *1*, 262-263.
- Itoh T., Akasaki E., Kudo K., Shirakami S., *Chem. Lett.*, **2001**^b, *30*, 262-263.
- Itoh T., Akasaki E., Nishimura Y., *Chem. Lett.*, **2001**^c, *31*, 154-155.
- Itoh T., Akasaki E., Nishimura Y., *Chem. Lett.*, **2002**, 154-155.
- Jaeger K. E., Ransac S., Koch H. B., Ferrato F., Dijkstra B. W., *FEBS Lett.*, **1993**, *332*, 143-149.
- Janczarski I., Mazur A., Witkowski K., Lubaszka E., *Acta Physiol. Pol.*, **1976**, *27*, 301-306.
- Jin W., Brennan J. D., *Anal. Chim. Acta*, **2002**, *461*, 1, 1-36.
- Kaar J. L., Jesionowski A. M., Berberich J. A., Moulton R., Russell A. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4125-4131.
- Kaftzik N., Wasserscheid P., Kragl U., *Org. Proc. Res. Dev.*, **2002**, *6*, 553-557.
- Kaga H., Siegmund B., Neufellner E., Faber K., Paltauf F., *Biotechnol. Tech.*, **1994**, *8*, 369-374.
- Kandimalla V. B., Tripathi V. S., Ju H., *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2006**, *36*, 73-106.
- Katchalski-Katzir E., *Trends Biotechnol.*, **1993**, *11*, 471-478.
- Kato K., Gong Y., Saito T., Yokogawa Y., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2002**, *66 (1)*, 221-223.
- Kawakami K., *Biotechnol. Tech.*, **1996**, *10*, 491-494.
- Kawakami, K.; Yoshida, S., *J. Ferment. Bioeng.*, **1996**, *82*, 239-245.
- Keeling-Tucker T., Brennan J. D., *Chem. Mater.*, **2001**, *13*, 3331-3350.
- Kielbasinski P., Albrycht M., Luczak J., Mikolajczyk M., *Tetrahedron Asymmetry*, **2002**, *13*, 735-738.
- Kim K. K., Song H. K., Shin D. H., Hwang K. Y., Suh S. W., *Structure*, **1997**, *5*, 173-185.
- Kim K. W., Song B., Choi M. Y., Kim M. J., *Organ. Lett.*, **2001**, *3*, 1507-1509.
- Kim M. G., Lee E. G., Chung B. H., *Process Biochem.*, **2000**, *35*, 977-982.
- Kim M. J., Choi Y. K., *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 1605-1607.
- Kirk O., Christensen M. W., *Org. Proc. Res. Dev.*, **2002**, *6*, 446-451.
- Kiss C., **Zarcula C.**, Csunderlik C., Péter F., *Revista de Chimie*, **2007**, *58 (8)*, 799-804.
- Klempier N., Faber K., Griengl H., *Synthesis*, **1989**, 933-934.

- Klibanov A. M., *TIBS*, **1989**, *14*, 141-144.
- Kogusi Y., Takahashi K., Lopez C., *J. Am. Oil Chem.*, **1995**, *72*, 1281-1285.
- Koichi Y., Suginata K., Yamamoto Y., *J. Chem. Soc.*, **1995**, *1*, 1645-1646.
- Kragl U., Eckstein M., Kaftzik N., *Curr. Opinion Biotechnol.*, **2002**, *13*, 565-571.
- Kumar A., Kamalasanan M. N., Singh M., Chauhan P., Malhotra B.D., *Advances in Biosensors*, **2003**, *5*, 101-130.
- Kuncova G., Sivel M., *J. Sol-gel Sci. Technol.*, **1997**, *8*, 667-671.
- Lalonde J. J., Govardhan C., Khalaf N., Martinez A. G., Visuri K., Margolin A. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 6845-6852.
- Lang D. A., Dijkstra B. W., *Chem. Phys. Lipids.*, **1998**, *93*, 115-122.
- Lang D. A., Mannesse M. L. M., De Haas G. H., Verheij H. M., Dijkstra B. W., *Eur. J. Biochem.*, **1998**, *254*, 333-340.
- Lang D., Hofmann B., Haalck L., Hecht H. J., Spener F., Schmid R. D., Schomburg D., *J. Mol. Biol.*, **1996**, *259*, 704-717.
- Laszlo J. A., Compton D. L., *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, *75*, 181-186.
- Laszlo J. A., Compton D. L., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2002**, *18*, 109-120.
- Lau R. M., van-Rantwijk F., Seddon K. R., Sheldon R. A. *Organ. Lett.*, **2000**, *2*, 4189-4191.
- Lawson D. M., Derewenda U., Serre L., Ferri S., Szittner R., Wei Y., Meighen E. A., Derewenda Z. S., *Biochemistry*, **1994**, *33*, 9382-9388.
- Lee S. H., Doan T. T. N., Ha S. H., Chang W. J., Koo Y. M., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2007**^b, *47*, 129-134.
- Lee S. H., Doan T. T. N., Ha S. H., Koo Y. M., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2007**^a, *45*, 57-61.
- Lemke K., Lemke M., Theil F., *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 6268-6273.
- Lin J., Brown C. W., *Trends Anal. Chem.*, **1997**, *16*, 200-211.
- Liu Y. Y., Xu J. H., Hu Y., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2000**, *10*, 523-529.
- Liu Y., Wang M., Li J., Li Z., He P., Liu H., Li J., *Chem. Commun.*, **2005**, 1778.
- Louwrier A., Drtina G. J., Klibanov A. M., *Biotech. Bioeng*, **1996**, *55*, 1-5.
- Lowe M. E., *J. of Lipid Research*, **2002**, *43*, 2007-2016.
- Lozano P., de Diego T., Carrie D., Vaultier M., Iborra J. L. *Chem. Commun.*, **2002**, *1*, 692-693.
- Lozano P., de Diego T., Carrie D., Vaultier M., Iborra J. L., *Biotechnol. Lett.*, **2001**^b, *23*, 1529-1533.
- Lozano P., de Diego T., Guegan J. P., Vaultier M., Iborra J. L., *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**^a, *75*, 563-569.
- Lundell K., Rajjola T., Kanerva L. T., *Enzyme Microb. Technol.*, **1998**, *22*, 86-93.
- Margolin A. L., *Tibtech*, **1996**, *14*, 223-230.
- Marlot C., Langrand G., Triantaphylides C., Baratti J., *Biotechnol. Lett.*, **1985**, *7*, 647-650.
- Martinek K., Levashov A. V., Klyachko N., Khmelnsky Y. L., Berezin I. V., *Eur. J. Biochem.*, **1986**, *155*, 453-468.
- Martinez C., Nicolas A., van Tilbeurg H., Egloff M. P., Cudrez C., Verger R., Cambillau C., *Biochemistry*, **1994**, *33*, 83-89.
- Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R., *Enzyme Microb. Technol.*, **2007**, *40*, 1451-1463.
- Matsuda T., *Future directions in Biocatalysis*, **2007**, Elsevier.
- Matsuda T., Harada T., Nakamura K., Ikariya T., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, *16*, 909-915.

- Matsumoto M., Kida K., Kondo K., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2001**, 76, 1070-1073.
- Maury S., Buisson P., Pierre A. C., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2002**, 19/20, 269-278.
- Mingarro I., Abad C., Braco L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, 92, 3308-3312.
- Montero S., Blanco A., Virto M., Landeta L., Agud R., Solozabal R., Lascaray J. M., Renobales M., Llama M. J., Serra J. L., *Enzyme Microb. Technol.*, **1993**, 15, 239-247.
- Moris F., Gotor V., *J. Org. Chem.*, **1992**, 57, 2490-2492.
- Mukherjee K. D., Kiewitt I., *J. Agric. Food. Chem.*, **1996**, 44, 1948-1952.
- Nagao A., Kito M., *Biocatalysis*, **1990**, 3, 295-305.
- Nardini M., Lang D. A., Liebeton K., Jaeger K. E., Dijkstra B. W., *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 31219-31225.
- Narinx E., Baise E., Gerday C., *Protein Eng.*, **1997**, 10, 1271-1279.
- Nilsson J., Blackberg L., Carlsson P., Enerback S., Hernell O., Bjursell G., *Eur. J. Biochem.*, **1990**, 192, 543-550.
- Noble M. E. M., Cleasby A., Johnson L. N., Egmond M. R., Frenken L. G. J., *FEBS Lett.*, **1993**, 331, 123-128.
- Noureddini H., Gao X., *J. Sol-Gel Sci. Techn.*, **2007**, 41, 31-41.
- Noureddini H., Gao X., Joshi S., Wagner P. R., *JAOCS*, **2002**, 79 (1), 33-40.
- Obert R., Dave B. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 12192-12193.
- Ollis D. L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Frenken S. M., Harel M., Remington S. J., Silman I., Schrag J., Sussman J. L., Vershueren K. H. G., Goldman A., *Protein Eng.*, **1992**, 5, 197-221.
- Ollis D. L., Goldman A., *Protein Eng.*, **1992**, 5, 197-211.
- Omar I. C., Saeki H., Nishio N., Nagai S., *Agric. Biol. Chem.*, **1988**, 52, 99.
- Overbeeke P. L. A., Govardhan C., Khalaf N., Jongejan J. A., Heijnen J. J., *J. Molec. Cat. B: Enzymatic*, **2000**, 10, 385-393.
- Ozegowski R., Kunath A., Schick H., *Liebigs Ann. Chem.*, **1993**, 805-808.
- Paizs C., Toşa M., Bódai V., Szakács GY., Kmezc I., Simándi B., Majdik C., Novák L., Irimie F.-D., Poppe L., *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14 (13), 1943-1949.
- Park S., Kazlauskas R. J., *Curr. Opinion Biotechnol.*, **2003**, 14, 432-437.
- Park S., Kazlauskas R.J., *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 8395-8401
- Park S., Viklund F., Hult K., Kazlauskas R. J., *Green Chemistry*, **2003**, 5, 715-719.
- Paşka O., **Zarcula C.**, Péter F., *Annals of West University of Timisoara*, **2007**, Series of Chemistry 16 (4), 73-78.
- Pathak D., Ollis D., *J. Mol. Biol.*, **1990**, 214, 497-525.
- Persson M., Bornscheuer U. T., *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2003**, 22, 21-27.
- Péter F., *Biotransformări enzimatică*, **2005**, Editura Politehnica, Timișoara.
- Péter F., Poppe L., Kiss C., Szőcs-Biró E., Preda G., **Zarcula C.**, Olteanu A., *Biocatal.Biotransform.*, **2005**, 23, 251-260.
- Péter F., Preda G., Dragomirescu M., "Biocatalizatori enzimatici. Obținere, Caracterizare, Aplicații", **2003**, Editura Mirton, Timișoara.
- Péter F., **Zarcula C.**, Kakasi-Zsurka S., Croitoru R., Davidescu C., Csunderlik C., *The 13th International Biotechnology Symposium (IBS)*, Dalian, **2008**, Abstracts/ *Journal of Biotechnology*, 136S, S374.
- Péter F., **Zarcula C.**, Kiss C., Csunderlik C., *Conference of Chemical Engineering, Veszprém*, **2007^a**, 118-122.
- Péter F., **Zarcula C.**, Kiss C., Csunderlik C., *The 13th European Congress on Biotechnology*, Barcelona, **2007^b**, Abstracts/ *Journal of Biotechnology*, 131S, S109.

- Peters G. H., Svendsen A., Langberg H., Vind J., Patkar S. A., Toxvaerd S., Kinnunen P. K. J., *Biochemistry*, **1998**, *37*, 12375-12383.
- Pfruender H., Amidjojo M., Kragl U., Weuster-Botz D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2004**, *43*, 4529-4531.
- Pierre A. C., *Biocatal. Biotransform.*, **2004**, *22(3)*, 145-170.
- Pinheiro R. C., Soares C. M. F., dos Santos O. A. A., de Castro H. F., de Moraes F. F., Zanin G. M., *J. Molec. Catal. B: Enzymatic*, **2008**, *52-53*, 27-33.
- Pleiss J., Fischer M., Schmid R. D., *Chemistry and Physics of Lipids*, **1998**, *93*, 67-80.
- Poole C. F., *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1037*, 49-82.
- Pretsch E., Bühlmann P., Affolter C., *Structure determination of organic compounds*, **2000**, Editura Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Pronk W., Kerkhof P. J. A. M., van Helden C., van't Riet K., *Biotechnol. Bioeng.*, **1988**, *32*, 512-518.
- Reetz M. T., Tielmann P., Wiesenhöfer W., Könen W., Zonta A., *Adv. Synth. Catal.*, **2003**, *345*, 717-728.
- Reetz M. T., Wenkel R., Avnir D., *Synthesis*, **2000**, *6*, 781-783.
- Reetz M. T., Wiesenhöfer W., Francio G., Leitner W., *Chem. Commun.*, **2002**, *1*, 992-993.
- Reetz M. T., Zonta A., Simpelkamp J., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1995**, *34*, 301-303.
- Reetz M. T., Zonta A., Simpelkamp J., *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, *49*, 527-534.
- Reetz M. T., Zonta A., Simpelkamp J., Konen W., *Chem. Commun.*, **1996**, *11*, 1397-1398.
- Reetz M. T., Zonta A., Vijayakrishnan V., Schimossek K., *J. Mol. Catal. A*, **1998**, *134*, 251-258.
- Reetz, M. T., *Adv. Mater.*, **1997**, *9*, 943-954.
- Roux C., Livage J., Farhati K., Monjour L., *J. Sol-gel Sci. Technol.*, **1997**, *7*, 135-143.
- Ru M. T., Dordick J. S., Reimer J. A., Clark D. S., *Biotechnol. Bioeng.*, **1999**, *63*, 233-241.
- Rúa M. L., Díaz-Mauriño T., Fernández V. M., Otero C., Ballesteros A., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1993**, *1159*, 181-189.
- Ruckenstein E., Wang X., *Biotechnol. Tech.*, **1993**, *7*, 117-122.
- Sarda L., Desnuelle P., *Biochim. Biophys. Acta*, **1958**, *30*, 513-521.
- Schmid R. D., Verger R., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1998**, *37*, 1608-1633.
- Schmidt A., *Nature*, **2001**, *409*, 258-268.
- Schöfer S. H., Kaftzik P., Wasserscheid U., *Chem. Commun.*, **2001**, 425-426.
- Schonheyder F., Volqvartz K., *Acta Physiol. Scand.*, **1945**, *9*, 57-67.
- Schrag J. D., Li Y., Cygler M., Lang D., Burgdorf T., Hecht H. J., Schmid R., Schomburg D., Rydel T. J., Oliver J. D., Strickland L. C., Dunaway C. M., Larson S. B., Day J., McPherson A., *Structure*, **1997**, *5*, 187-202.
- Seddon K. R., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **1997**, *68*, 351-356.
- Sharma R., Christi Y., Banerjee U. C., *Biotechnol. Adv.*, **2001**, *19*, 627-662.
- Sheldon R. A., *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, *349*, 1289-1307.
- Sheldon R. A., Lau R. M., Sorgedrager M. J., van-Rantwijk F., Seddon K. R., *Green Chem*, **2002**, *4*, 147-151.
- Sheldon R., *Chem. Commun.*, **2001**, *23*, 2399-2407.
- Shi F., Zhang Q., Li D., Deng Y., *Chem. Eur. J.*, **2005**, *11*, 5279-5288.
- Shtelzer S., Rappoport S., Avnir D., Ottolenghi M., Braun S., *Biotech. Appl. Biochem.*, **1992**, *15*, 227-235.
- Silman J. M., Katchalski E., *Annu. Rev. Biochem.*, **1966**, *35*, 873-908.

- Soares C. M. F., dos Santos O. A., de Castro H. F., de Moraes F. F., Zanin G. M., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2006**, *39*, 69-76.
- Soares C. M. F., dos Santos O. A., Olivo J. E., de Castro H. F., de Moraes F. F., Zanin G. M., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, *29*, 69-79.
- Straathof A. J., Panke S., Schmid A., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2002**, *13*, 548-556.
- Stryer L., *Biochemistry*, **1995**, Editura Freeman, New York.
- Sussman J. L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I., *Science*, **1991**, *253*, 872-879.
- Svendsen A., Patkar S., Egel-Mitani M., Borch K., *International Publication*, **1994**, WO 94/01541.
- Swatloski R. P., Spear S. K., Holbrey J. D., Rogers R. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 4974-4975.
- Takano S., Yamada O., Lida H., Ogasawara K., *Synthesis*, **1994**, *6*, 592-596.
- Tanaka K., Shogase Y., Osuga H., Suzuki H., Nakamura K., *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 1675-1678.
- Tantakulsiri J., Jeyashole N., Krisanangkura K., *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **1997**, *74*, 173.
- Thirstrup K., Verger R., Carrière F., *Biochemistry*, **1994**, *33*, 2748-2756.
- Tosa T., Mori T., Fuse N., Chibata I., *Enzymologia*, **1966**, *31*, 214-224.
- Uppenberg J., Ohrner N., Norin M., Hult K., Kleywegt G. J., Patkar S., Waagen V., Anthonen T., Jones T. A., *Biochemistry*, **1995**, *34*, 16838-16851.
- Uyama H., Takamoto T., Kobayashi S., *Polym. J.*, **2002**, *34*, 94-96.
- Van Oort M. G., Deveer A. M. Th. J., Dijkman R., Tjeenk M. L., Verheij H. M., Haas G. H., Wenzig E., Gotz F., *Biochemistry*, **1989**, *28*, 9279-9285.
- Van Rantwijk F., Madeira-Lau R., Sheldon R. A., *Trends Biotechnol.*, **2003**, *21*, 131-138.
- Van Tol J. B. A., Jongejan J. A., Duine J. A., *Biocatal. Biotransform.*, **1995**, *12*, 99-117.
- Van Unen D. J., Engbersen J. F. J., Reinhoudt D. N., *Biotechnol. Bioeng.*, **2002**, *77*, 248-255.
- Verger R., *Tibtech*, **1997**, *15*, 32-38.
- Villeneuve P., Muderhwa J. M., Graille J., Hass M. J., *J. Molec. Cat. B: Enzymatic*, **2000**, *9*, 113-148.
- Villeneuve P., Pina M., Montet D., Graille J., *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **1995**, *72*, 753-755.
- Wambolt C. L., Saavedra S. S., *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **1996**, *7*, 53-57.
- Wasserscheid P., Keim W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2000**, *39*, 3772-3789.
- Wasserscheid P., Welton T., *Ionic Liquids in Synthesis*, **2003**, Editura Wiley-VCH, Weinheim.
- Wehjte E., Adlercreutz P., Mattiasson B., *Biotechnol. Bioeng.*, **1992**, *41*, 171-.
- Wei Y., Schottel J. L., Derewenda U., Swenson L., Patkar S., Derewenda Z. S., *Nat. Struct. Biol.*, **1995**, *2*, 218-223.
- Wei Y., Xu J., Feng Q., Dong H., Lin M., *Mat. Lett.*, **2000**, *44*, 6-11.
- Wells M. A., *Biochemistry*, **1974**, *13*, 2248-2257.
- Welton T., *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2071-2083.
- Winkler F. K., D'Arcy A., Hunziker W., *Nature*, **1990**, *343*, 771-774.
- Wu J. C., Lee S. S., Mahmood M. M. B., Chow Y., Talukder M. M. R., Choi W. J., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2007**, *45*, 108-112.
- Wu S., Lin J., Chan S. I., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **1994**, *47*, 11-20.

- Yamamoto K., Nishioka T., Oda J., Yamamoto Y., *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 1717-1720.
- Yang Z., Pan W., *Enzyme Microb. Tech.*, **2005**, 37, 19-28.
- Yilmaz E., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **2003**, 19, 161-165.
- Zarcuła C.**, Corîci L., Croitoru R., Csunderlik C., Péter F., Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology, **2009^a**, 40, în curs de publicare.
- Zarcuła C.**, Corîci L., Croitoru R., Csunderlik C., Péter F., *The 9th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations*, Berna, **2009^b**, în curs de publicare.
- Zarcuła C.**, Corîci L., Croitoru R., Péter F., *Annals of West University of Timisoara*, **2008^a**, Series of Chemistry 17 (3), 61-66.
- Zarcuła C.**, Corîci L., Croitoru R., Péter F., *Annals of West University of Timisoara*, **2007**, Series of Chemistry 16 (4), 107-112.
- Zarcuła C.**, Croitoru R., Csunderlik C., Péter F., *International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, Timișoara, **2008^b**, P310.
- Zarcuła C.**, Croitoru R., Csunderlik C., Péter F., *The 2nd International Conference „Biocatalysis in Non-Conventional Media”*, Moscova, **2008^c**, 9.
- Zarcuła C.**, Croitoru R., Csunderlik C., Péter F., *The 4th International Congress on Biocatalysis 2008*, Hamburg, **2008^d**, P171, 293-294.
- Zarcuła C.**, Croitoru R., Csunderlik C., Péter F., *The XXXth Romanian Chemistry Conference*, Calimănești-Căciulata, **2008^e**, P.S.I. 28, 64.
- Zarcuła C.**, Croitoru R., Fițișău F., Kakasi-Zsurka S., Péter F., *International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, Timișoara, **2008^f**, P309.
- Zarcuła C.**, Kiss C., Corîci L., Croitoru R., Csunderlik C., Péter F., *Revista de Chimie*, **2009^e**, în curs de publicare.
- Zarcuła C.**, Péter F., *The 12th International Symposium for Students in Chemistry*, Timișoara, **2007**, 19.
- Zhao H., Malhotra S. V., *Biotechnol Lett.*, **2002**, 24, 1257-1260.
- Zhou Y., Schattka J. H., Antonietti M., *Nano Lett.*, **2004**, 4, 477-481.
- Zhu K., Požgan F., D'Souza L., Richards R. M., *Microporous Mesoporous Mater.*, **2006**, 91, 40.

ANEXĂ

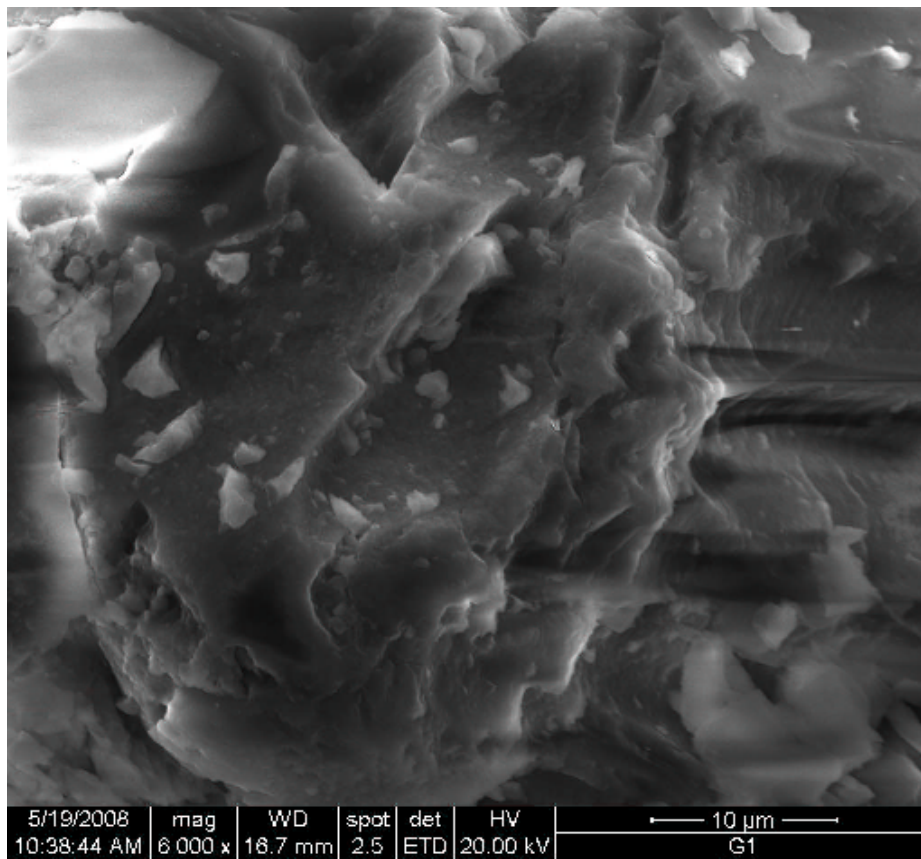


Figura 1. Imaginea SEM a sol-gelului martor obținut din precursorii MeTMOS/TMOS în raport molar de 1:1 (Metoda2).

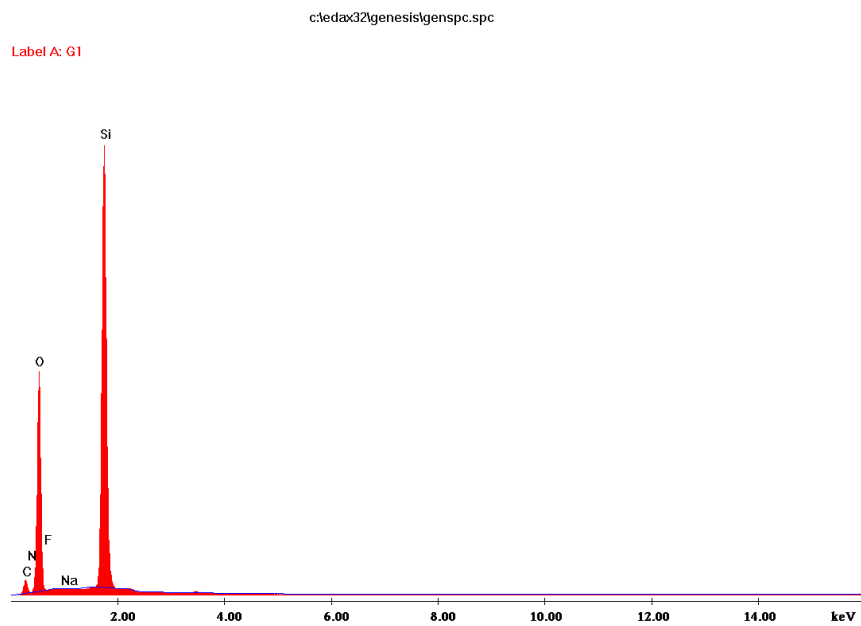


Figura 2. Spectrul EDX al sol-gelului martor obținut din precursorii MeTMOS/TMOS în raport molar de 1:1 (Metoda 2).

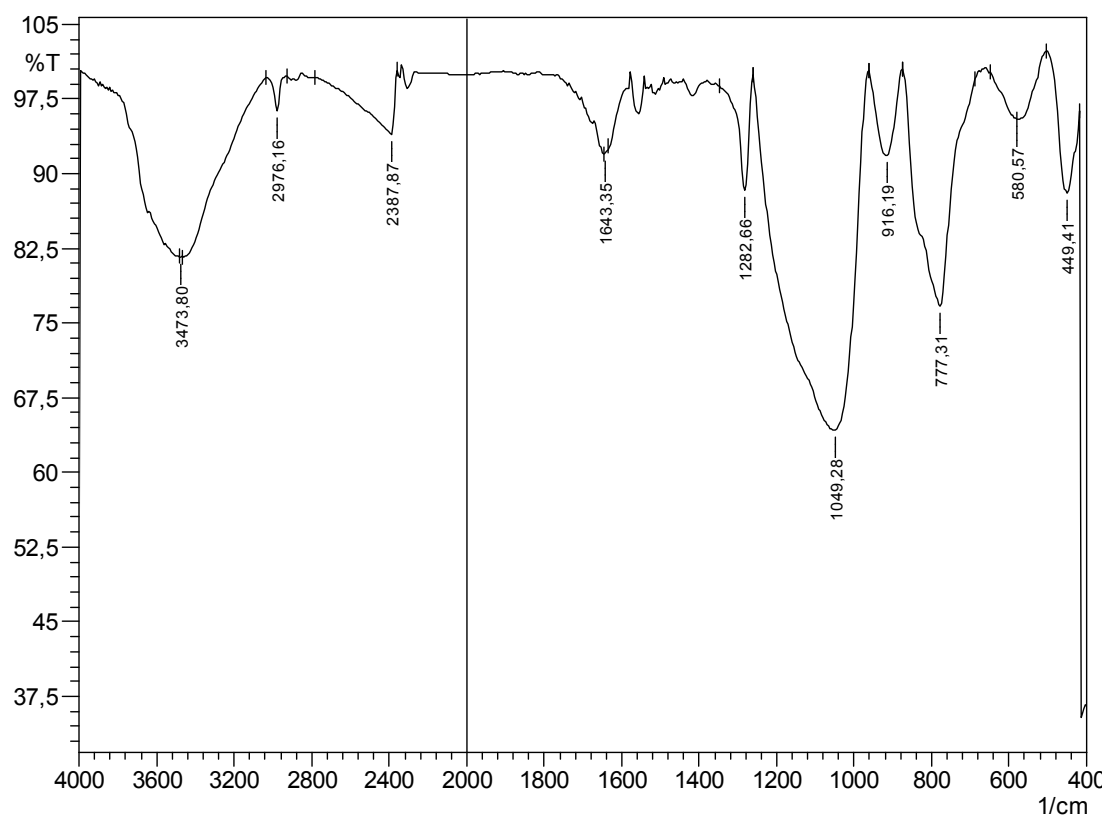


Figura 3. Spectrul IR al sol-gelului martor obținut din precursorii MeTMOS/TMOS în raport molar de 1:1 (Metoda 2).

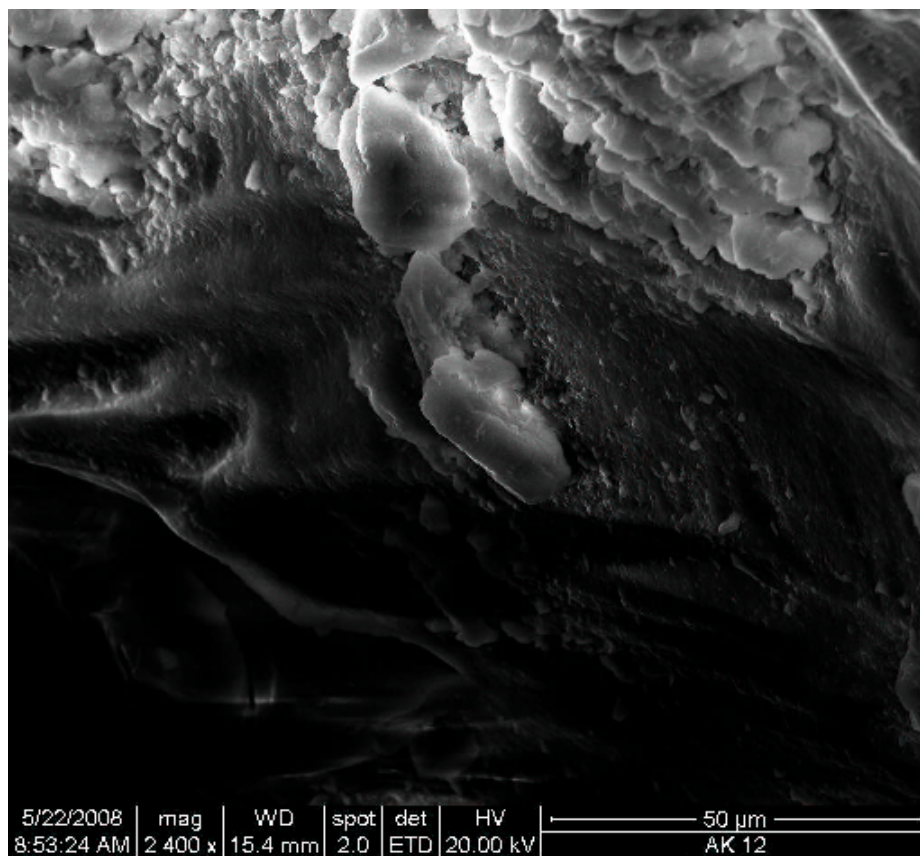


Figura 4. Imaginea SEM a preparatului AK₃.

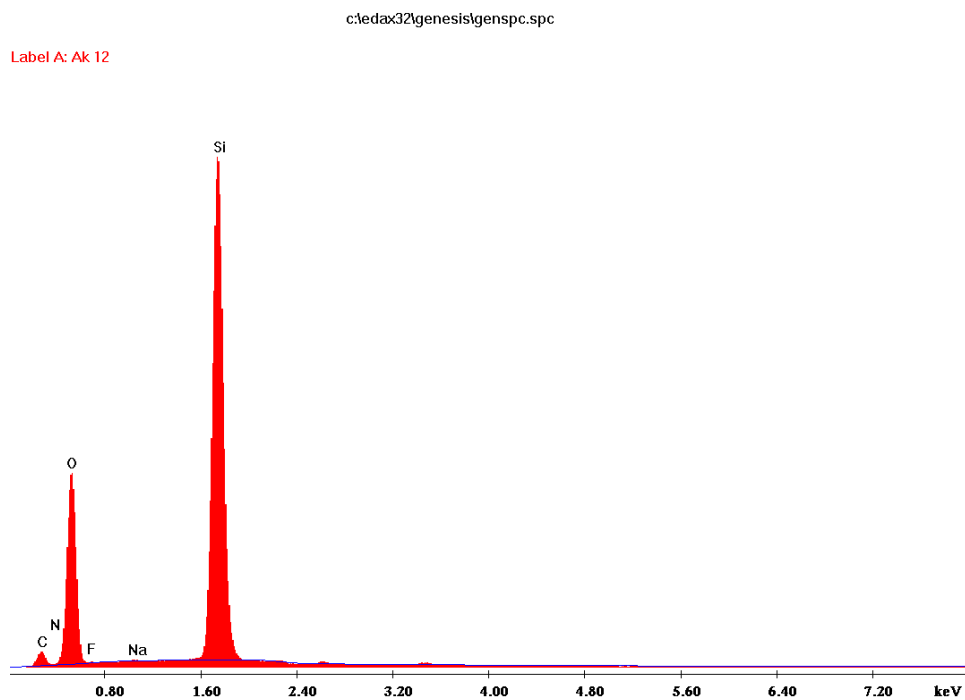


Figura 5. Spectrul EDX al preparatului AK₃.

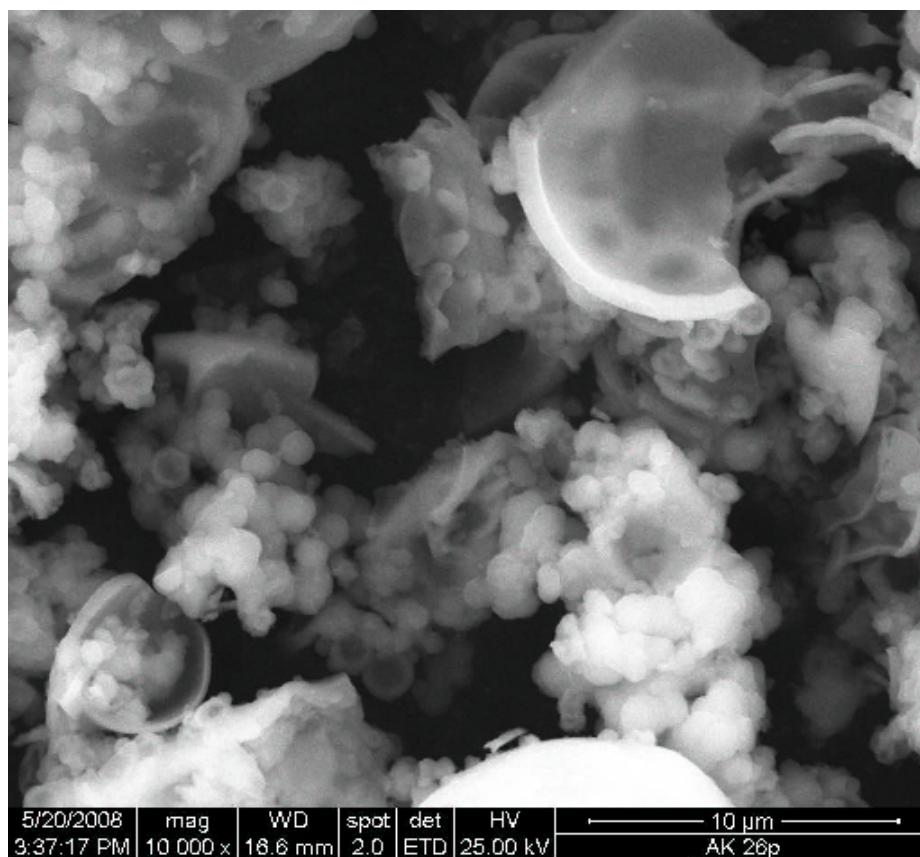


Figura 6. Imaginea SEM a preparatului AK₄₃.

c:\edax32\genesisgenspc.spc

Label A: Ak 26p

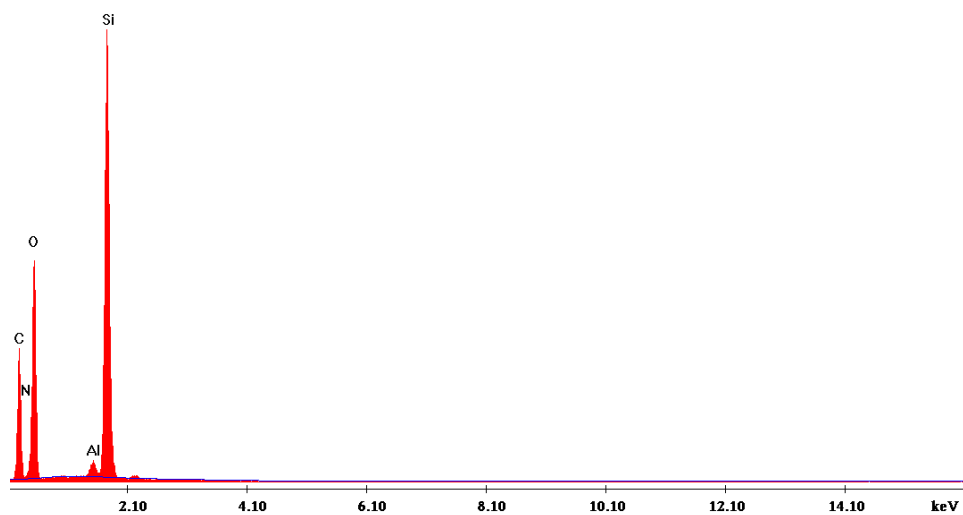


Figura 7. Spectrul EDX al preparatului AK₄₃.

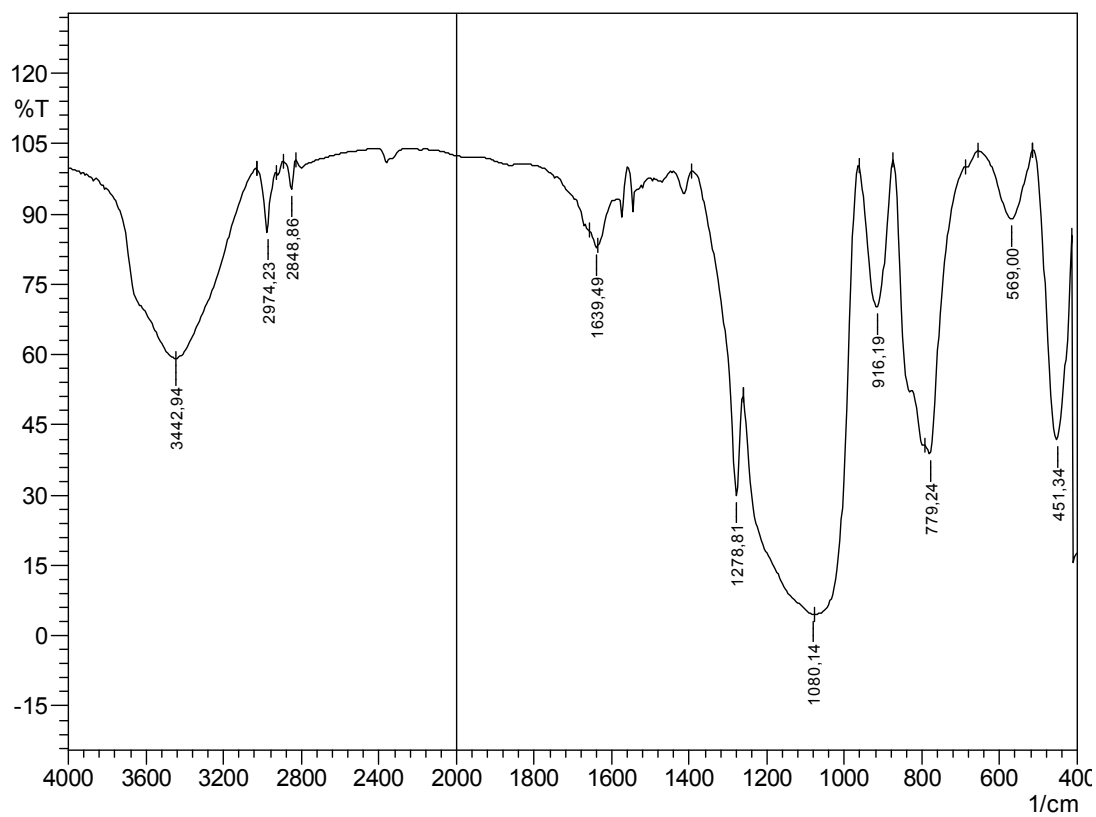


Figura 8. Spectrul IR al preparatului AK₄₃.

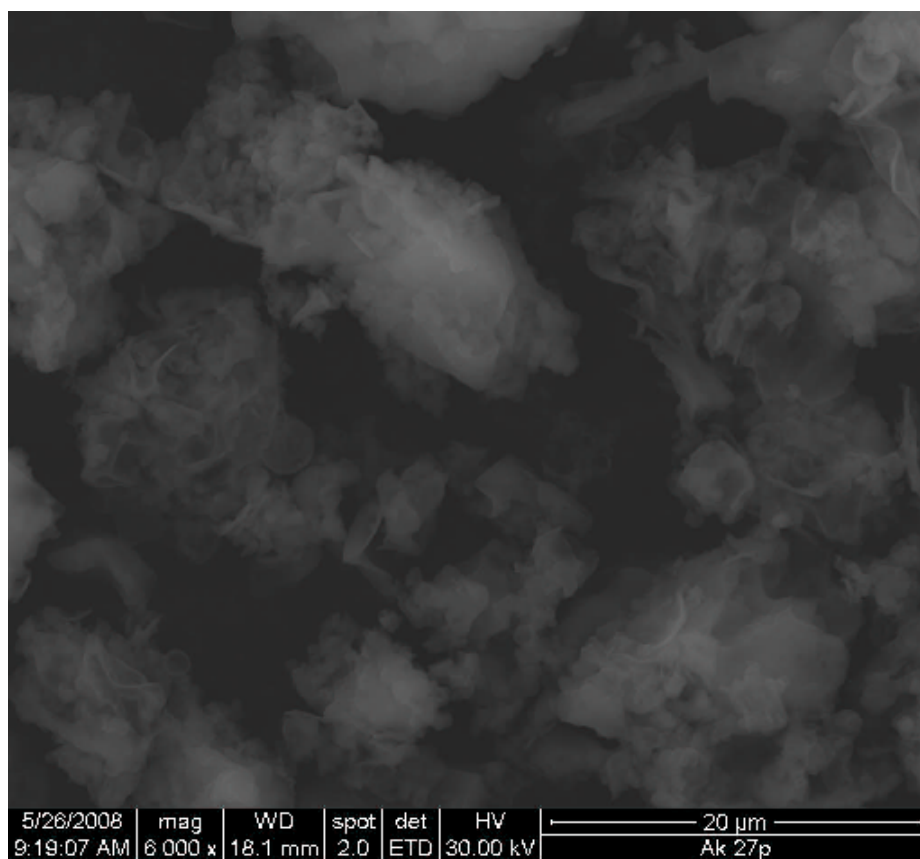


Figura 9. Imaginea SEM a preparatului AK₄₄.

c:\edax32\genesis\genspc.spc

Label A: Ak 27p

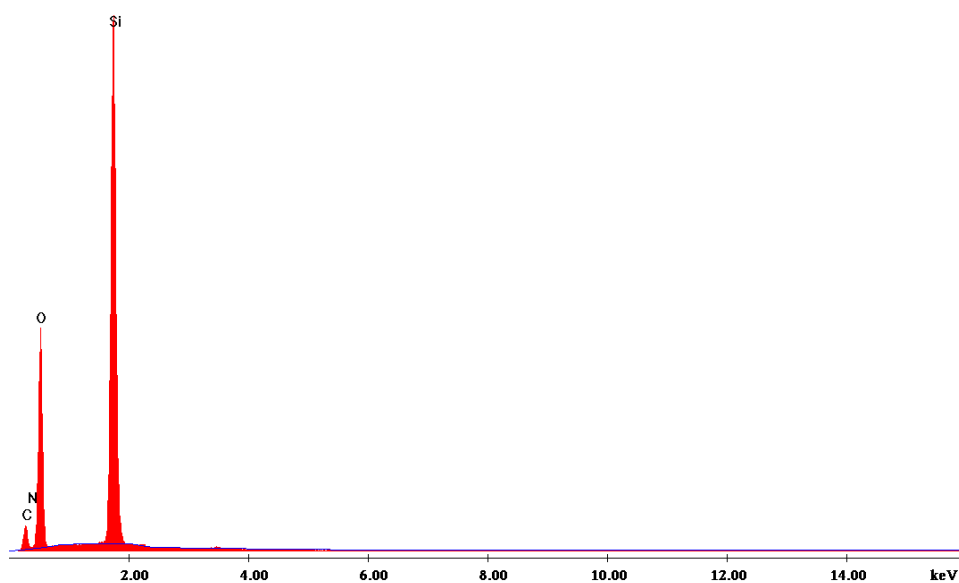


Figura 10. Spectrul EDX al preparatului AK₄₄.

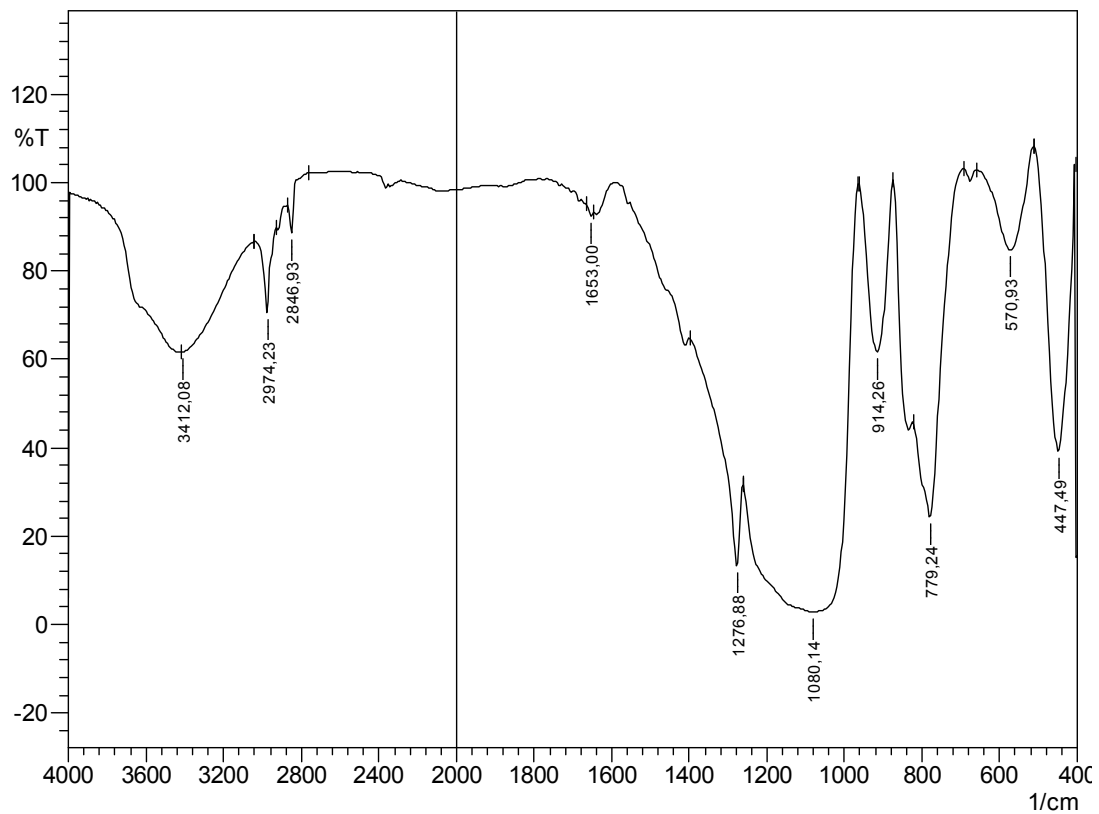


Figura 11. Spectrul IR al preparatului AK₄₄.

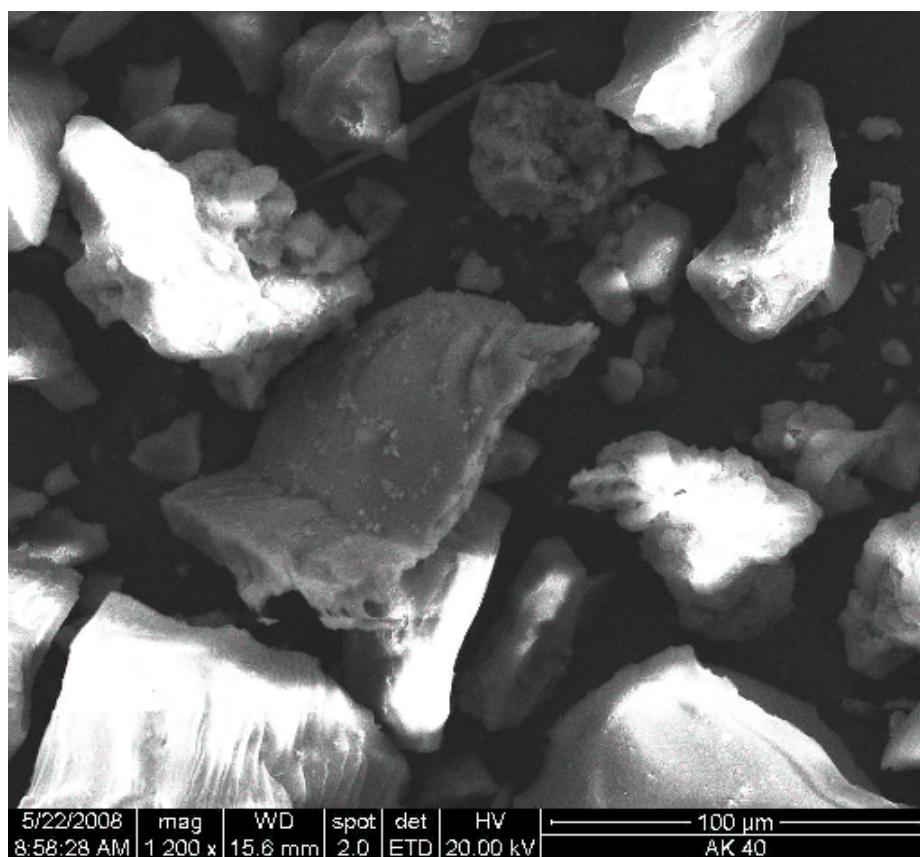


Figura 12. Imaginea SEM a preparatului AK₁₅.

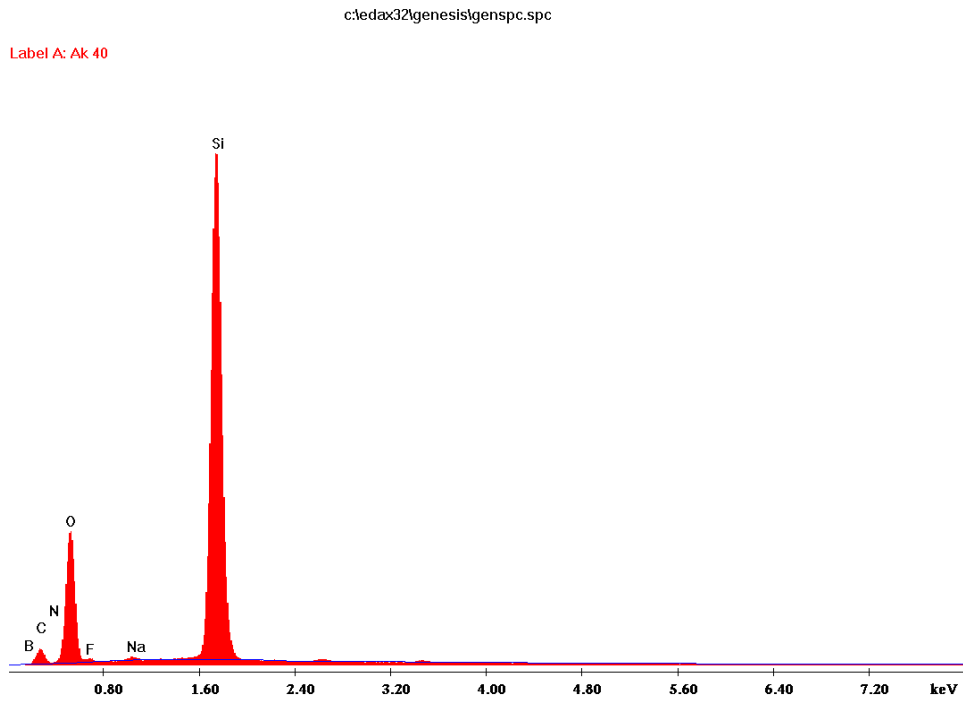


Figura 13. Spectrul EDX al preparatului AK₁₅.

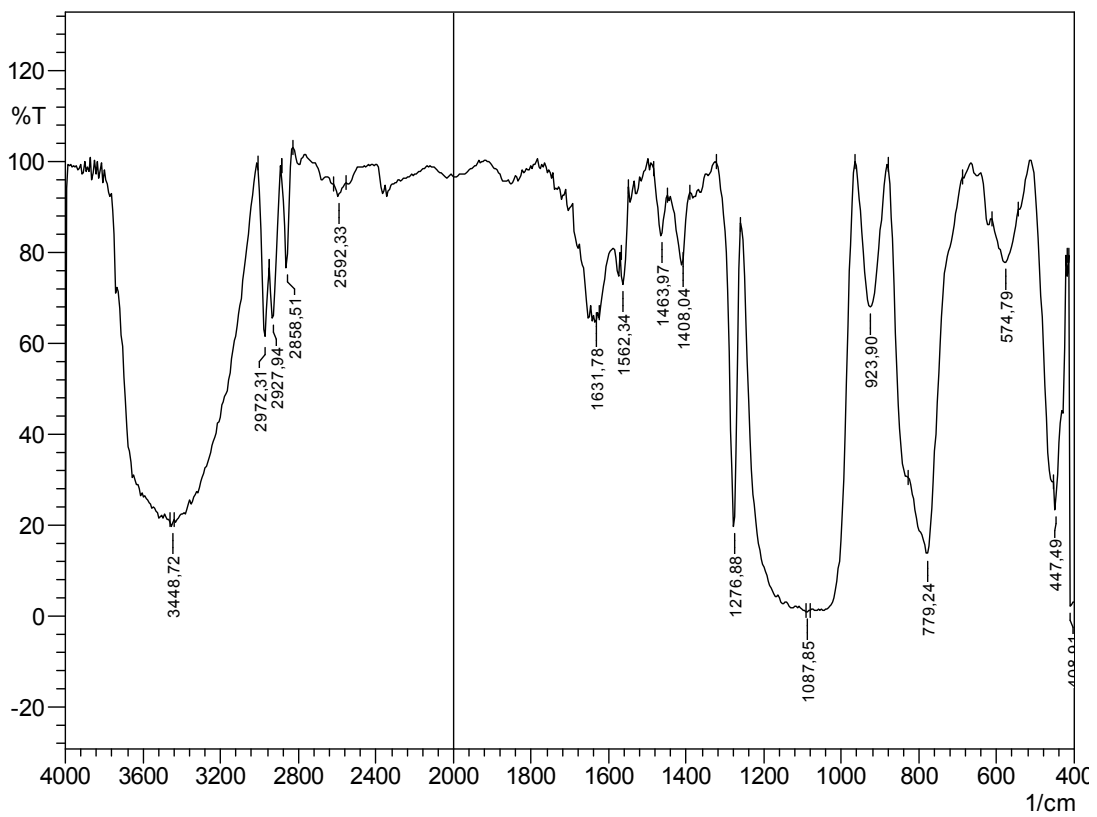


Figura 14. Spectrul IR al preparatului AK₁₅.

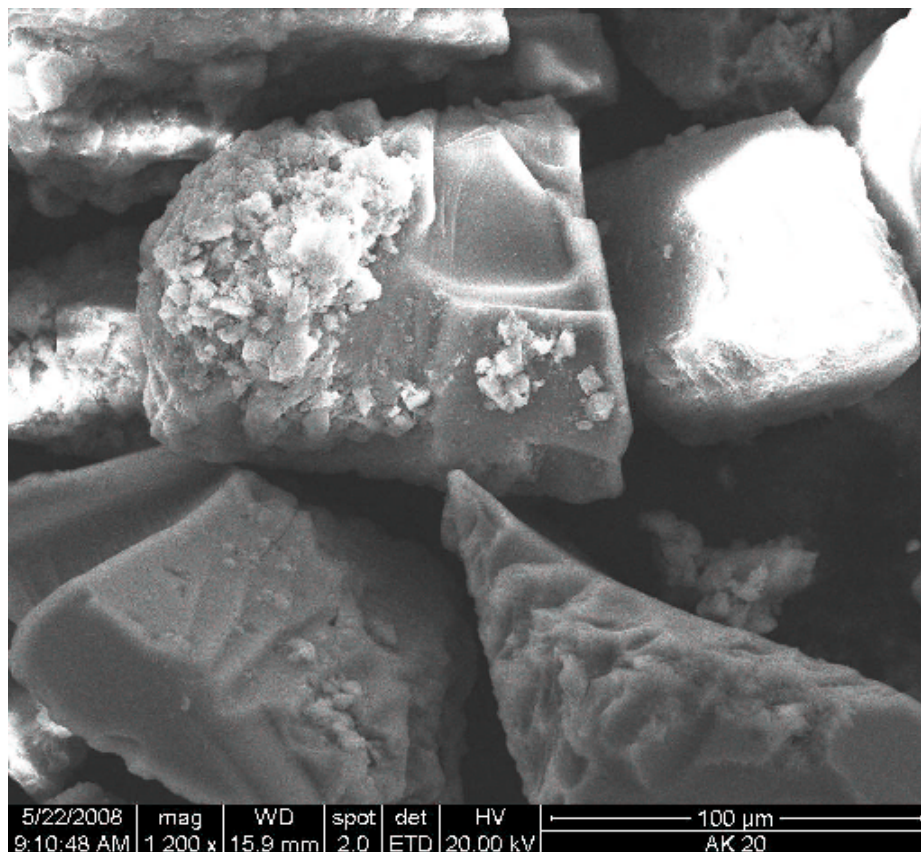


Figura 15. Imaginea SEM a preparatului AK₁₆.

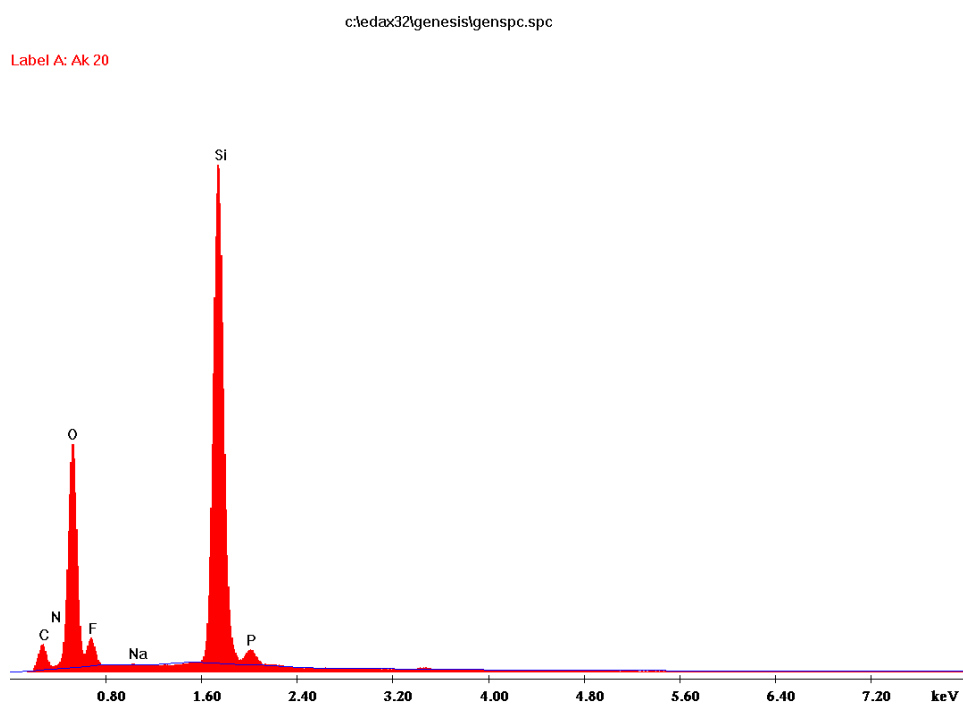


Figura 16. Spectrul EDX al preparatului AK₁₆.

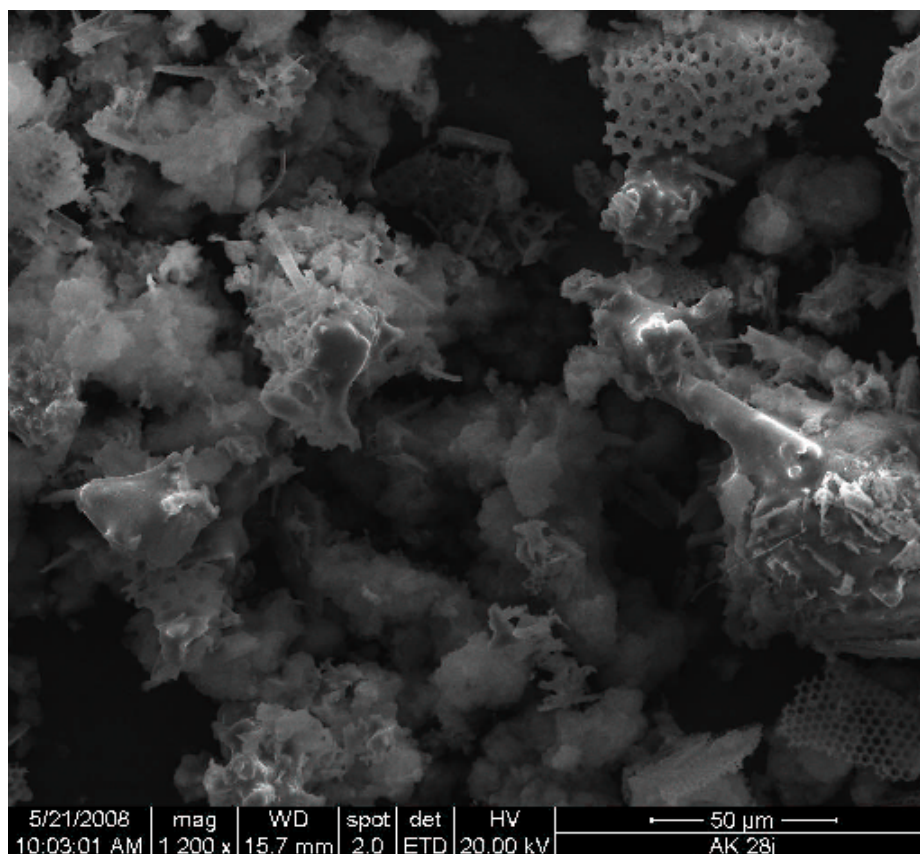


Figura 17. Imaginea SEM a preparatului AK₅₄.

c:\edax32\genesis\genspc.spc

Label A: Ak 28j

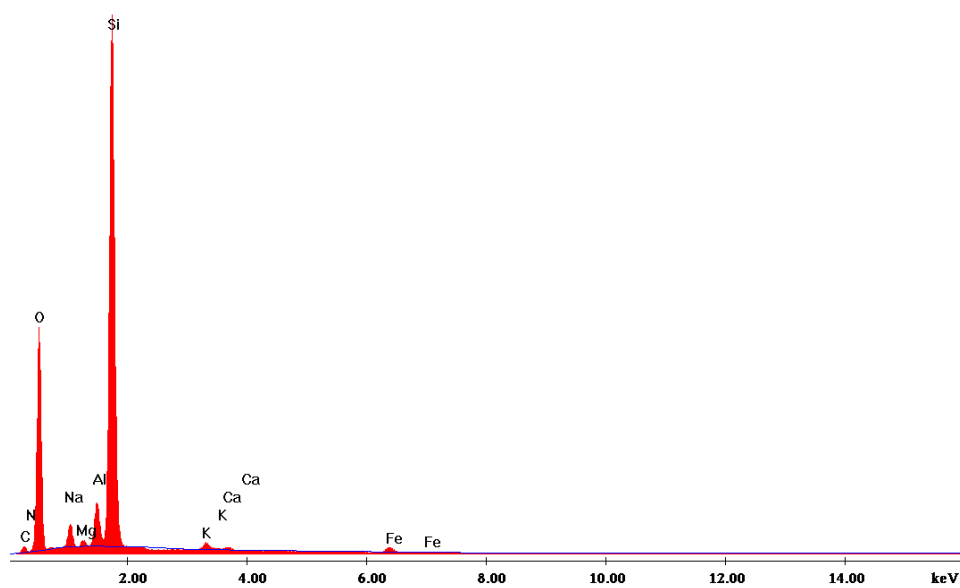


Figura 18. Spectrul EDX al preparatului AK₅₄.

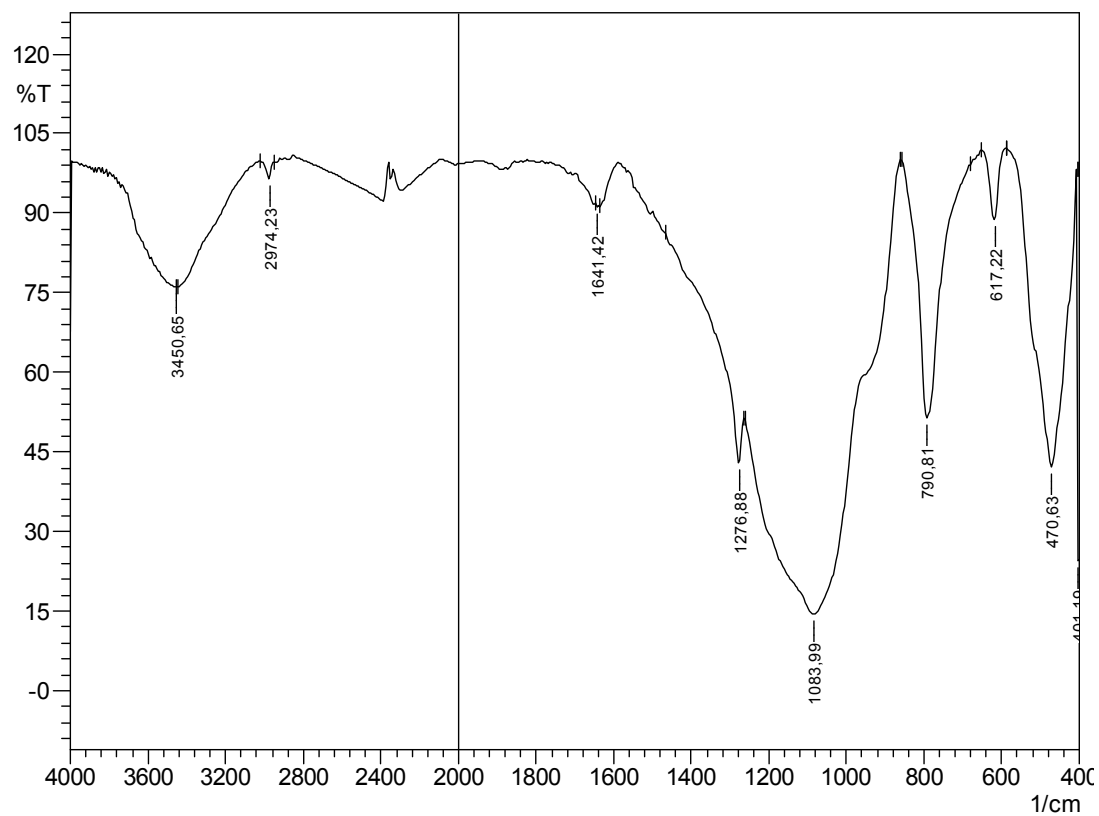


Figura 19. Spectrul IR al preparatului AK₅₄.

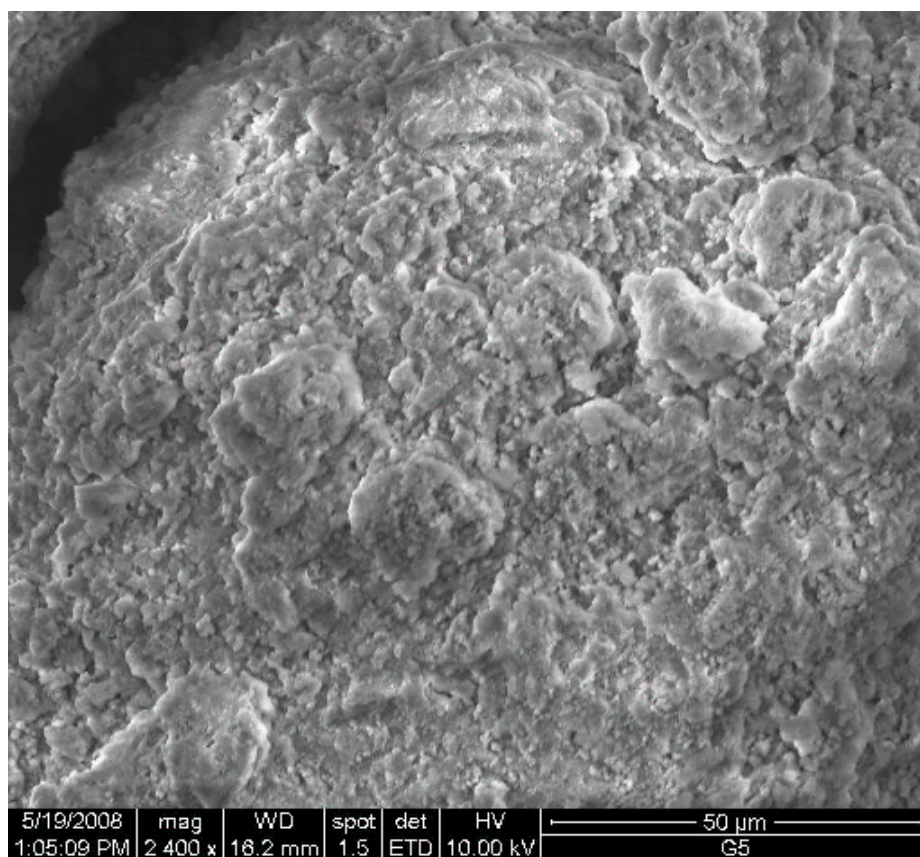


Figura 20. Imaginea SEM a sol-gelului martor obținut din precursorii PrTMOS/TMOS în raport molar de 1:1 (Metoda 2).

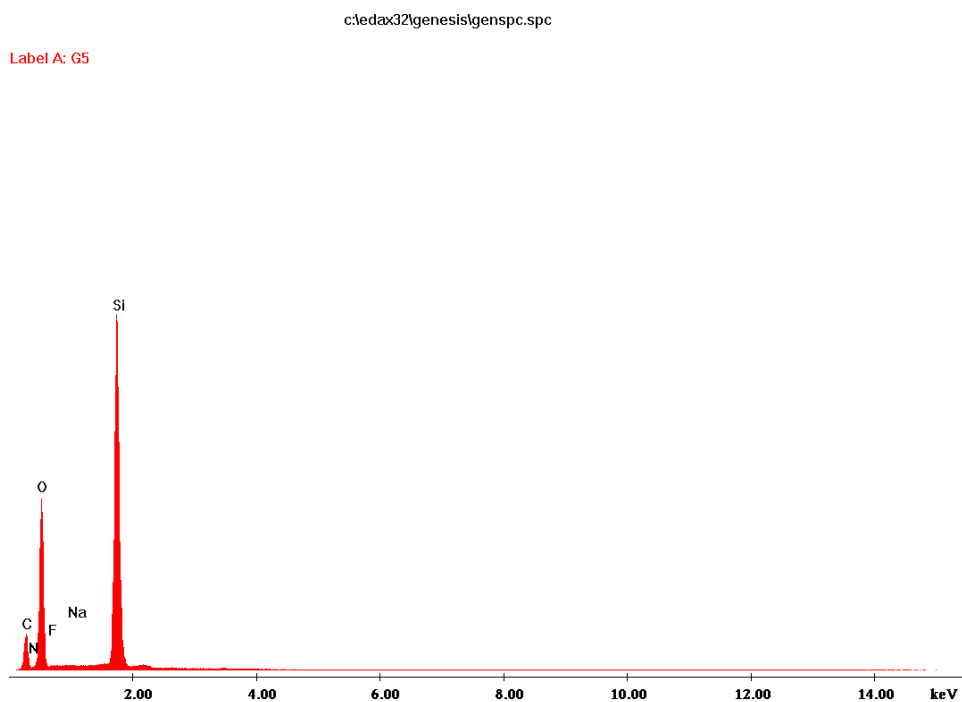


Figura 21. Spectrul EDX al sol-gelului martor obținut din precursorii PrTMOS/TMOS în raport molar de 1:1 (Metoda 2).

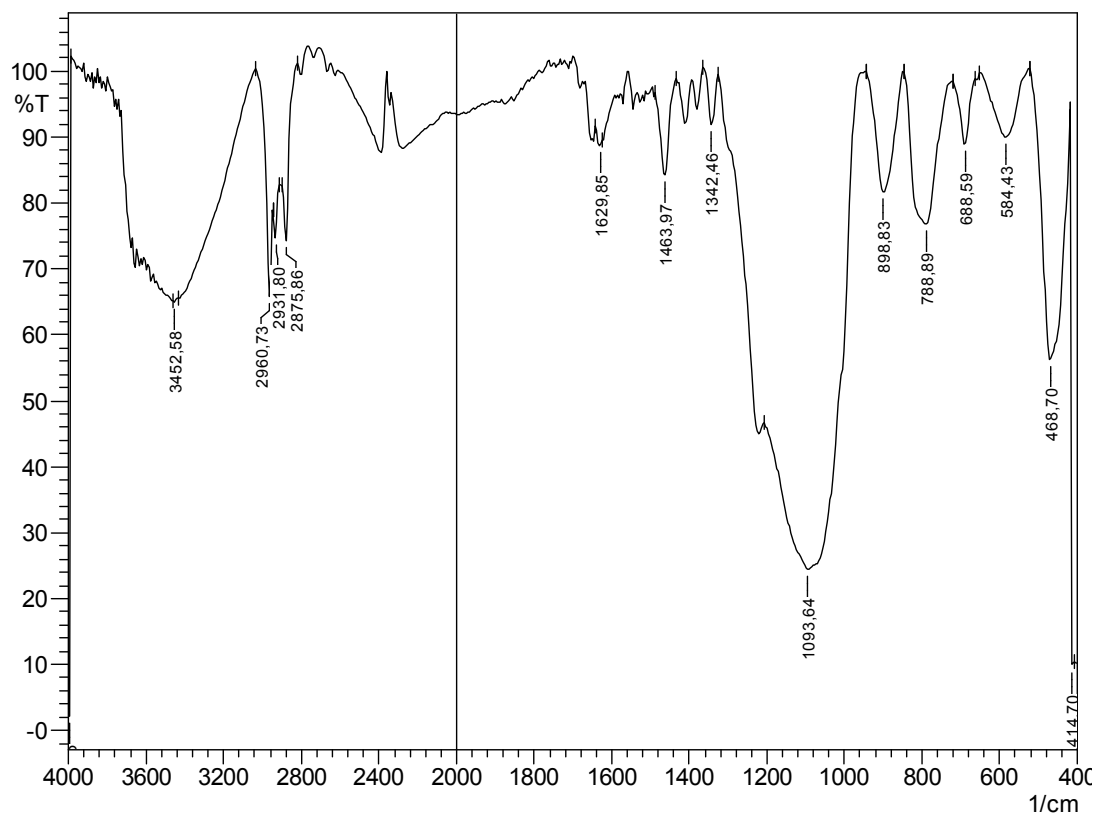


Figura 22. Spectrul IR al sol-gelului martor obținut din precursorii PrTMOS/TMOS în raport molar de 1:1 (Metoda 2).

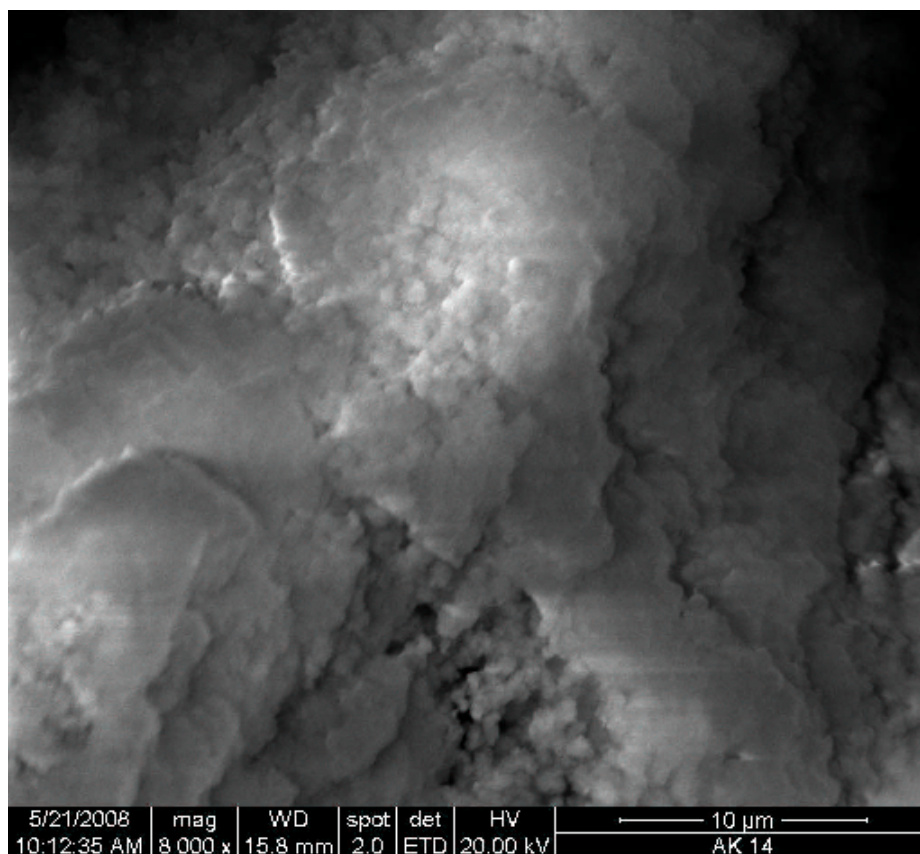


Figura 23. Imaginea SEM a preparatului AK₅.

c:\edax32\genesis\genspc.spc

Label A: Ak 14

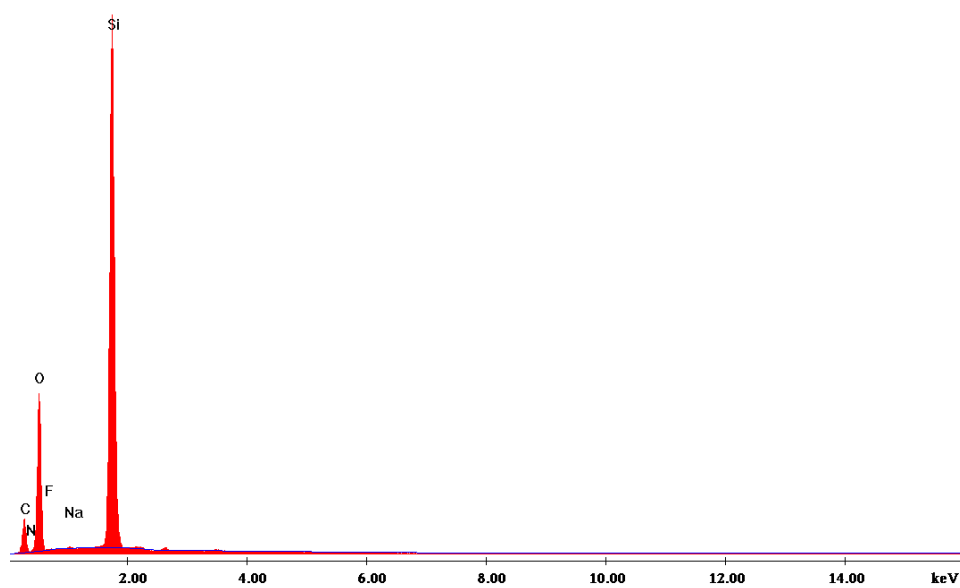


Figura 24. Spectrul EDX al preparatului AK₅.

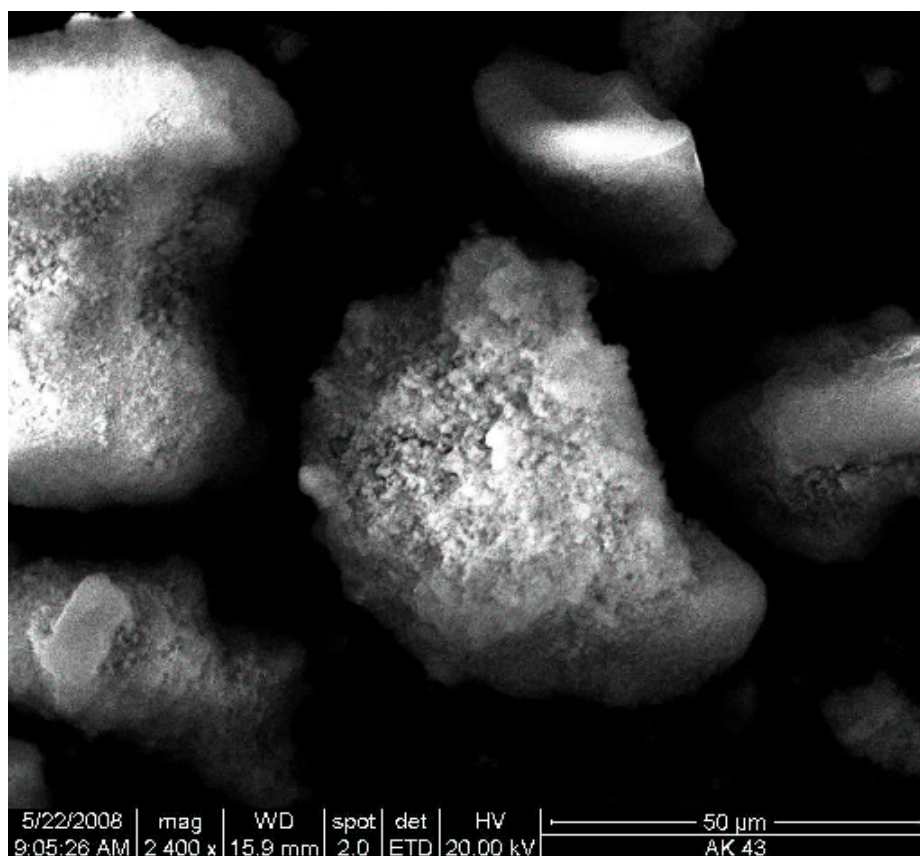


Figura 25. Imaginea SEM a preparatului AK₁₈.

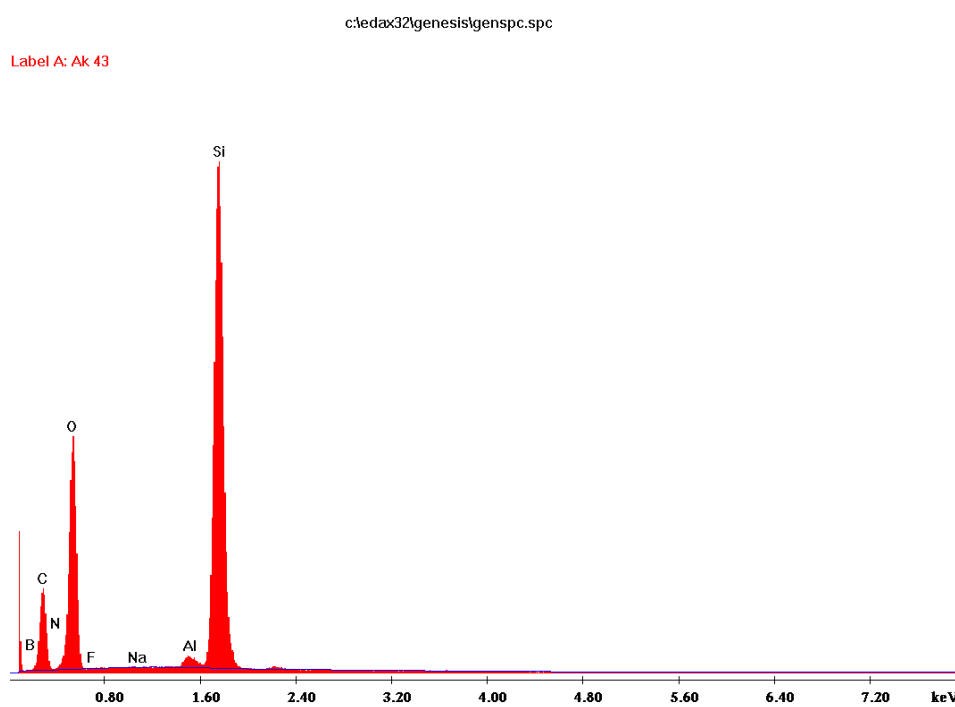


Figura 26. Spectrul EDX al preparatului AK₁₈.

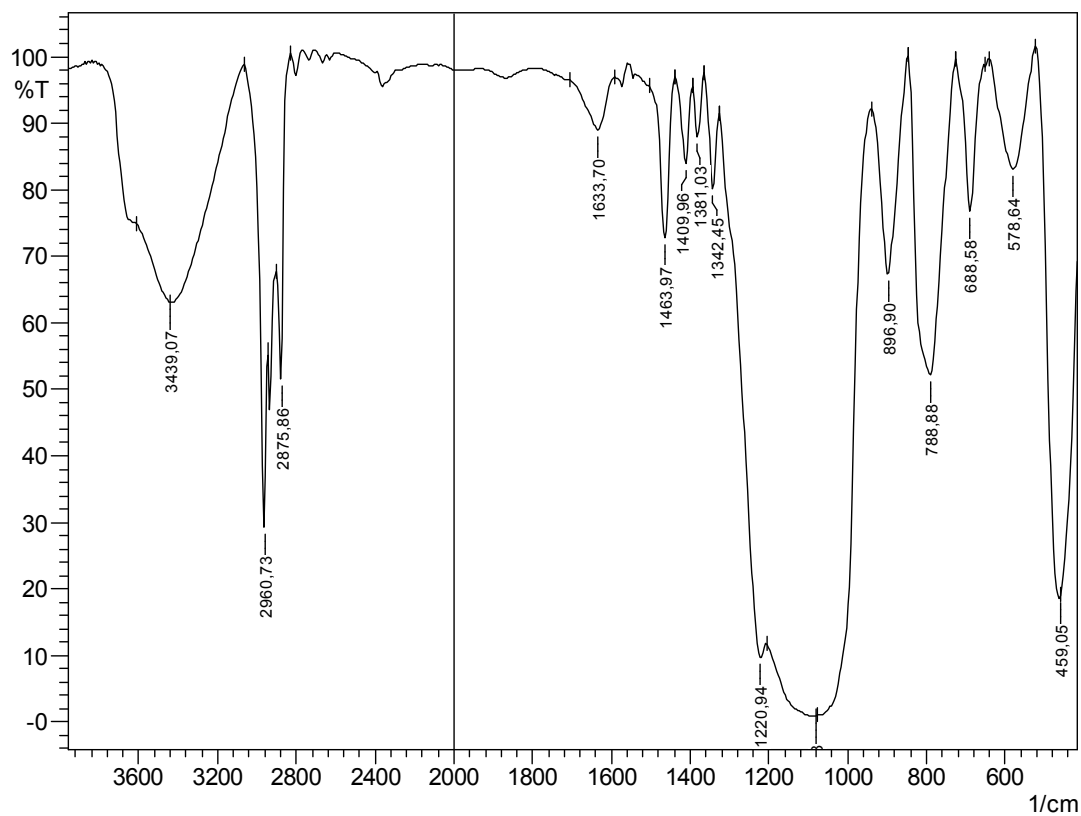


Figura 27. Spectrul IR al preparatului AK₁₈.

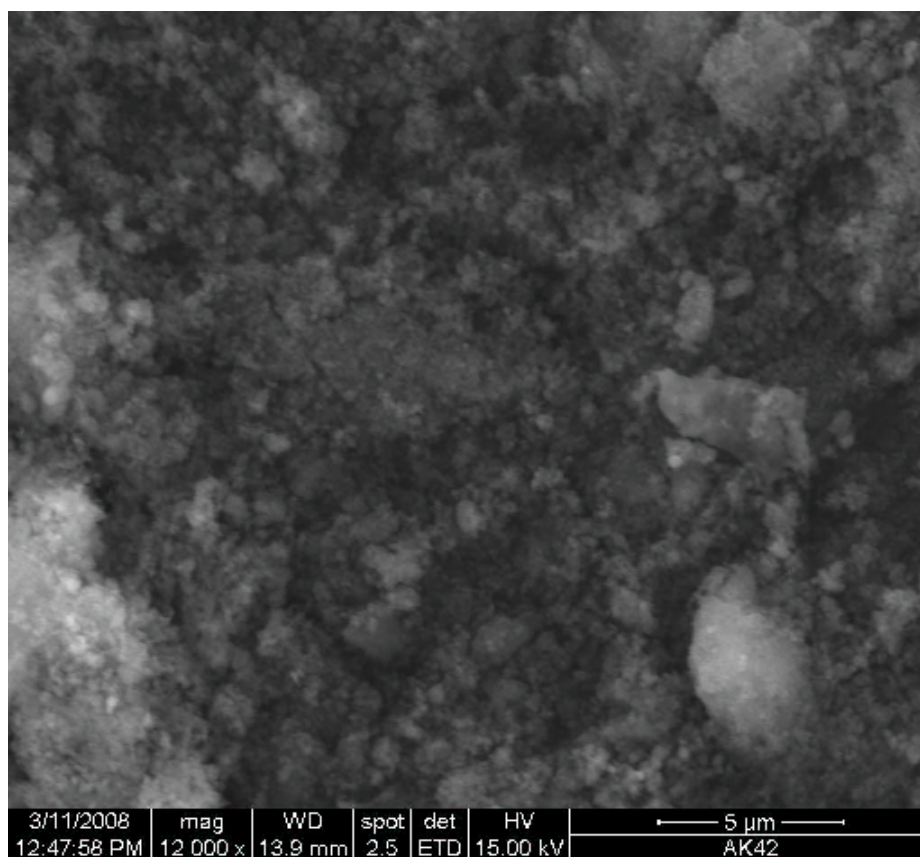


Figura 28. Imaginea SEM a preparatului AK₁₉.

c:\edax32\genesis\genspc.spc

Label A: AK42

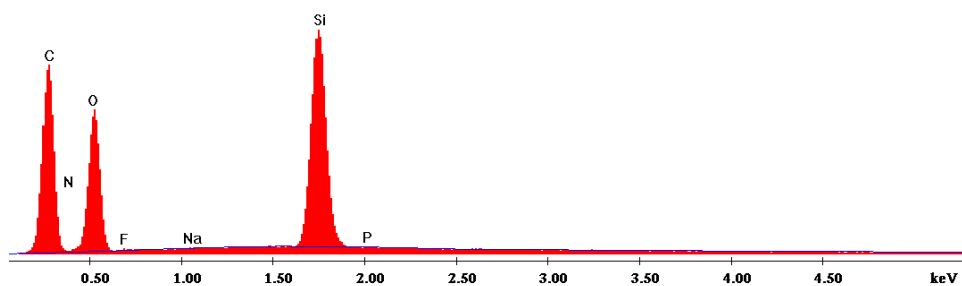


Figura 29. Spectrul EDX al preparatului AK₁₉.

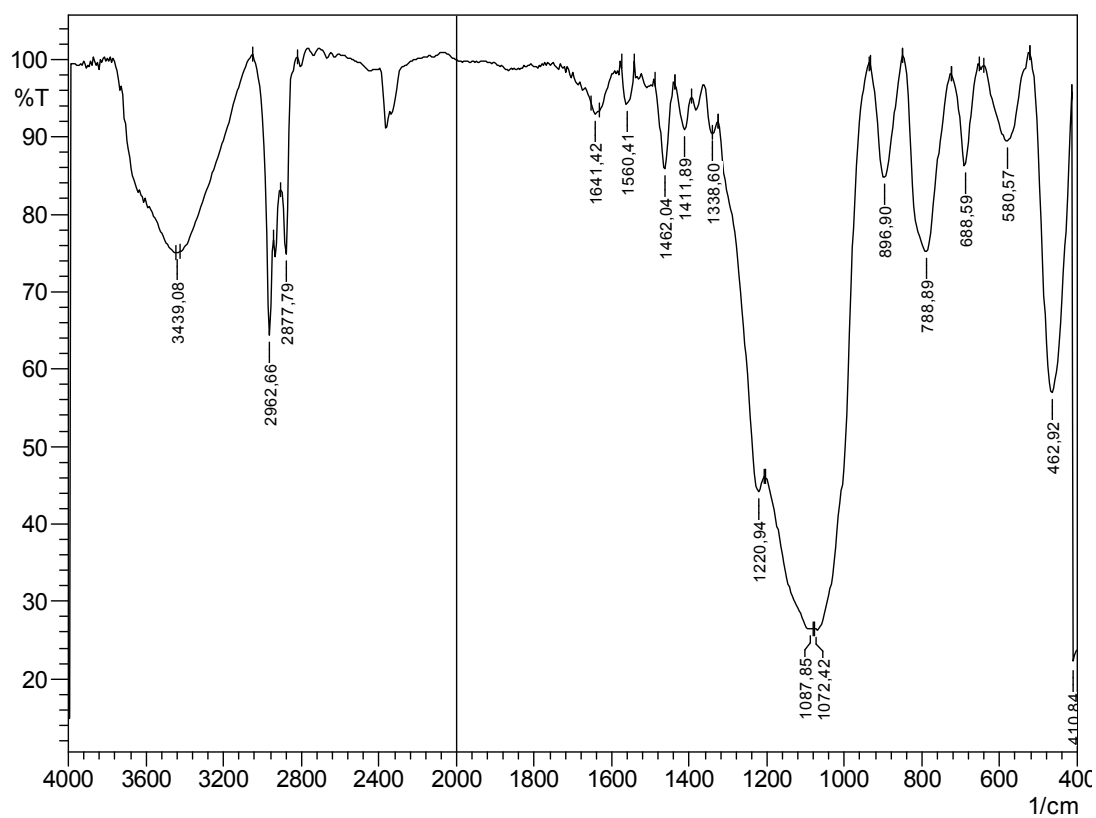


Figura 30. Spectrul IR al preparatului AK₁₉.

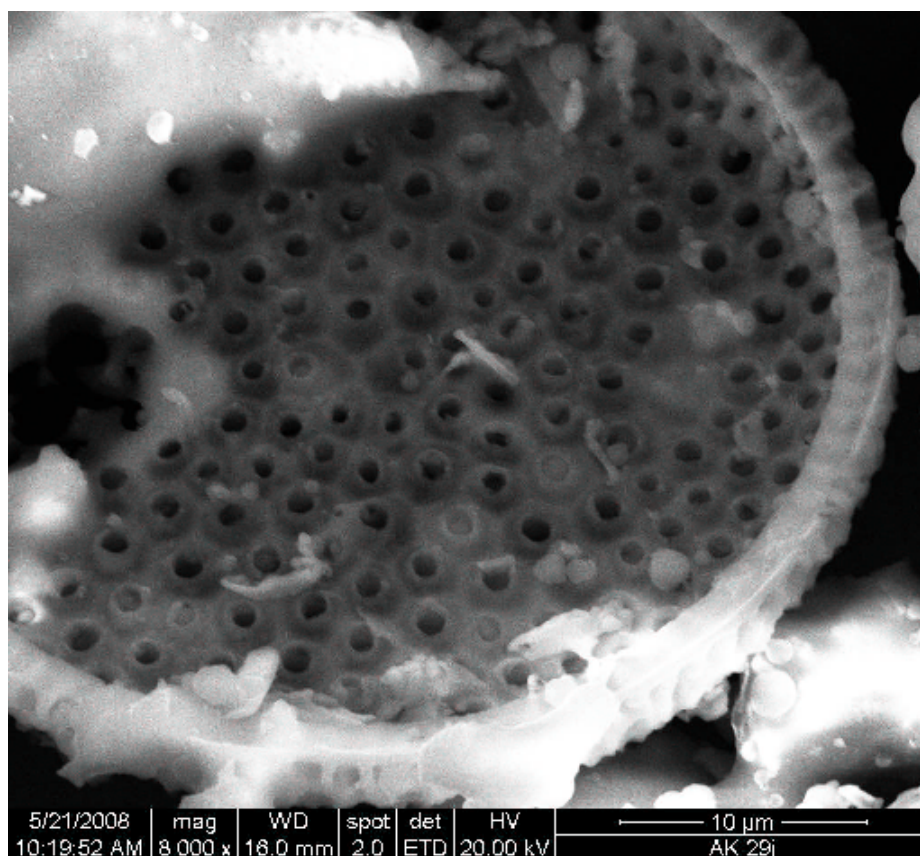


Figura 31. Imaginea SEM a preparatului AK₅₅.

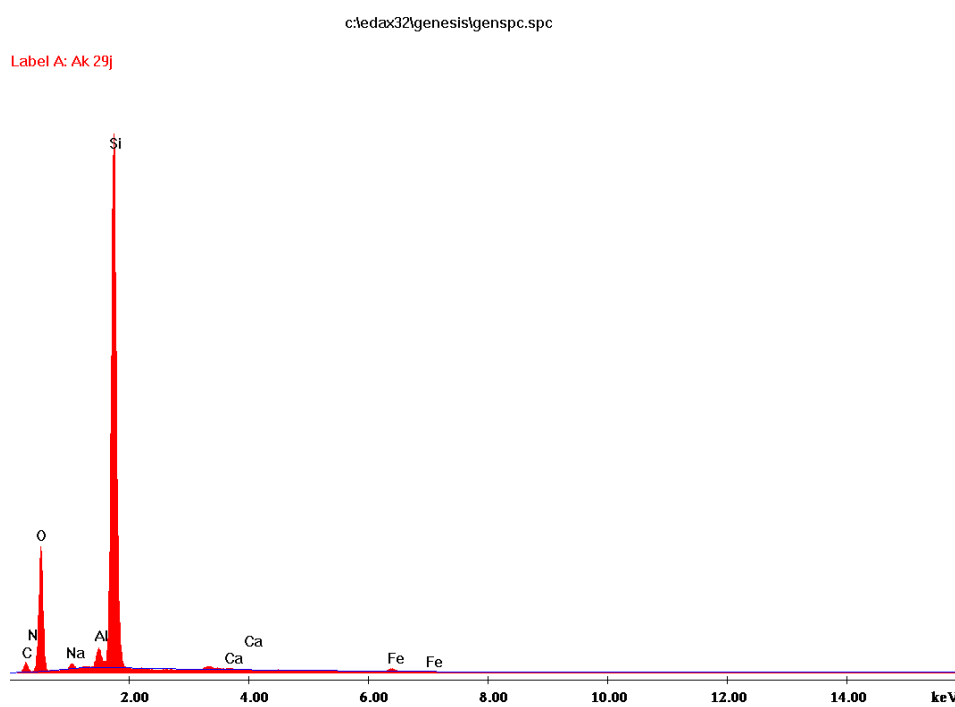


Figura 32. Spectrul EDX al preparatului AK₅₅.

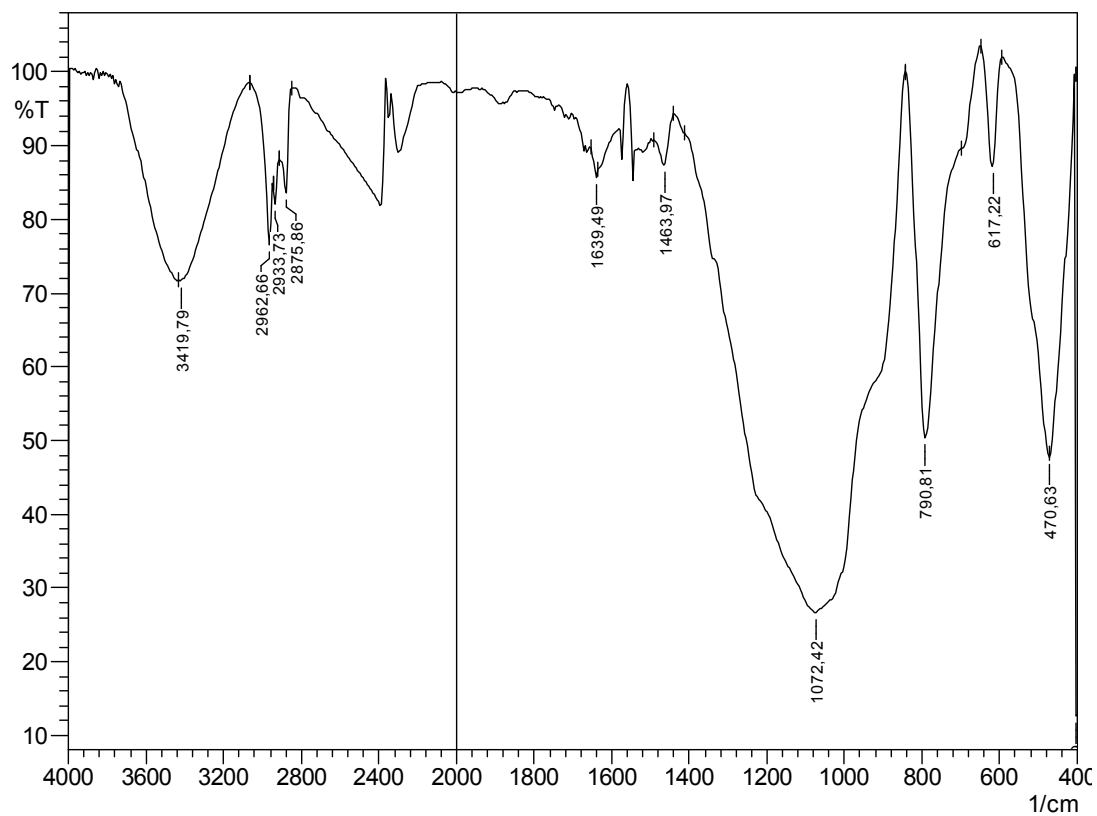


Figura 33. Spectrul IR al preparatului AK₅₅.

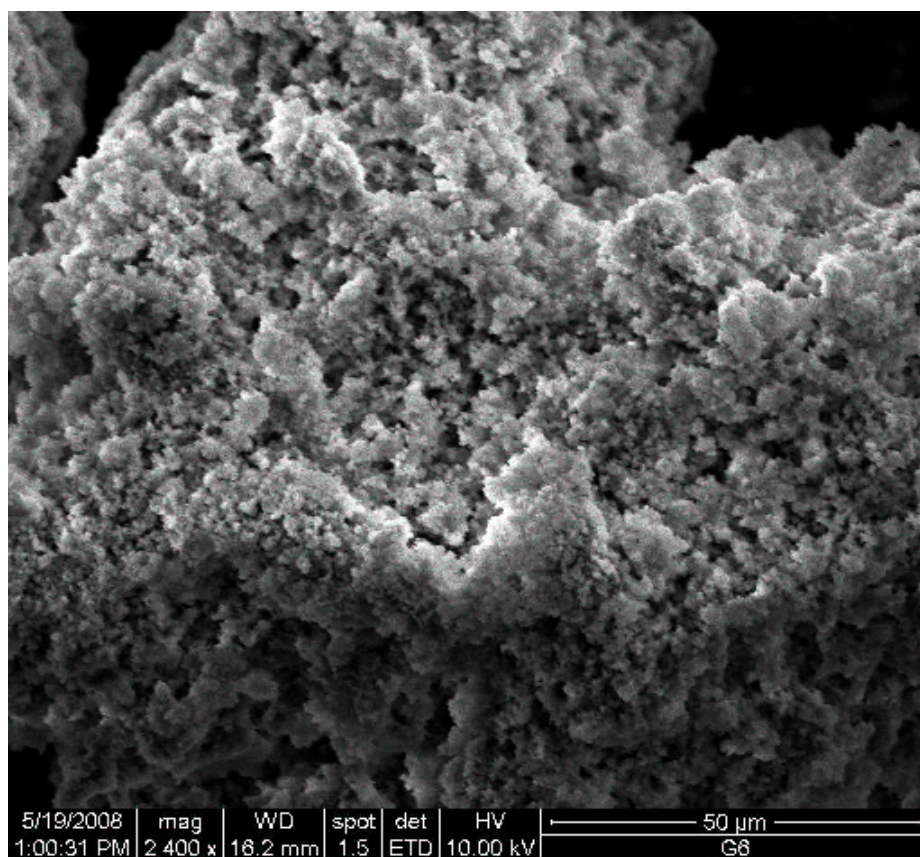


Figura 34. Imaginea SEM a sol-gelului martor obținut din precursorii OcTMOS/TMOS în raport molar de 1:1 (Metoda 2).

c:\edax32\genesis\genspc.spc

Label A: G6

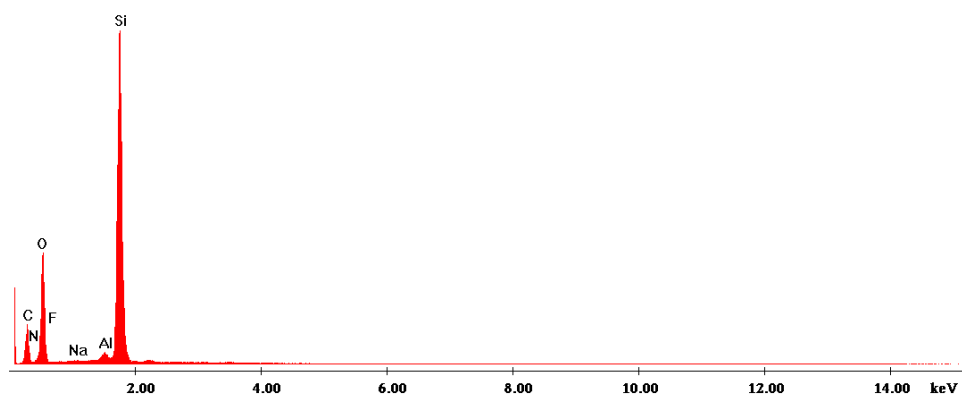


Figura 35. Spectrul EDX al sol-gelului martor obținut din precursorii OcTMOS/TMOS în raport molar de 1:1 (Metoda 2).

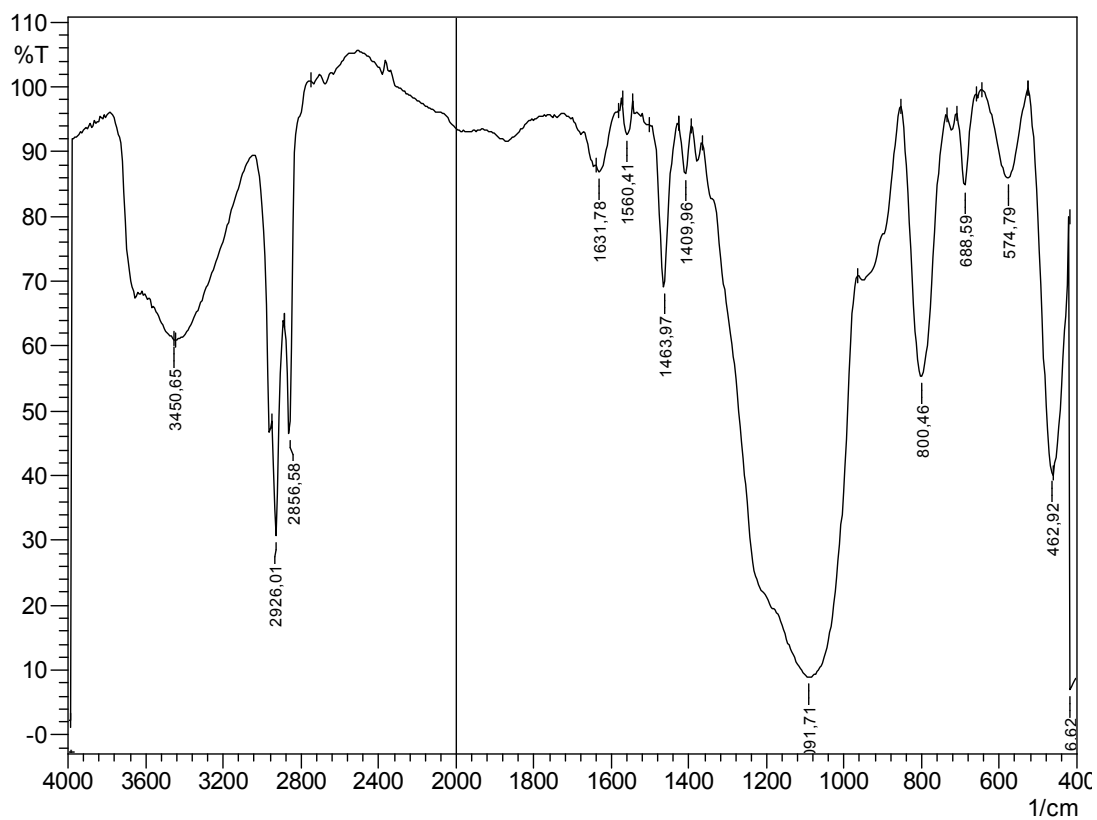


Figura 36. Spectrul IR al sol-gelului martor obținut din precursorii OcTMOS/TMOS în raport molar de 1:1 (Metoda 2).

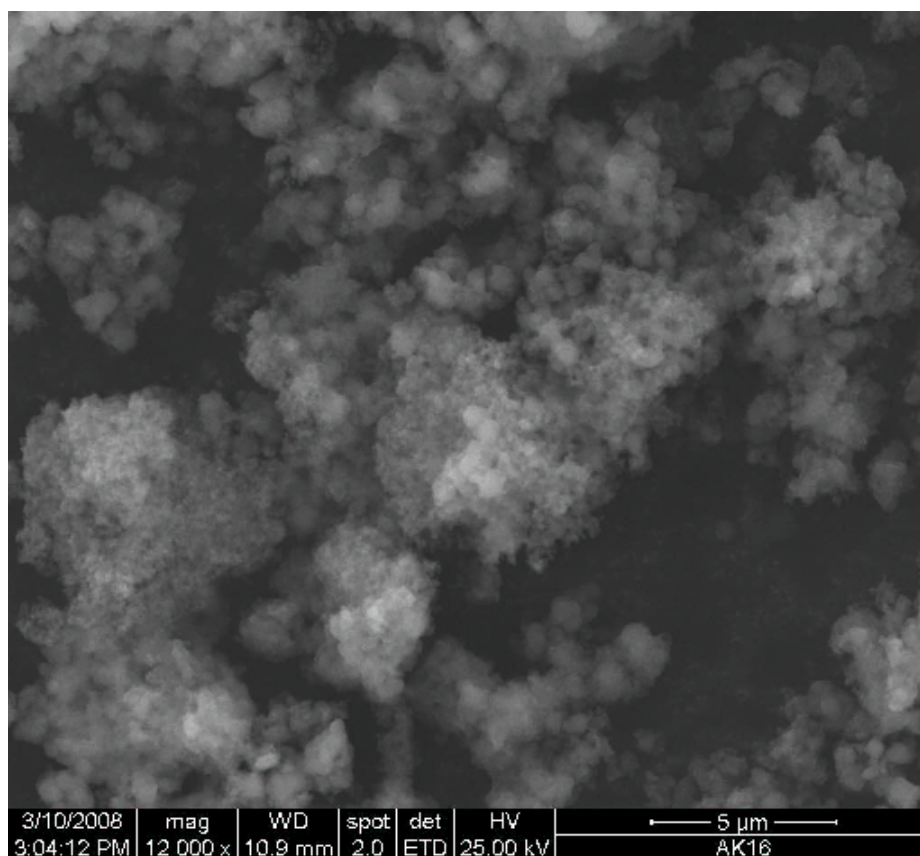


Figura 37. Imaginea SEM a preparatului AK₇.

c:\edax32\genesis\genspc.spc

Label A: Q 70 15-3

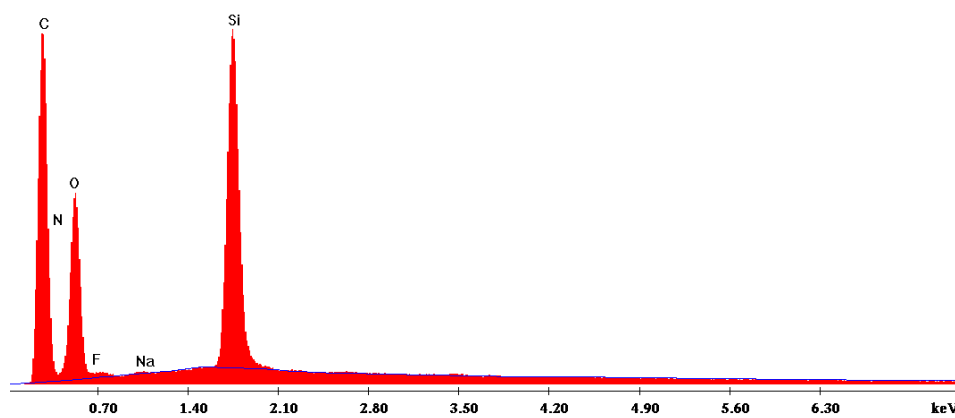


Figura 38. Spectrul EDX al preparatului AK₇.

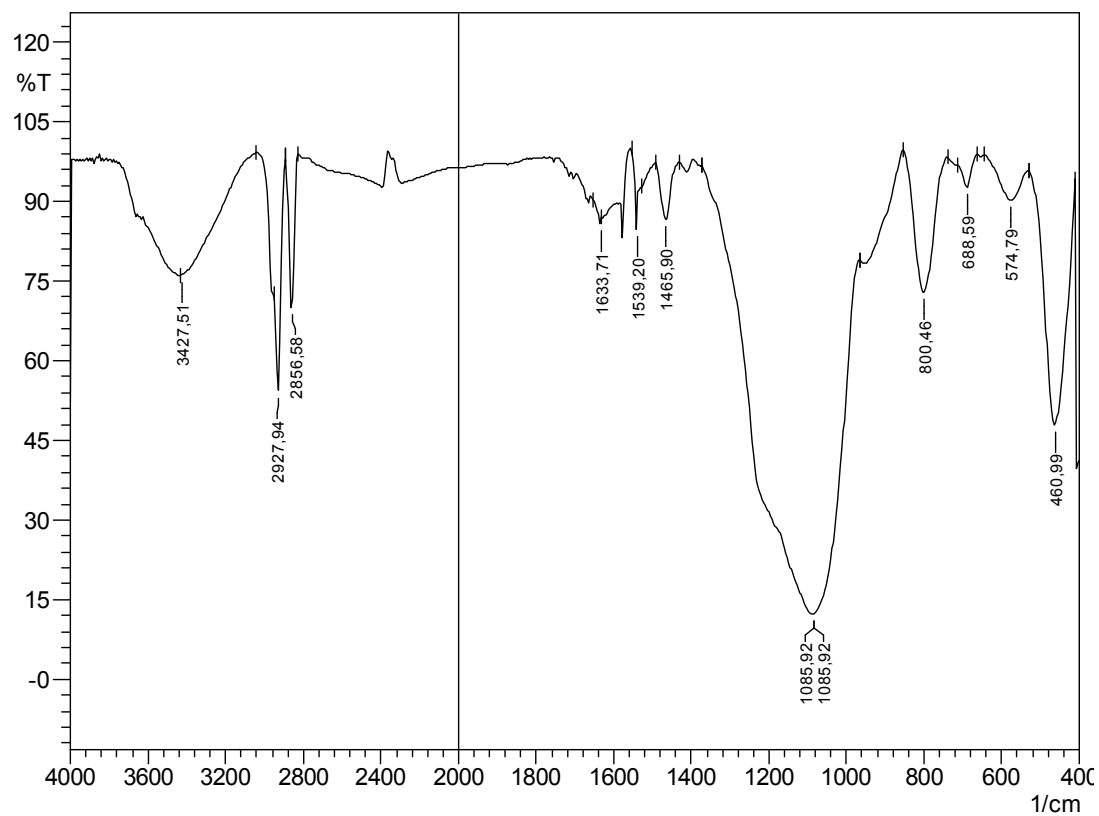


Figura 39. Spectrul IR al preparatului AK₇.

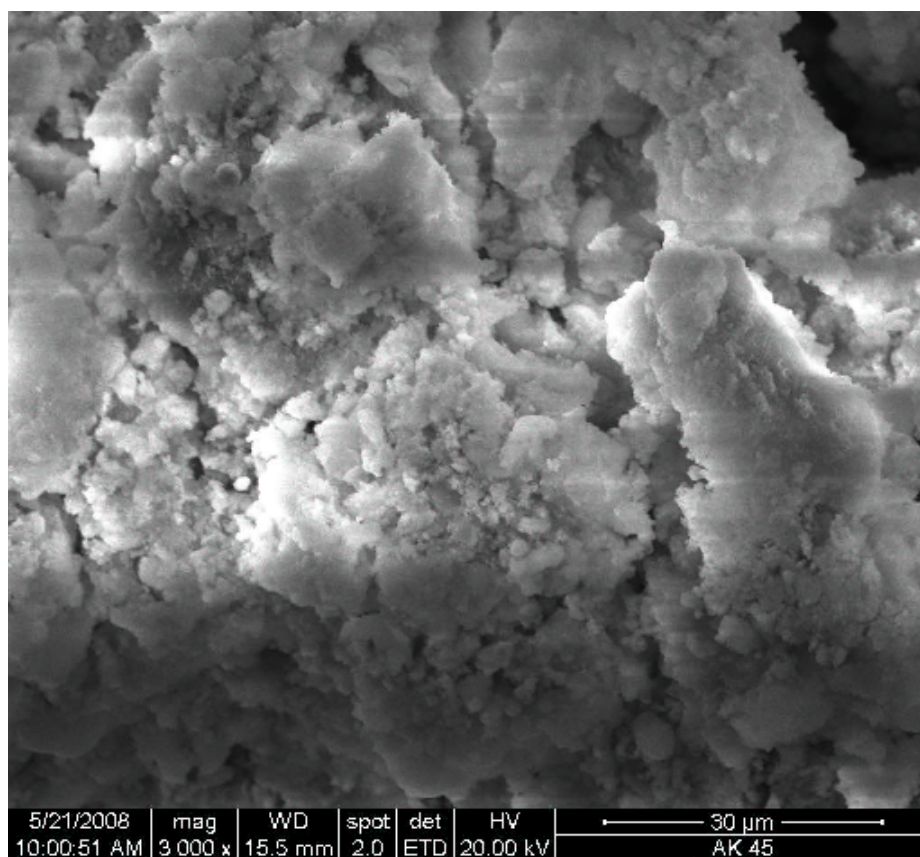


Figura 40. Imaginea SEM a preparatului AK₂₄.

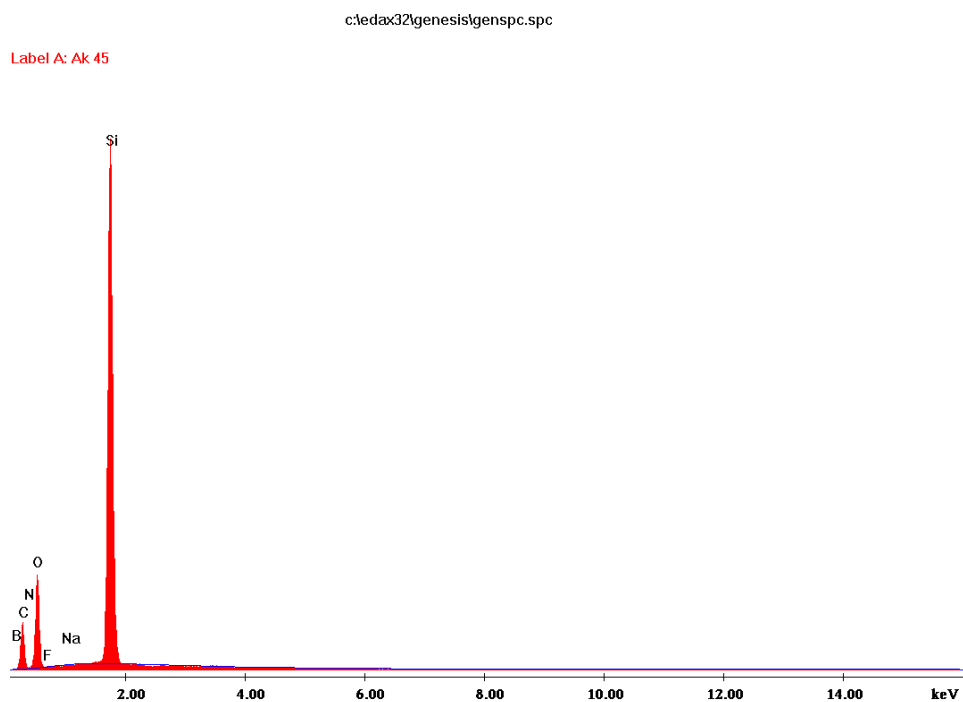


Figura 41. Spectrul EDX al preparatului AK₂₄.

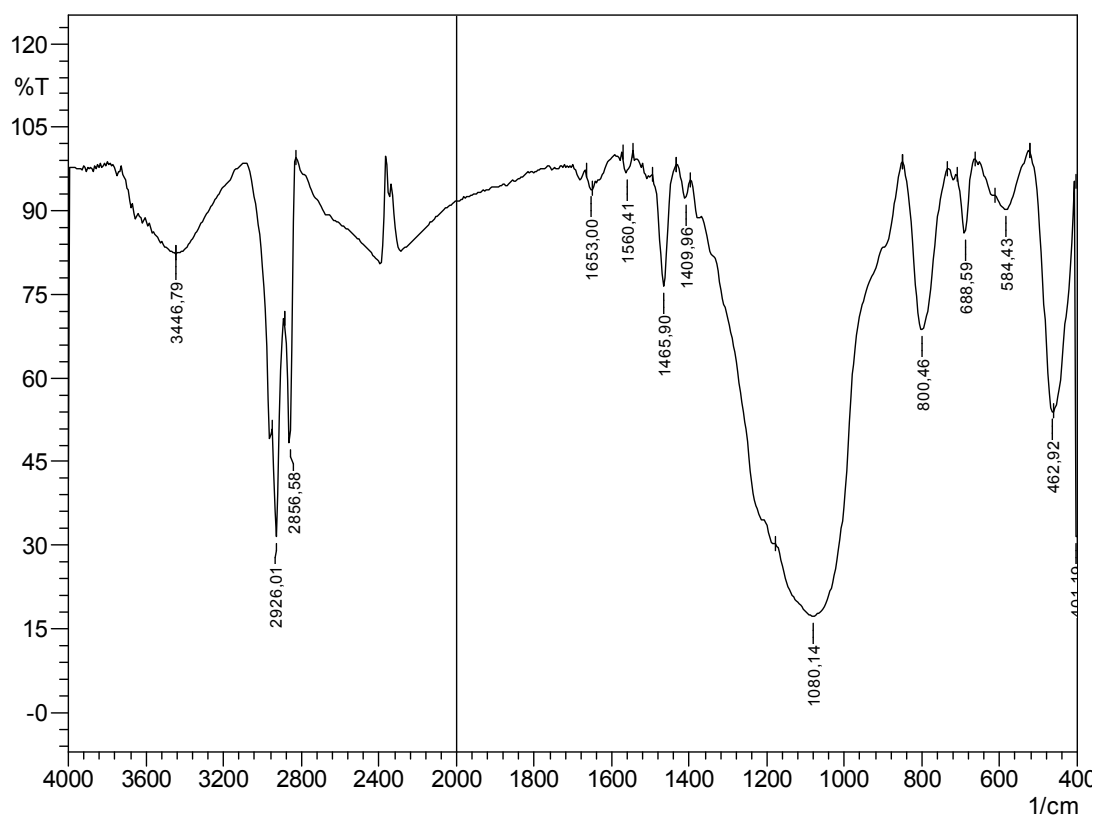


Figura 42. Spectrul IR al preparatului AK₂₄.

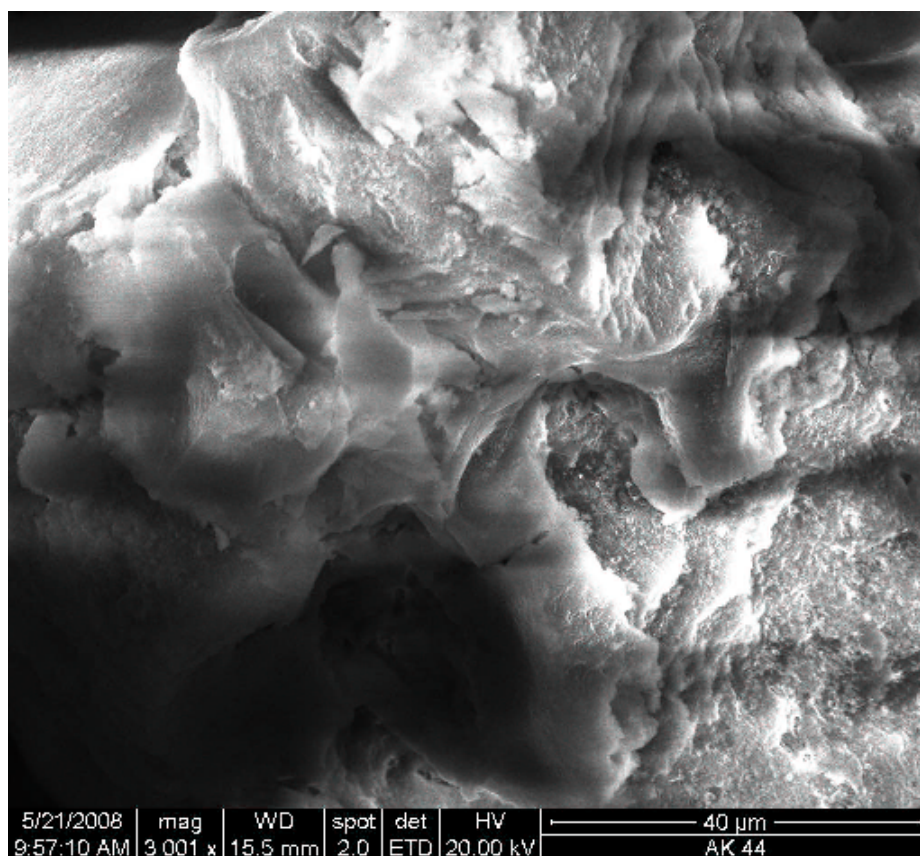


Figura 43. Imaginea SEM a preparatului AK₂₅.

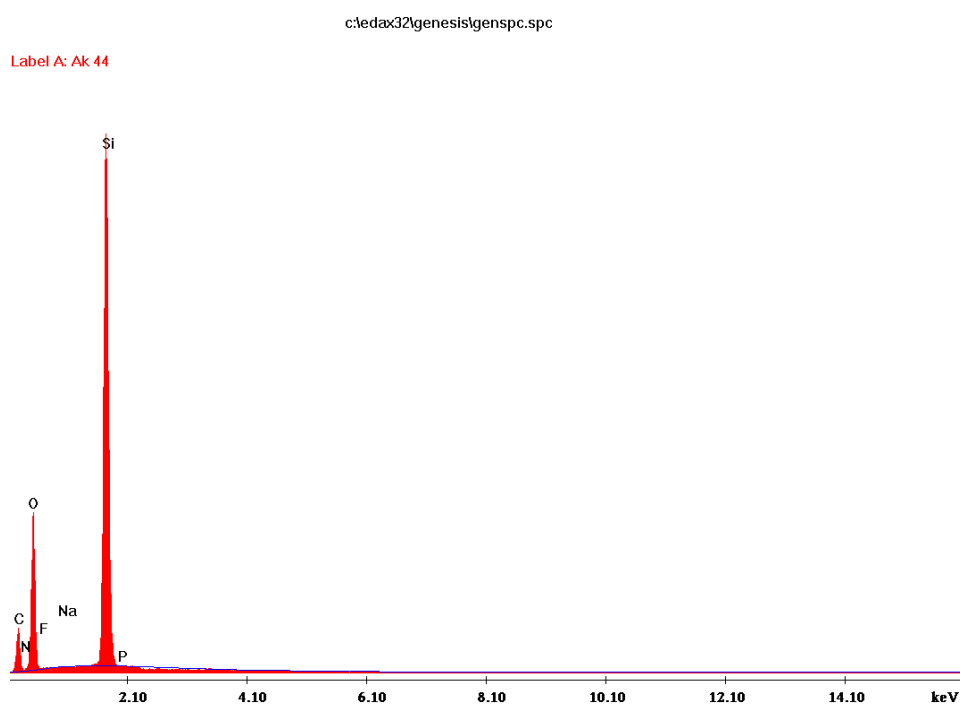


Figura 44. Spectrul EDX al preparatului AK₂₅.

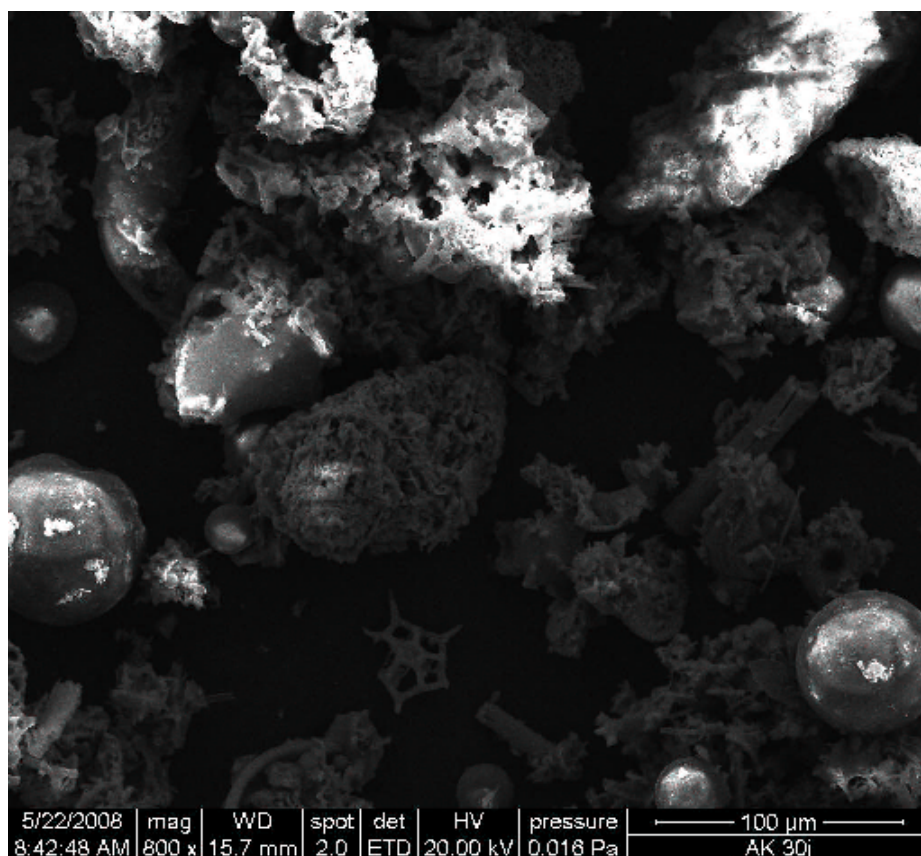


Figura 45. Imaginea SEM a preparatului AK₅₆.

c:\edax32\genesis\genspc.spc

Label A: Ak 30j

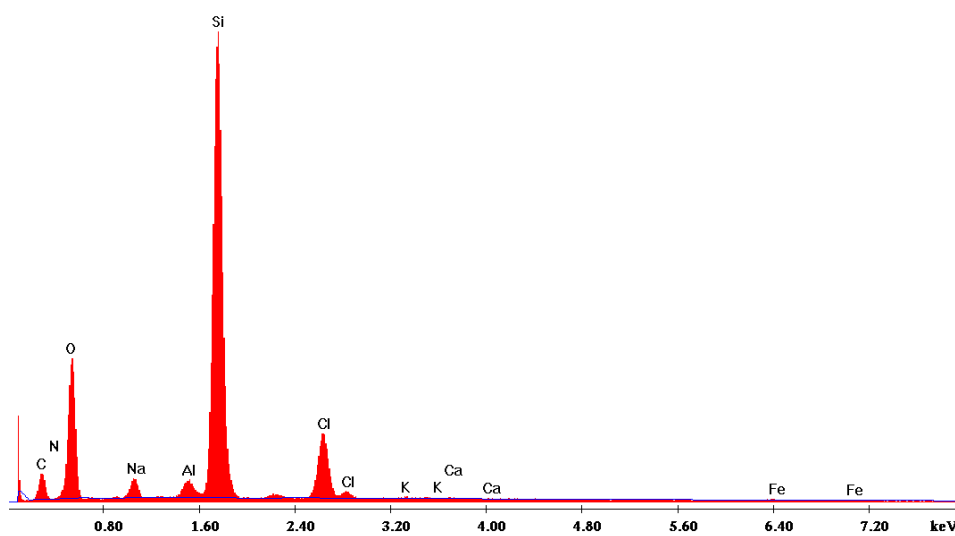


Figura 46. Spectrul EDX al preparatului AK₅₆.

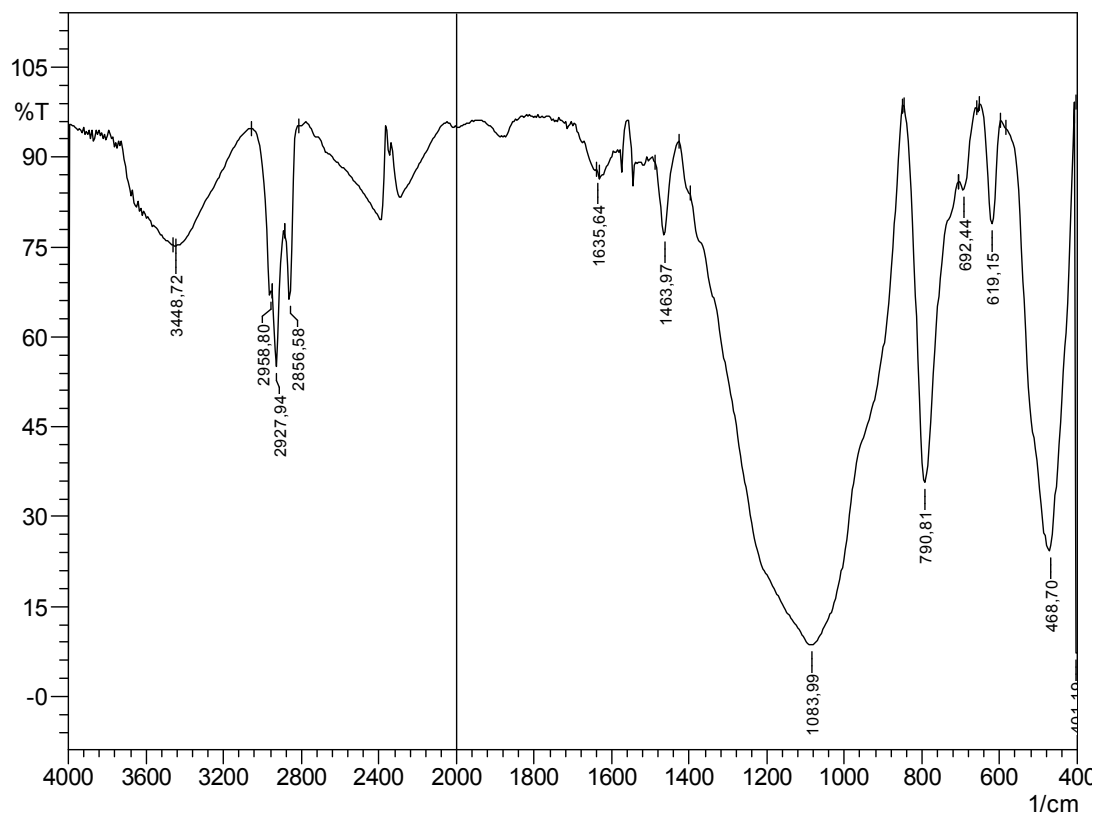


Figura 47. Spectrul IR al preparatului AK₅₆.

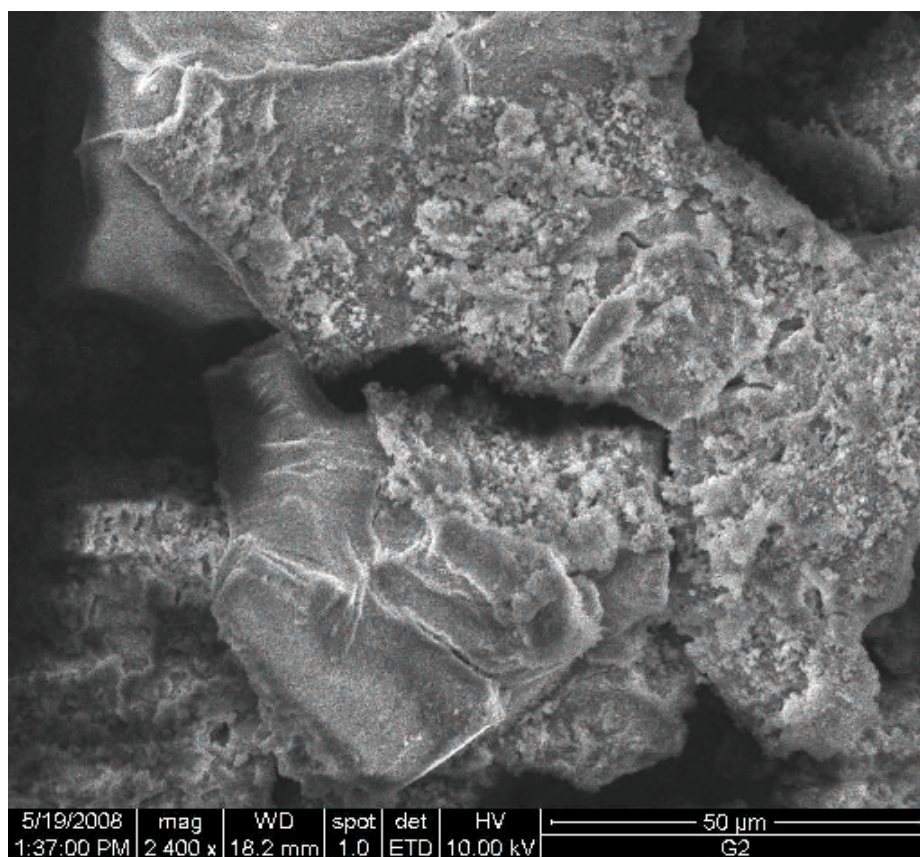


Figura 48. Imaginea SEM a sol-gelului martor obținut din precursorii PhTMOS/TMOS în raport molar de 1:1 (Metoda 2).

c:\edax32\genesis\genspc.spc

Label A: G2

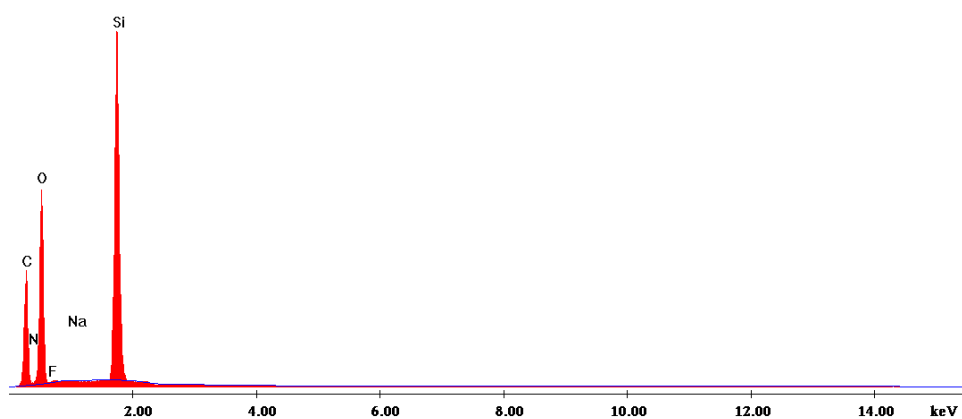


Figura 49. Spectrul EDX al sol-gelului martor obținut din precursorii PhTMOS/TMOS în raport molar de 1:1 (Metoda 2).

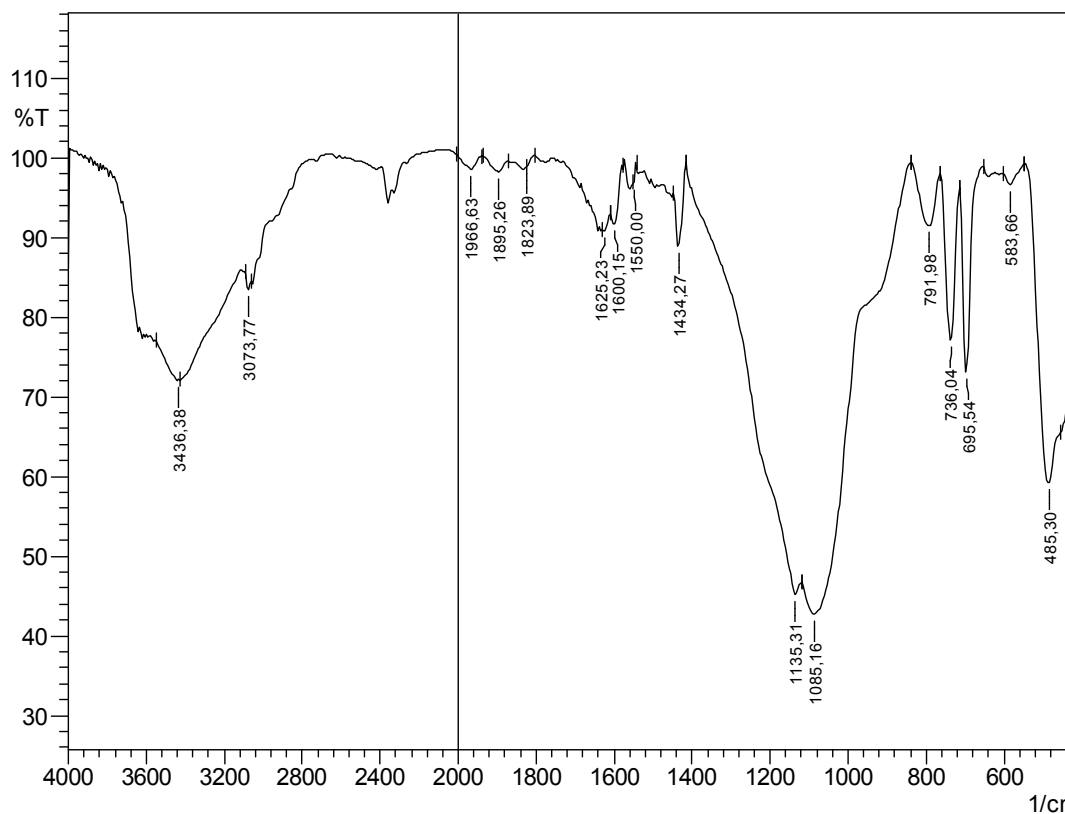


Figura 50. Spectrul IR al sol-gelului martor obținut din precursorii PhTMOS/TMOS în raport molar de 1:1 (Metoda 2).

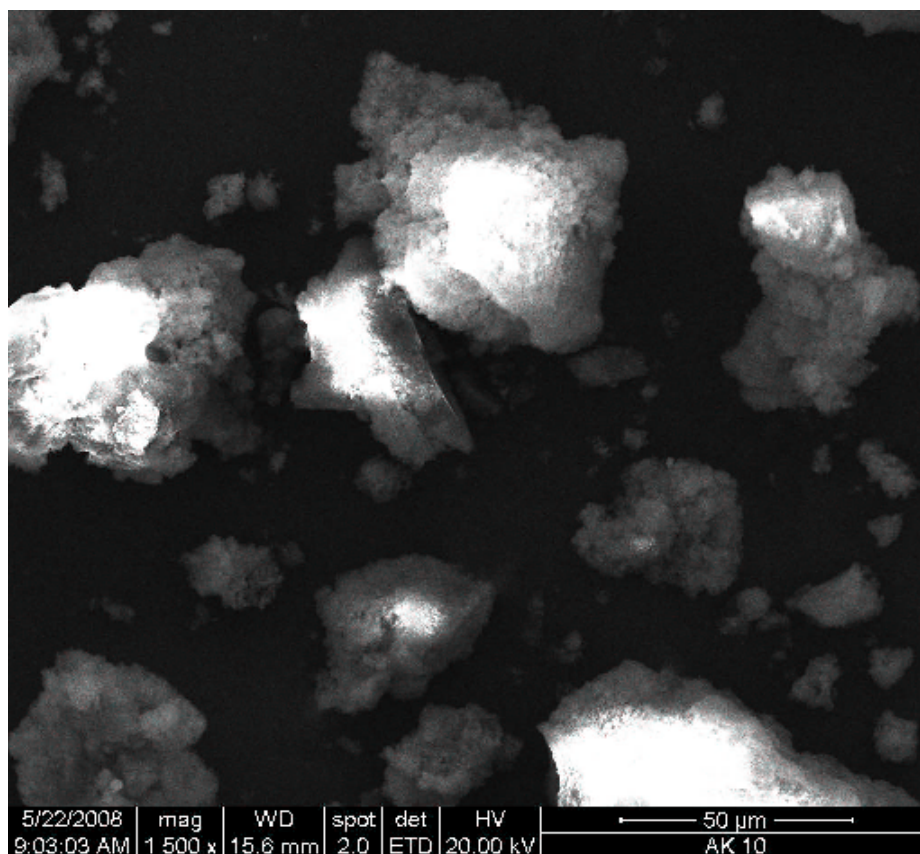


Figura 51. Imaginea SEM a preparatului AK₉.

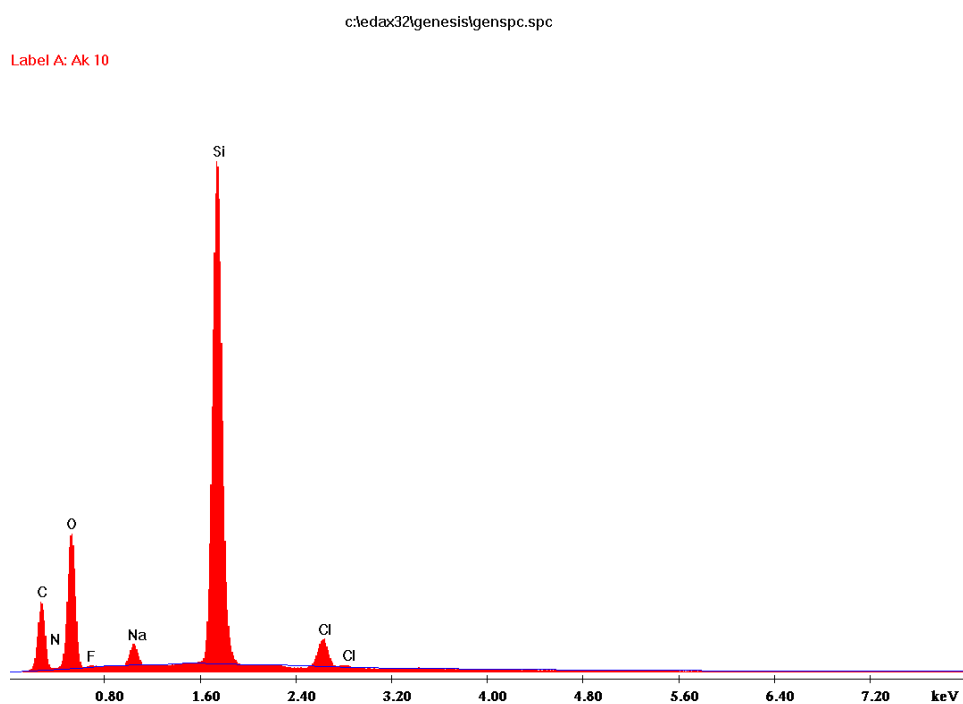


Figura 52. Spectrul EDX al preparatului AK₉.

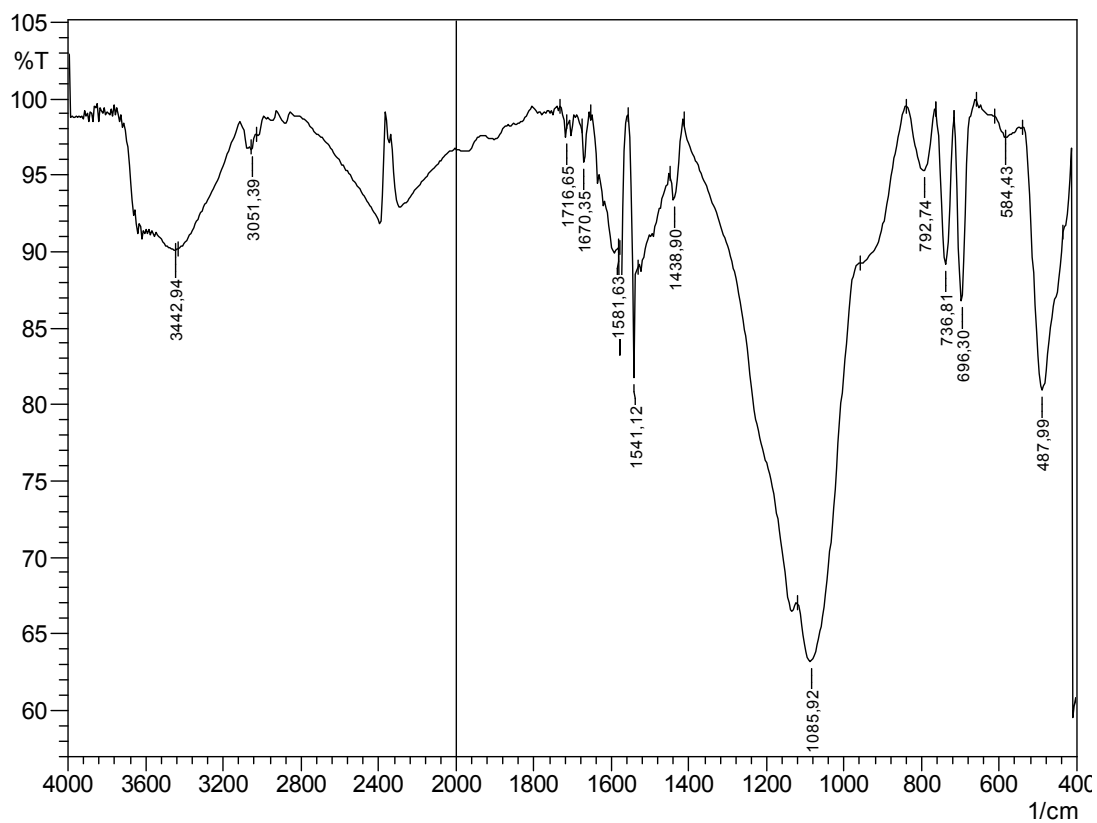


Figura 53. Spectrul IR al preparatului AK₉.

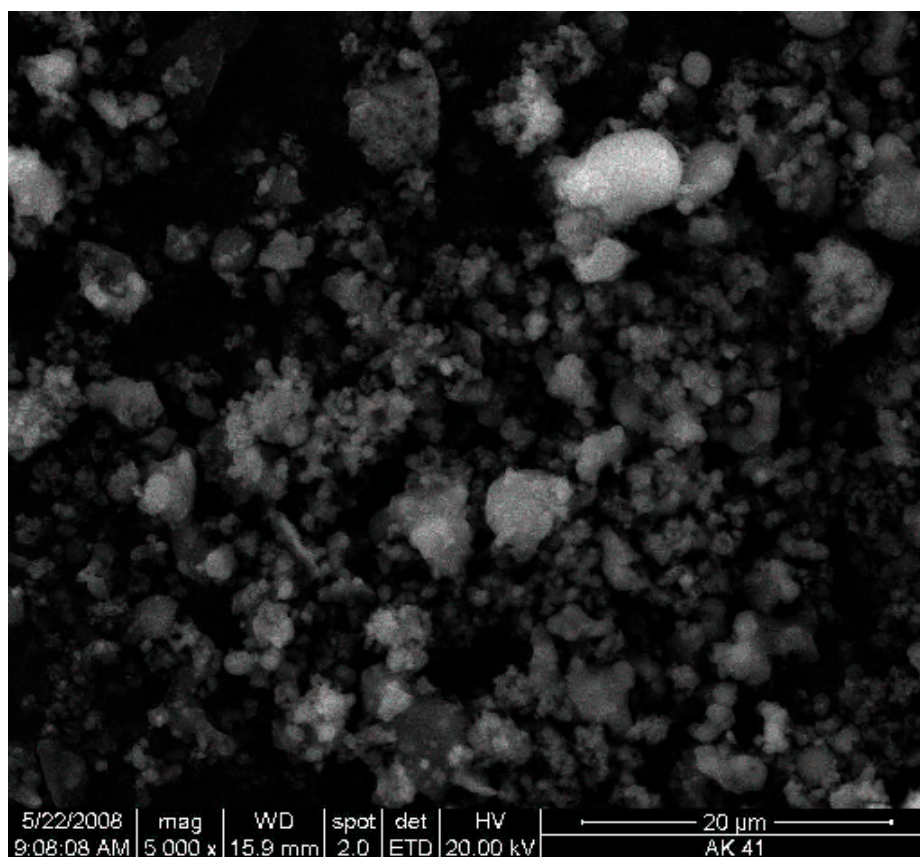


Figura 54. Imaginea SEM a preparatului AK₃₀.

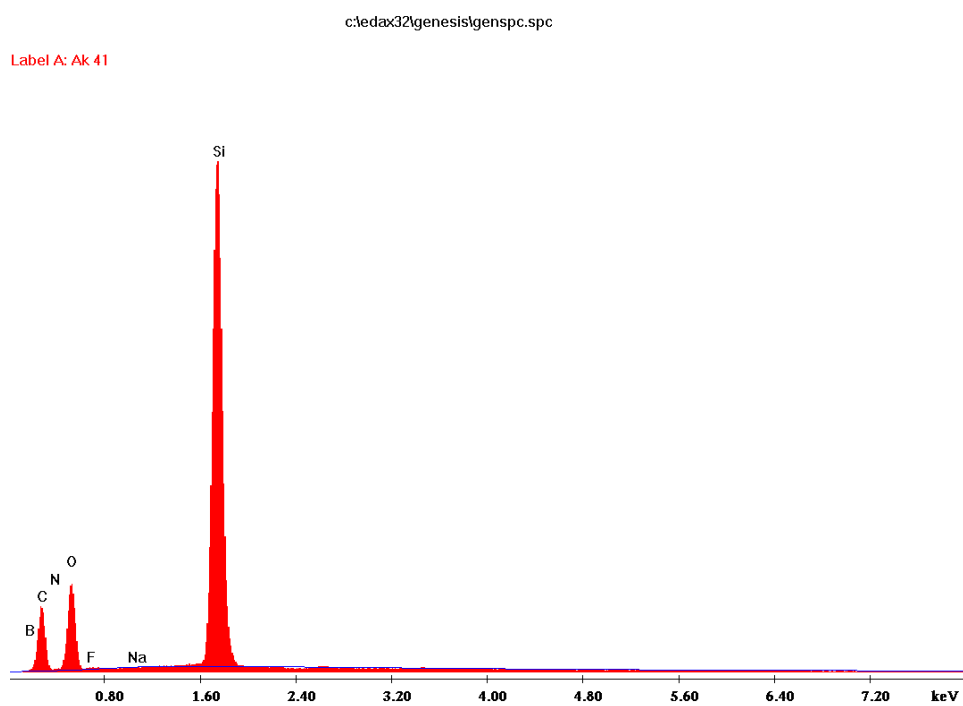


Figura 55. Spectrul EDX al preparatului AK₃₀.

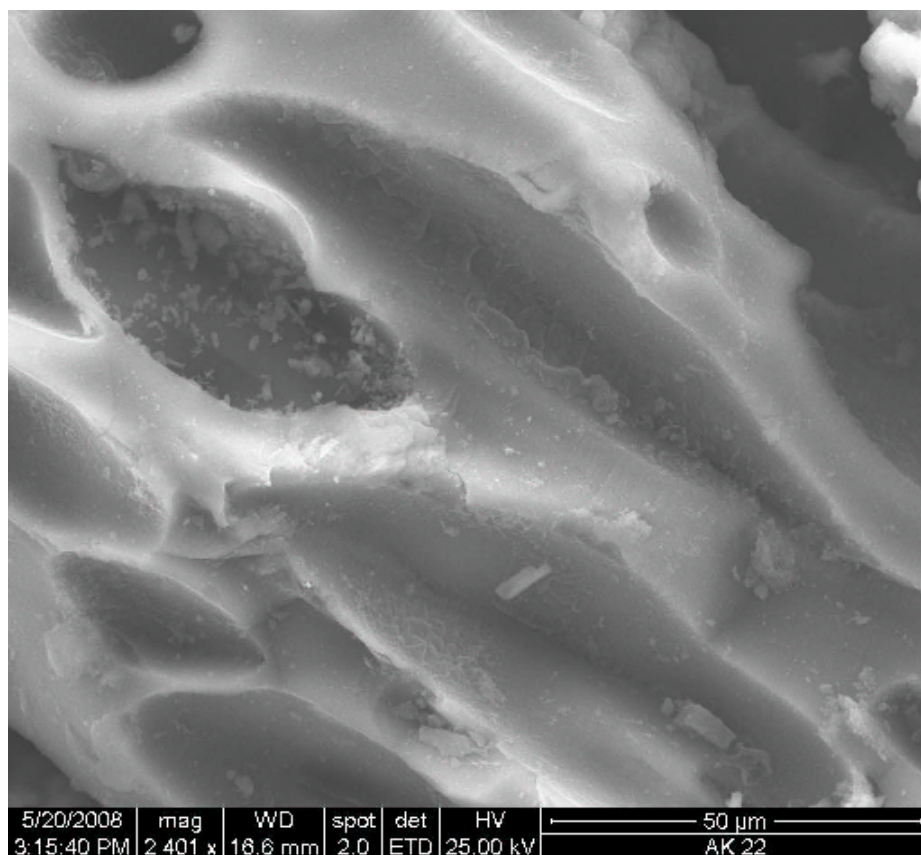


Figura 56. Imaginea SEM a preparatului AK₃₁.

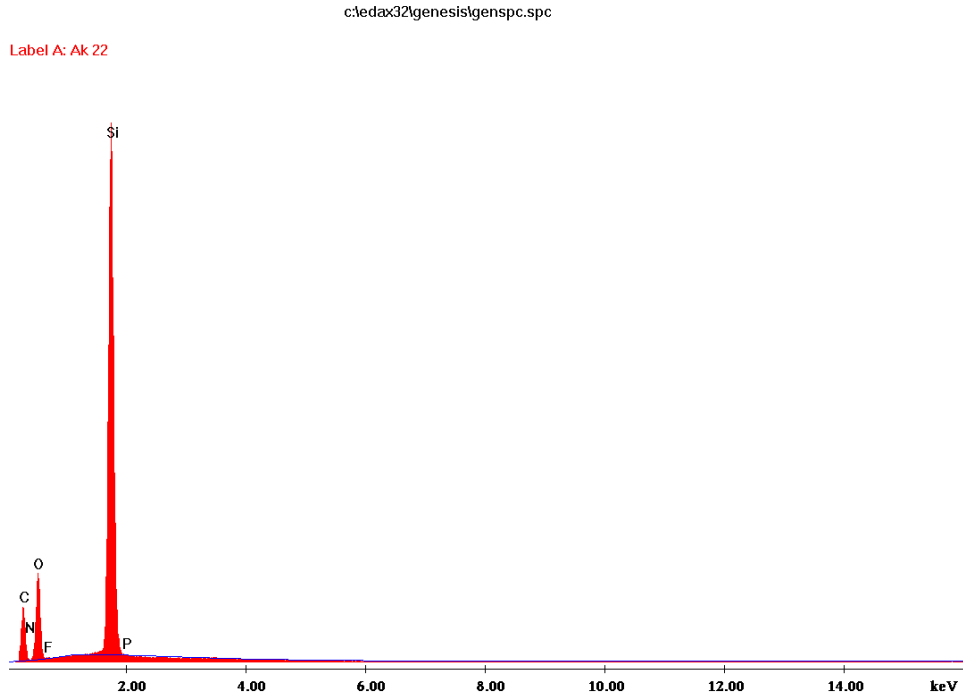


Figura 57. Spectrul EDX al preparatului AK₃₁.

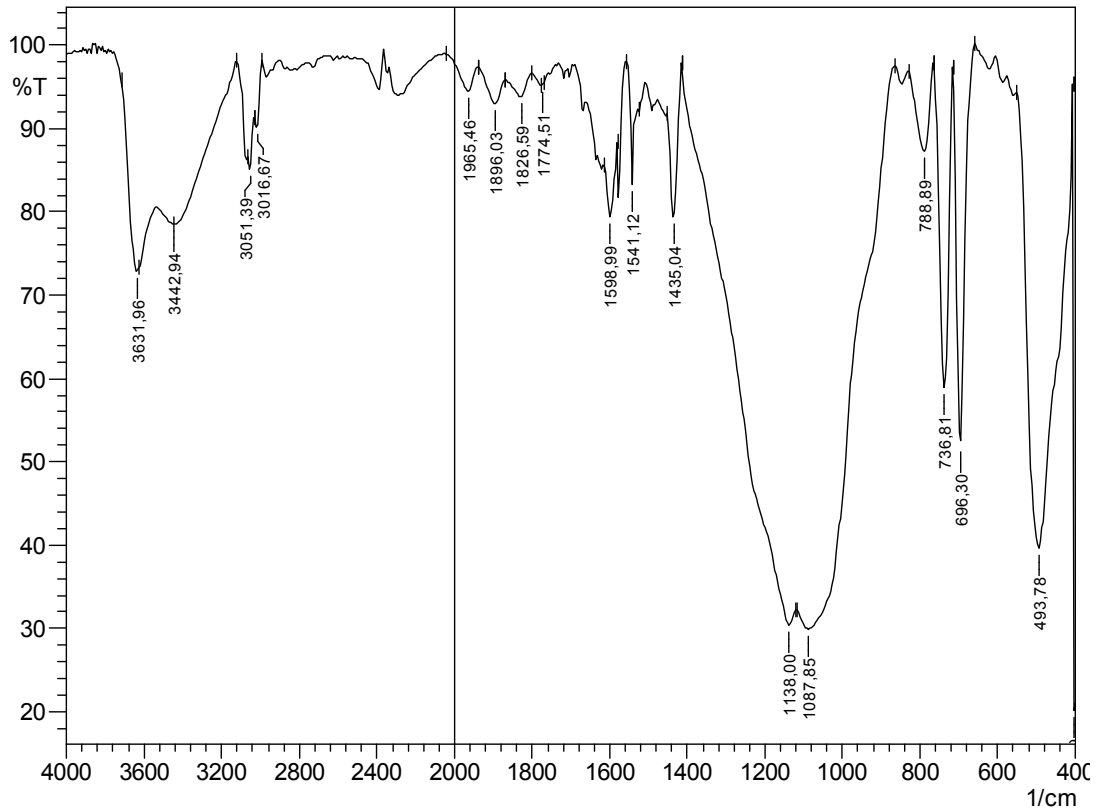


Figura 58. Spectrul IR al preparatului AK₃₁.

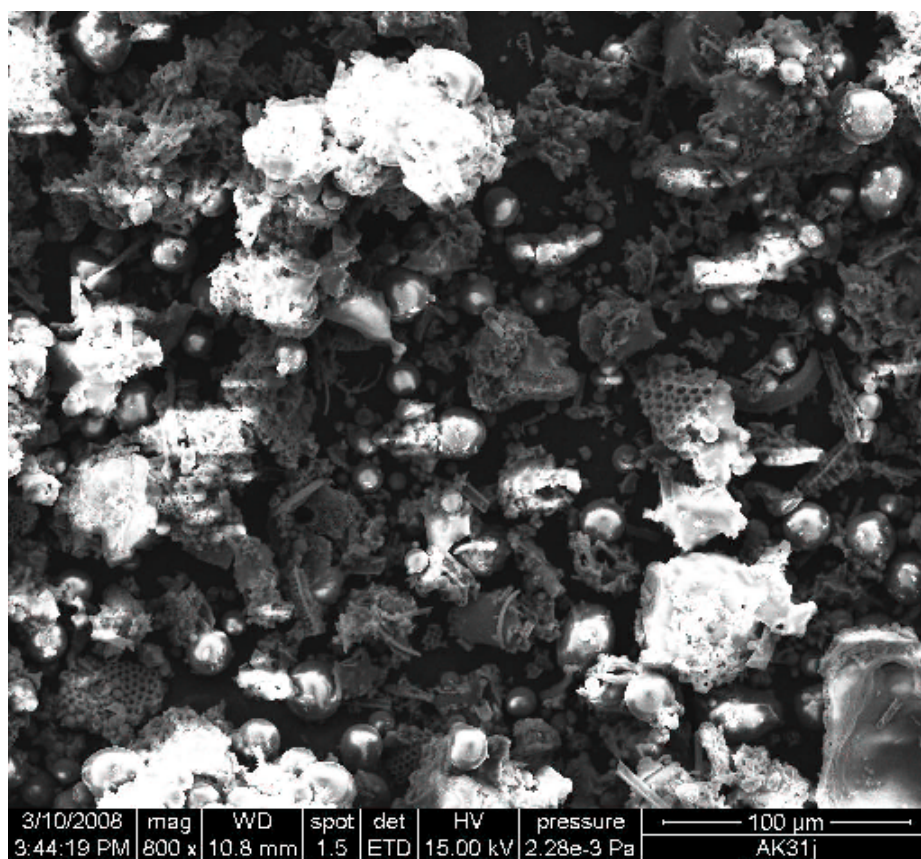


Figura 59. Imaginea SEM a preparatului AK₅₇.

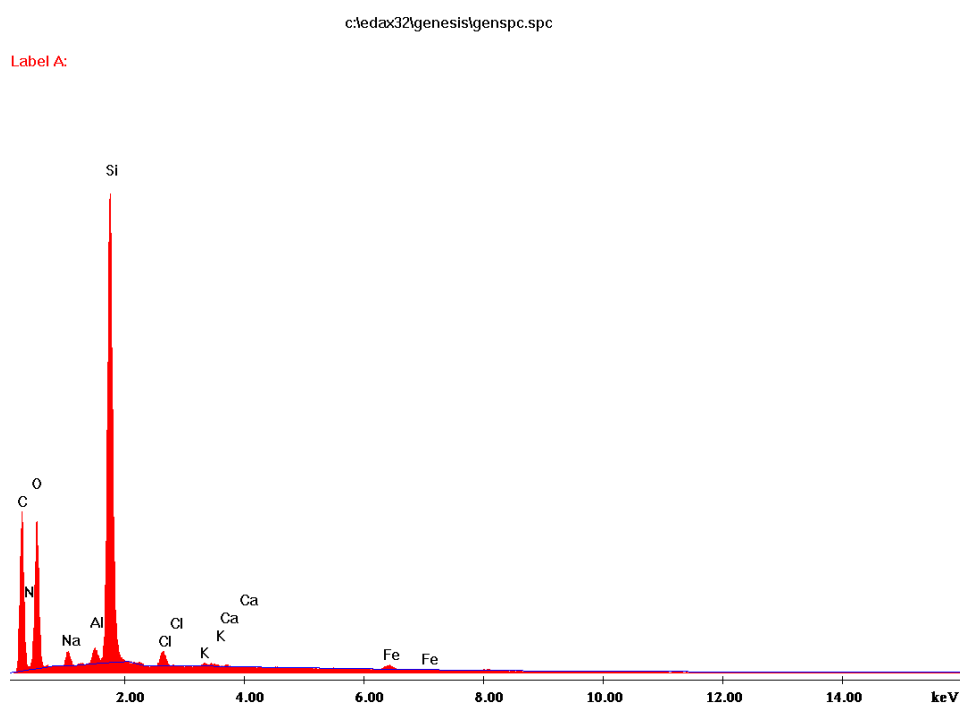


Figura 60. Spectrul EDX al preparatului AK₅₇.

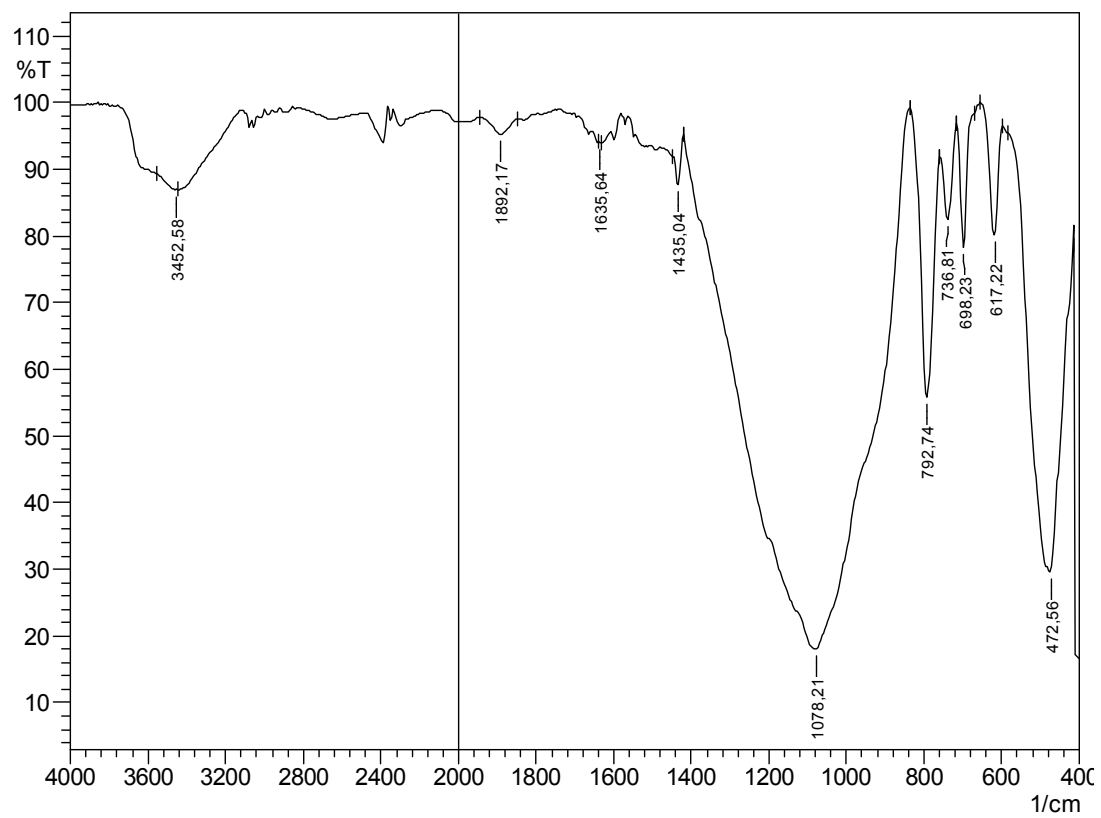


Figura 61. Spectrul IR al preparatului AK₅₇.