

Noi căi de sinteză pentru biocompuși folosind enzime native și imobilizate

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

Paula Aurelia Borza

Conducător științific:
Referenți științifici:

prof.univ.dr.ing Francisc Péter
prof.univ.dr.
prof.univ.dr.ing.
conf.univ.dr.ing.

Ziua susținerii tezei:

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- | | |
|---|--|
| 1. Automatică | 9. Inginerie Mecanică |
| 2. Chimie | 10. Știința Calculatoarelor |
| 3. Energetică | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 4. Ingineria Chimică | 12. Ingineria sistemelor |
| 5. Inginerie Civilă | 13. Inginerie energetică |
| 6. Inginerie Electrică | 14. Calculatoare și tehnologia informației |
| 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații | 15. Ingineria materialelor |
| 8. Inginerie Industrială | 16. Inginerie și Management |

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

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2013

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

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

Cuvant Inainte

Teza de doctorat a fost elaborată în cadrul departamentului CAICON (Chimie Aplicată și Ingineria Compușilor Organici și Naturali) al Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului a Universității Politehnica Timișoara sub conducerea domnului Prof. Univ. Dr. Ing. Francisc Péter, căruia îi sunt profund recunoscătoare și îi adresez mulțumiri pentru îndrumarea științifică, încrederea acordată și pentru toate oportunitățile pe care mi le-a furnizat făcând parte din colectivul de biocataliză enzimatică.

Aș vrea de asemenea să îi mulțumesc doamnei Prof. Dr. Ing. Carmen Boeriu pentru oportunitatea de a efectua o parte din activitatea de cercetare în cadrul Universității din Wageningen Food & Biobased Research – WUR, pentru timpul, îndrumările și sfaturile oferite.

Îmi exprim întreaga considerație față de membri comisiei de doctorat, domnul președinte al comisiei, doamna..... care au răspuns pozitiv solicitării de a face parte din comisia de analiză a tezei cât și pentru sugestiile științifice făcute cu scopul de a îmbunătăți această lucrare.

Doresc să mulțumesc membrilor comisiei de îndrumare Prof. Univ. Dr. Ing. Lucian-Mircea Rusnac, Conf. Univ. Dr. Ing. Mihai Medeleanu cât și în mod special doamnei Ș.I.Univ. Dr. Ing. Ana Cristina Paul și doamnei Ș.I. Univ. Dr. Ing. Anamaria Todea pentru observațiile privind structura tezei, pentru îndrumările de-a lungul studiilor de doctorat și pentru sfaturile acordate în etapa de finalizare a tezei.

I would like to express my thanks to the research group from Wageningen University and Reserch Center, especially to PhD. Guus Frissen, Marinella van Leeuwen, PhD. Andrada But, PhD. Malgorzata Krolicka for their help and friendship. I would also like to acknowledge PhD. Harrie Verhoeven, Wouter Teunissen and PhD. Fits van der Klis for their support.

Mulțumesc doamnei Ș.I. Univ. Dr. Ing. Gerlinde Rusu pentru analizele termice, doamnei Dr. Med. Simona-Marc Zarcu pentru analizele de fluorescență, domnului Dr. Ing. Iosif Hulka pentru analizele SEM și doamnei Dr. Ing. Mihaela Birdeanu pentru analizele AFM.

Doresc să le mulțumesc totodată colegilor din departamentul de biocataliză Dr. Ing. Anca Marcu, Dr. Ing. Fiuța Fițigău, Dr. Ing. Emese Biro, Ing. Adinela Cimporescu și Ing. Claudiu Marcu pentru ajutorul acordat.

Nu în ultimul rând doresc să le mulțumesc părinților și prietenului meu Claudiu pentru susținere și înțelegerea acordată.

Timișoara, iulie 2020

Paula Aurelia Borza

Părinților

Borza, Paula Aurelia

Noi căi de sinteză pentru biocompuși folosind enzime native și imobilizate

Teze de doctorat ale UPT, Seria X, Nr. YY, Editura Politehnica, 200Z, 168 pagini, 39 figuri, 27 tabele.

Cuvinte cheie: lipaze, lacază, peroxidază, imobilizare sol-gel, adsorbție, legare covalentă, sistem în flux continuu cu „packed-bed” (PBR).

Rezumat,

Principalele obiective ale tezei de doctorat au fost obținerea de noi biocatalizatori imobilizați, din categoria hidrolazelor (lipaze imobilizate în sol-gel) și oxidoreductazelor (lacază imobilizată prin legare covalentă și adsorbție, respectiv peroxidază imobilizată prin legare covalentă) pentru creșterea eficienței acestora în diferite procese de biotransformare.

Biocatalizatorii obținuți cu lipaze au fost caracterizați din punct de vedere structural, morfologic și al comportamentului termic prin: microscopie electronică de scanare, microscopie de fluorescență, spectroscopie FT-IR, microscopie atomică de forță și analiză termică cu scopul de a găsi informații care pot fi corelate cu eficiența catalitică în reacția de transesterificare. De asemenea, s-a studiat influența temperaturii și a solvenților organici asupra activității catalitice și a enantioselectivității lipazelor native și imobilizate prin tehnica sol-gel.

Optimizarea rezoluției cinetice a unor amestecuri racemice, folosind lipaza imobilizată, a fost realizată în sistem cu flux continuu tip „packed-bed”, folosind un program de design experimental.

Lacaza nativă și imobilizată prin legare covalentă pe suport cu grupări epoxi/butil-metacrilat au fost studiate prin prisma profilului de pH și temperatură, iar în cazul preparatului enzimatic obținut prin legare covalentă pe un suport cu grupări epoxidice/butil-metacrilat s-a studiat și efectul cantității de apă.

Peroxidaza din hrean a fost imobilizată prin legare covalentă. Prin imobilizare au fost îmbunătățite termostabilitatea, stabilitatea operațională și activitatea pe un interval mai larg de pH. Enzima imobilizată a fost reutilizată cu succes, activitatea menținându-se la 80% din valoarea inițială după 10 cicluri de utilizare.

Această lucrare a fost finanțată parțial din proiectul strategic POSDRU/159/1.5/S/137070 (2014) al Ministerului Educației Naționale, România, cofinanțat din Fondul Social European-Investește în oameni, în cadrul Programului Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013.

Adresez mulțumiri deosebite Universității din Wageningen pentru posibilitatea de a efectua o parte din experimentele din cadrul tezei de doctorat în cadrul grupului Food and Biobased Reserch.

Cuprins

| | |
|--|-----------|
| 1. STUDIU DE LITERATURĂ..... | 2 |
| 1.1. IMPORTANȚA TEMEI..... | 2 |
| 1.2. BIOCATALIZA ȘI APLICAȚIILE EI | 3 |
| 1.2.1. Enzimele | 5 |
| 1.2.1.1. Enzime cu importanță industrială și aplicațiile acestora | 7 |
| 1.2.2. LIPAZE UTILIZATE ÎN PROCESE BIOCATALITICE..... | 8 |
| 1.2.2.1. Lipaza din <i>Candida antarctica</i> | 9 |
| 1.2.2.2. LIPAZE DIN <i>PSEUDOMONAS SP.</i> | 11 |
| 1.2.2.3. Stabilitatea lipazelor în solvenți organici și la temperatură..... | 11 |
| 1.3. OXIDAZE ȘI UTILIZAREA LOR ÎN BIOTEHNOLOGII..... | 13 |
| 1.3.1. LACAZE | 13 |
| 1.3.1.1. Sistemul mediator al lacazei | 14 |
| 1.3.1.2. Aplicații ale lacazelor..... | 15 |
| 1.3.2. PEROXIDAZE..... | 16 |
| 1.4. IMOBILIZAREA ENZIMELOR..... | 17 |
| 1.4.1. Avantajele și dezavantajele imobilizării | 19 |
| 1.4.2. Metode de imobilizare | 20 |
| 1.4.2.1. Imobilizarea prin adsorbție | 21 |
| 1.4.2.2. Imobilizarea prin entrapare/ încapsulare | 21 |
| 1.4.2.3. Imobilizarea prin afinitate..... | 24 |
| 1.4.2.4. Imobilizarea prin legare covalentă..... | 24 |
| 1.4.2.5. Imobilizare prin reticulare..... | 24 |
| 1.4.3. IMOBILIZAREA LIPAZELOR ȘI A LACAZELOR..... | 25 |
| 1.4.3.1. Imobilizarea lipazelor din <i>Candida antarctica</i> și <i>Pseudomonas sp.</i> | 25 |
| 1.4.3.2. Imobilizarea lacazelor | 27 |
| 1.5. Biocataliza în sistem de reacție continuu | 28 |
| 1.6. Procese biotehnologice inovative realizate cu enzime oxidative | 30 |
| 1.6.1. Oxidarea glucozei la acid glucaric | 30 |
| 1.6.2. Eliminarea enzimatică a coloranților reziduali din ape..... | 31 |
| 2. CONTRIBUTII ORIGINALE | 33 |
| 2.1 OBIECTIVELE TEZEI DE DOCTORAT..... | 33 |
| 2.2 Creșterea stabilității lipazelor în procese de rezoluție cinetică prin imobilizare în matrici de sol-gel cu grupări vinilice | 33 |
| 2.2.1. Imobilizarea lipazei din <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Amano AK) prin tehnica sol-gel și sol-gel combinată cu adsorbție..... | 34 |

| | |
|---|----|
| 2.2.2. Imobilizarea lipazei din <i>Burkholderia cepacia</i> (Amano PS) prin tehnica sol-gel și sol-gel combinată cu adsorbție | 40 |
| 2.2.3. Imobilizarea lipazei din <i>Candida antarctica</i> B (Cal B) prin tehnica sol-gel combinată cu adsorbție | 46 |
| 2.2.4. Imobilizarea lipazei din <i>Candida antarctica</i> A prin tehnica sol-gel..... | 49 |
| 2.2.4.1. Studiul influenței metodei de imobilizare a lipazei Cal A și a compoziției sistemului de silani precursori asupra eficienței catalitice a biocatalizatorului imobilizat..... | 49 |
| 2.2.5. Concluzii | 54 |
| 2.3. CARACTERIZAREA BIOCATALIZATORILOR OBȚINUȚI PRIN IMOBILIZARE ÎN MATRICI DE SOL-GEL CU GRUPĂRI VINILICE..... | 55 |
| 2.3.1. Caracterizarea prin microscopie electronică de scanare–SEM..... | 55 |
| 2.3.2. Caracterizarea prin microscopie de fluorescență – FITC | 58 |
| 2.3.3. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR | 59 |
| 2.3.4. Caracterizarea prin microscopie de forță atomică (AFM)..... | 60 |
| 2.3.5. Analiza termică..... | 63 |
| 2.3.5.1. Analiza termică a preparatelor imobilizate din lipaza <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 63 |
| 2.3.5.2. Analiza termică a preparatelor imobilizate cu lipaza <i>Candida antarctica</i> B | 65 |
| 2.3.6. Stabilitatea lipazelor imobilizate în solvenți organici | 66 |
| 2.3.6.1. Efectul solvenților organici asupra morfologiei biocatalizatorilor imobilizați prin metoda sol-gel | 72 |
| 2.3.7. Influența imobilizării prin tehnici de sol-gel asupra termostabilității lipazelor .. | 73 |
| 2.3.7.1. Studiul stabilității termice a lipazei imobilizate din <i>Candida antarctica</i> B la 80°C | 77 |
| 2.3.8. Studiul stabilității operaționale a biocatalizatorilor în sistem discontinuu | 78 |
| 2.3.9. Concluzii | 80 |
| 2.4. REZOLUȚIA CINETICĂ ENZIMATICĂ A UNOR SUBSTRATURI RACEMICE ÎN SISTEM CONTINUU | 81 |
| 2.4.1. Optimizarea rezoluției cinetice enzimatică în sistem continuu a 2-octanolului și a 1-feniletanolului folosind programul experimental factorial..... | 82 |
| 2.4.2. Rezoluția cinetică a 2-octanolului în sistem continuu (Program experimental factorial 1) | 83 |
| 2.4.3. Analiza efectelor (Program experimental factorial 1)..... | 85 |
| 2.4.4. Analiza suprafețelor de răspuns (Program experimental factorial 1)..... | 85 |
| 2.4.5. Rezoluția cinetică a 2-octanolului în sistem continuu (Program experimental factorial 2) | 87 |
| 2.4.6. Analiza efectelor (Program experimental factorial 2)..... | 88 |
| 2.4.7. Analiza suprafețelor de răspuns | 89 |
| 2.4.8. Rezoluția cinetică enzimatică a 1-feniletanolului (<i>rac</i> -2) în sistem continuu | 91 |
| 2.4.9. Concluzii | 95 |
| 2.5. IMOBILIZAREA UNOR ENZIME OXIDATIVE PRIN LEGARE COVALENTĂ ȘI APLICAȚII BIOTEHNOLOGICE | 95 |

| | |
|--|------------|
| 2.5.1. IMOBILIZAREA LACAZEI ȘI EVALUAREA UTILIZĂRII LACAZEI PENTRU OBȚINERE DE ACID GLUCARIC | 95 |
| 2.5.1.1. Stabilizarea lacazei din <i>Trametes versicolor</i> prin legare covalentă | 96 |
| 2.5.1.2. Studiul imobilizării lacazei din <i>Trametes versicolor</i> prin adsorbție pe suporturi polimerice | 98 |
| 2.5.1.3. Efectul raportului enzimă/suport asupra activității catalitice a lacazei imobilizate..... | 99 |
| 2.5.1.4. Studiul profilului de pH al lacazei native și imobilizate prin legare covalentă pe suportul cu grupări epoxi/butil | 101 |
| 2.5.1.5. Studiul influenței conținutului de apă al lacazei imobilizate prin legare covalentă pe un suport cu grupări epoxi/butil asupra activității..... | 102 |
| 2.5.1.6. Stabilitatea termică a lacazei native și a preparatului enzimatic obținut prin legare covalentă pe suport cu grupări epoxi/butil..... | 103 |
| 2.5.1.7. Oxidarea glucozei la acid glucaric | 104 |
| 2.5.1.8. Concluzii | 106 |
| 2.5.2. UTILIZAREA PEROXIDAZEI IMOBILIZATE PENTRU ELIMINAREA UNOR COLORANȚI DIN APĂ..... | 107 |
| 2.5.2.1. Selectivitatea peroxidazei pentru coloranții azoici comerciali | 107 |
| 2.5.2.2. Efectul concentrației de apă oxigenată | 108 |
| 2.5.2.3. Imobilizarea peroxidazei folosind suporturile ReliZyme™ | 109 |
| 2.5.2.4. Caracterizarea comparativă a peroxidazei native și imobilizate | 110 |
| 2.5.2.4.1. Effectul pH-ul asupra activității..... | 110 |
| 2.5.2.4.2. Efectul temperaturii asupra stabilității peroxidazei imobilizate..... | 111 |
| 2.5.2.4.3. Stabilitatea operațională a enzimei imobilizate | 112 |
| CONCLUZII | 113 |
| 3. PARTEA EXPERIMENTALĂ | 114 |
| 3.1. MATERIALE..... | 114 |
| 3.2. METODE | 115 |
| 3.2.1. Imobilizare prin entrapare în sol-gel (Metoda SGE-1) | 115 |
| 3.2.2. Imobilizare prin entrapare în sol-gel cu sol prepolimer (Metoda SGE-2) | 116 |
| 3.2.3. Imobilizare prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite 545 (Metoda SGE-A)..... | 117 |
| 3.2.4. Imobilizare covalentă a lacazei pe diferite suporturi..... | 118 |
| 3.2.4.1. Imobilizare prin legare covalentă folosind suporturi funcționalizate cu grupări epoxi și epoxi/butil..... | 118 |
| 3.2.4.2. Imobilizare prin legare covalentă folosind suporturi funcționalizate cu grupări amino | 119 |
| 3.2.5. Imobilizarea lacazei prin adsorbție pe diferite suporturi..... | 120 |
| 3.2.6. Imobilizarea prin legare covalentă pe suporturi epoxidice a peroxidazei din hrean | 121 |

| | |
|--|------------|
| 3.2.6. Determinarea conținutului de proteină utilizând metoda Bradford | 121 |
| 3.2.7. Determinarea activității lacazei native și a lacazelor imobilizate în reacția de oxidare a 2,6-dimetoxifenolului..... | 122 |
| 3.2.7.1. Determinarea activității lacazei native | 122 |
| 3.2.7.2. Determinarea activității lacazei imobilizate..... | 122 |
| 3.2.8. Efectul pH-ului asupra lacazei native și imobilizate prin legare covalentă..... | 123 |
| 3.2.9. Efectul uscării asupra preparatului enzimatic obținut prin legare covalentă... | 123 |
| 3.2.10. Efectul temperaturii asupra enzimei native și a preparatului enzimatic obținut prin legare covalentă | 123 |
| 3.2.11. Reacții de rezoluție cinetică enzimatică ai alcoolilor secundari | 123 |
| 3.2.12. Analiza cantitativă prin cromatografie de gaze | 124 |
| 3.2.13. Stabilitatea în solvenți organici a lipazelor din Amano AK, Amano PS și Cal B126 | |
| 3.2.14. Stabilitatea termică a lipazelor native și imobilizate | 126 |
| 3.2.15. Reutilizarea lipazelor native și imobilizate în reacții de transesterificare | 126 |
| 3.2.16. Acilarea 2-octanolului și a 1-feniletanolului cu acetat de vinil în mediu de <i>n</i> -hexan, în sistem continuu | 127 |
| 3.3. METODE DE ANALIZĂ..... | 127 |
| 3.3.1 Microscopia electronică de scanare – SEM..... | 127 |
| 3.3.2 Microscopia de fluorescență - FITC..... | 128 |
| 3.3.3. Spectroscopia FT-IR..... | 129 |
| 3.3.4. Microscopia de forță atomică– AFM..... | 129 |
| 3.3.5. Analiza termică – TG | 130 |
| 3.4. Oxidarea glucozei la acid glucaric | 130 |
| 3.5. Utilizarea peroxidazei imobilizate pentru eliminarea unor coloranți din apă | 130 |
| 3.5.1. Determinarea activității peroxidazei utilizând ABTS..... | 130 |
| 3.5.2. Efectul concentrației de apă oxigenată | 130 |
| 3.5.3. Profilul de pH al peroxidazei imobilizate | 130 |
| 3.5.4. Degradarea coloranților azoici de către peroxidaza imobilizată | 131 |
| 3.5.5. Efectul temperaturii asupra activității peroxidazei imobilizate..... | 131 |
| 3.5.6. Utilizarea repetată a biocatalizatorului..... | 131 |
| <u>4. CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII ORIGINALE</u> | 131 |
| <u>5. BIBLIOGRAFIE.....</u> | 136 |
| ANEXE..... | 151 |
| <u>LISTA DE LUCRĂRI</u> | 152 |

ABREVIERI

e.e_p. - exces enantiomeric al produsului de reacție
GC - cromatografie de gaze
SGE-1 - imobilizare prin entrapare în sol-gel prin Metoda 1
SGE-2 - imobilizare prin entrapare în sol-gel cu sol prepolimer prin Metoda 2
SGE-A - imobilizare prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite 545
Conv. - conversie
Atrans - activitate de transesterificare
[Omim]BF₄ - tetrafluorborat de 1-octil-3-metilimidazoliu
PhTMOS - feniltrimetoxisilan
VTMOS - viniltrimetoxisilan
TMOS - tetrametoxisilan
MeTMOS - metiltrimetoxisilan
OcTMOS - octiltrimetoxisilan
Amano AK - lipaza din *Pseudomonas fluorescens*
Amano PS - lipaza din *Burkholderia cepacia*
Cal B - lipaza din *Candida antarctica* B
Cal A - lipaza din *Candida antarctica* A
GOX - glucozoxidaza Tip II din *Aspergillus niger*
TEMPO - 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil
SEM - microscopie electronica de scanare
FITC - microscopie de fluorescență
AFM - microscopie atomică de forță
FT-IR - Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier
 r_{flow} - productivitatea
Rac-1 - 2-octanol
Rac-2 - 1-feniletanol
E - coeficient de enantioselectivitate
THF - tetrahidrofuran
t-BuOH - terț-butanol

1. Studiu de literatură

1.1. Importanța temei

Biocataliza este definită ca domeniul în care microorganisme sau macromolecule naturale, cum ar fi enzimele, sunt utilizate pentru a cataliza reacții chimice [1].

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

Dimensiunea globală a pieței enzimelor a fost de 8,18 miliarde USD în 2015 și se așteaptă să se înregistreze o creștere semnificativă în următorii opt ani, datorită creșterii utilizării acestora în detergenți, produse farmaceutice, alimente și băuturi.

Proteazele au reprezentat segmentul de produse proeminent care reprezenta 27,4% din piața mondială în 2015 și se așteaptă să înregistreze o creștere profitabilă în sectoare farmaceutice, detergenți și chimice în diferite țări, inclusiv China, India și Brazilia.

Lipazele vor înregistra și ele o creștere semnificativă în special în industria alimentară, pentru fabricarea unor produse cum sunt brânza, iaurturile și prăjiturile. De asemenea, ele se utilizează în detergenți, în producerea de biodiesel și în rezoluții cinetice ale amestecurilor racemice [3,4].

În mod specific, suprapunerea expertizei tehnice în **imobilizarea enzimelor**, **ingineria proteinelor** și **ingineria proceselor** va defini următoarea generație de biocatalizatori imobilizați și va garanta succesul proceselor induse.

Studiile privind imobilizarea enzimelor, adică atașarea biocatalizatorului la un material dorit prin interacțiuni fizice, chimice, electrice sau mecanice, au demonstrat că prin imobilizare biocatalizatorii își pot îmbunătăți activitatea și stabilitatea într-o gamă mai extinsă de condiții de funcționare [5].

Biocataliza se efectuează în mod obișnuit în reactoare în șarje, care sunt flexibile și simple. Cu toate acestea, biocataliza în reactoare cu **flux continuu** poate fi mai productivă, controlată și durabilă din punct de vedere ecologic.

Procesul în flux continuu are potențialul de a accelera biotransformările datorită transferului de masă îmbunătățit, ceea ce face ca producția la scară largă să fie mai fezabilă din punct de vedere economic prin folosirea de echipamente mai puțin voluminoase, rezultând o scădere substanțială a timpului de reacție de la câteva ore la câteva minute și îmbunătățirea randamentului spațiu-timp, comparativ cu procesele discontinue [6].

În contextul actualelor tendințe de dezvoltare a proceselor biocatalitice, obiectivul principal al acestei teze de doctorat a fost obținerea de biocatalizatori cu eficiență ridicată și potențiale aplicații în procese ale chimiei verzi. Au fost investigate noi direcții pentru imobilizarea lipazelor în sol-gel pentru realizarea de rezoluții cinetice a amestecurilor racemice, a lacazei prin legare covalentă și adsorbție pentru obținerea acidului D-glucaric și a peroxidazei prin legare covalentă pentru eliminarea unor coloranți din apă. Activitatea preparatelor obținute cu lipaze imobilizate prin tehnica sol-gel a fost testată în reacția de transesterificare a unor alcooli secundari (2-hexanol, 2-heptanol, 2-octanol și 1-feniletanol).

Preparatele cu lipază au fost caracterizate din punct de vedere morfologic și structural prin analizele FITC, SEM, AFM, FT-IR, TG. De asemenea s-a studiat stabilitatea preparatelor în solvenți organici, la temperatură și posibilitatea de reutilizare a acestora. Optimizarea reacțiilor de rezoluție racemică a fost realizată folosind un program experimental factorial și un sistem cu flux continuu „packed-bed”. Substraturile testate au fost 2-octanol și 1-feniletanol.

Cea de-a doua enzimă studiată în privința creșterii stabilității prin imobilizare a fost lacaza, iar ca suporturi au fost folosite rășini comerciale funcționalizate. Pentru obținerea unor biocatalizatori cu proprietăți catalitice bune s-a studiat încărcarea optimă a suportului utilizat la imobilizare cu lacază, profilul de pH al lacazei native și imobilizate, influența conținutului de apă și stabilitatea termică a preparatului enzimatic. Testarea proprietăților catalitice ale biocatalizatorilor cu lacază s-a realizat în reacția de oxidare a substratului model 2,6-dimetoxifenol.

Cea de-a treia enzimă studiată în privința creșterii stabilității prin imobilizare a fost peroxidaza, iar ca suporturi au fost folosite rășini comerciale funcționalizate. A fost testată selectivitatea enzimei native pentru degradarea a șase coloranți diferiți și efectul concentrației de apă oxigenată.

Studiile efectuate pentru caracterizarea biocatalizatorilor obținuți au fost: profilul de pH, stabilitatea termică și stabilitatea operațională, iar rezultatele au fost comparate cu enzima nativă.

1.2. Biocataliza și aplicațiile ei

Termenul **biocataliză** se utilizează pentru toate reacțiile chimice realizate folosind catalizatori biologici, incluzând transformările datorate unor reacții enzimatice în cascadă (cât și moleculelor de acid ribonucleic având rol catalitic), în toate celulele.

În practică, **procesele biocatalitice** se referă la procese chimice catalizate de enzime, iar biocataliza industrială cât și tehnologia enzimatică industrială fac referire la conversia industrială a unor substraturi sub acțiunea enzimelor [7].

La sfârșitul secolului al XX-lea, majoritatea chimiștilor erau de părere că enzimele sunt costisitoare, inflexibile în alegerea substratului și instabile la temperaturi ridicate, lipsite de activitate în mediile organice, în timp ce secolul XXI promite să fie epoca de aur a biotehnologiei și împreună cu aceasta și a biocatalizei [8].

Biocataliza a ajuns la nivelul industrial din prezent trecând prin câteva etape de cercetare tehnologică și inovație.

În prima etapă, în urmă cu mai bine de un secol, oamenii de știință au descoperit că anumite componente din celulele vii pot fi utilizate pentru realizarea unor transformări chimice utile (altele decât procesele fermentative care se cunosc de milenii), cum ar fi utilizarea proteazelor în detergenți, a penicilin acilazei G pentru producerea semi-sintetică a antibioticelor, etc. Principala provocare pentru aceste aplicații a fost stabilitatea limitată a biocatalizatorului și astfel de deficiențe au fost depășite prin imobilizare, care a facilitat și reutilizarea enzimei.

În timpul celei de-a doua etape a biocatalizei, în anii 1980 și 1990, tehnologiile inițiale de inginerie a proteinelor au dus la extinderea gamei de substraturi a enzimelor, ceea ce a permis sinteza unor intermediari sintetici noi. Această schimbare a dus la utilizarea biocatalizei pentru fabricarea intermediarilor farmaceutici și a altor compuși de sinteză fină.

A treia și actuala etapă a biocatalizei a pornit de la cercetările lui Pim Stemmer și Frances Arnold la mijlocul și sfârșitul anilor 1990. Ei au fost pionierii metodelor biologiei moleculare, care au dus la modificarea și extinderea rapidă a biocatalizatorilor. Aceste metode sunt denumite „evoluția dirijată a enzimelor”, deși acest termen a fost utilizat încă din 1972 pentru experimente realizate cu celule întregi. Versiunile inițiale ale acestei tehnologii implică cicluri iterative de schimbări aleatoare ale aminoacidului într-o proteină, urmată de selectarea sau screening-ul librărilor rezultate pentru a obține enzime modificate cu stabilitate, specificitate de substrat și enantioselectivitate îmbunătățite.

Ca urmare a progreselor făcute în cea de-a treia etapă a biocatalizei a devenit posibilă proiectarea unor enzime performante, cum ar fi enzime care pot accepta substraturi inerte anterior sau care pot schimba natura produsului care se formează.

Cu toate că în ultimii ani „evoluția dirijată a enzimelor” a dus la progrese majore în găsirea de noi funcționalități, există încă necesitatea de a perfecționa ingineria biocatalizatorilor. Tehnologiile de mare viteză „high-throughput screening”, cum ar fi cele bazate pe microfluide, au făcut și ele progrese enorme și au permis realizarea unui număr enorm de experimente în timp scurt, dar sunt încă limitate [9, 10].

Investițiile pe plan mondial în domeniul biotehnologiei sunt orientate spre mai multe aplicații, iar biocataliza industrială se află printre acestea. Peste 150 de procese biocatalitice sunt operate astăzi în diferite sectoare industriale, atât în industriile produselor chimice de bază „bulk chemicals” cât și a celor de sinteză fină „fine chemicals” (Figura 1.1) [8].

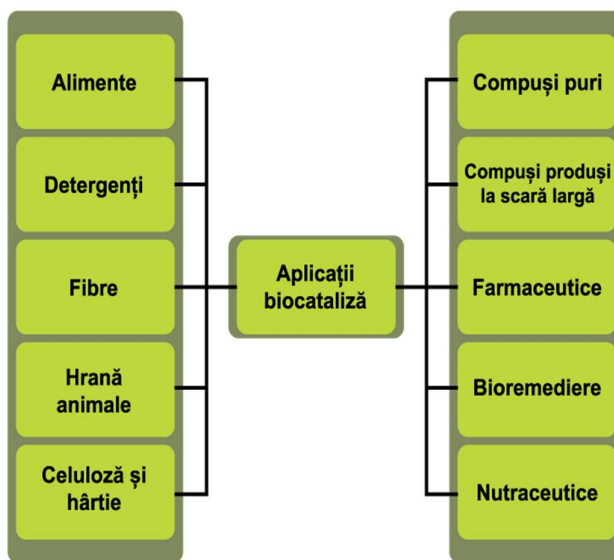


Figura 1.1. Sectoare industriale noi (dreapta) care se alătură sectoarelor industriale tradiționale în care se aplică biocataliza (stânga)

1.2.1. Enzimele

Enzimele reprezintă cel mai mare și mai divers grup de proteine, care catalizează reacții chimice în metabolismul tuturor organismelor. Enzimelor le sunt atribuite numere EC (Enzyme Commission), conform clasificării Comitetului pentru Nomenclatură Enzimatică (IUBMB), bazată pe tipul de reacție catalizată (de exemplu, oxidare, reducere, hidroliză, etc.). Pe această bază, enzimele sunt împărțite în șase clase. Aceste clase nu includ ribozime sau anticorpi catalitici. Prima cifră dintr-un număr EC indică clasa din care face parte enzima, a doua cifră reprezintă subclasa, a treia cifră reprezintă sub-subclasa iar a patra cifră reprezintă specificitatea enzimei pentru substrat [11-13].

Table 1.1. Cele șase clase de enzime și funcțiile acestora, conform Comisiei Internaționale pentru Enzime [12].

| Clase de enzime | Funcțiile enzimelor |
|----------------------|--|
| Oxidoreductaze (EC1) | reacții de oxidare/reducere |
| Transferaze (EC2) | transferul unor grupe funcționale |
| Hidrolaze (EC3) | reacții de hidroliză |
| Liaze (EC4) | scindează legături chimice prin reacții diferite de cele de oxidare și hidroliză |
| Izomeraze (EC5) | reacții de izomerizare |
| Ligaze (EC6) | formarea legăturilor cu scindarea ATP |

Enzimele sunt catalizatori remarcabili, capabili să accepte o gamă largă de molecule complexe ca substraturi și sunt foarte selective, catalizând reacții enantio- și regio- selective. Drept urmare, biocatalizatorii pot fi utilizați atât în transformări simple cât și în transformări complexe, fără a fi nevoie de etapele de blocare și de deblocare care sunt obișnuite în sinteza organică enantio- și regioselectivă. O astfel de selectivitate ridicată are ca rezultat reacții eficiente cu puțini produși secundari, enzimele devenind astfel o alternativă ecologică la catalizatorii chimici convenționali [14].

Toate enzimele sunt proteine, dar nu toate proteinele sunt enzime, diferența fiind că enzimele posedă activitate catalitică. Partea din structura terțiară a enzimei care este responsabilă de activitatea catalitică se numește „centru activ” al enzimei și reprezintă adesea 10-20% din volumul total al enzimei. Aici are loc reacția chimică [15].

De-a lungul anilor, s-au elaborat mai multe teorii pentru a descrie modul în care enzimele selectează și interacționează cu diverse substraturi. Începând cu modelul „lacăt-cheie” al lui Fischer (Figura 1.2) cu peste un secol în urmă, înțelegerea noastră asupra enzimelor a evoluat și include modelul de „potrivire indus” și modelele bazate pe selecția conformațională [16].

În modelul „lacăt-cheie” sugerat de Emil Fisher încuietoria (lacătul) simbolizează enzima iar cheia este substratul. Molecula enzimei oferă un șablon unic de care substratul se poate atașa perfect și ulterior interacționa. Odată ce enzima interacționează cu substratul se formează un complex enzimă-substrat (ES). După această tranziție produsul poate fi eliberat, iar enzima poate reacționa cu o altă moleculă de substrat [17].

În mecanismul „*lacăt-cheie*” reacțiile chimice și interacțiunile fizice devin o componentă importantă a activității catalitice și selectivității enzimei [18].

Modelul „*lacăt-cheie*” ar putea explica motivul pentru care transformarea unor moleculele mai mari decât centrul activ al enzimei dar cu reactivitate chimică similară nu sunt catalizate de enzimă, deoarece nu ele pot accesa centrul activ al enzimei. Aceeași analogie poate fi făcută și pentru moleculele mai mici, acestea nu ar putea fi catalizate deoarece nu se încadrează în centrul activ pentru a forma complexul ES. Cu toate acestea, modelul „*lacăt-cheie*” care susține că structura enzimei este rigidă nu a reușit să explice toate interacțiunile enzimă-substrat din diverse experimente.

Pentru a elimina această problemă a fost dezvoltată o nouă teorie numită „*potrivire indusă*”. Koshland (1958-1959) a constatat că o moleculă mai mică, ce se poate încadra în centrul activ și are structura stereochemică corectă, totuși nu a reacționat cu enzima. El a sugerat următorul model: substratul provoacă o schimbare în structura geometrică tridimensională a centrului activ, iar astfel substratul poate avea acces la centrul catalitic în orientarea și la distanța corectă. Această teorie se numește „*potrivire indusă*”. Modelul de „*potrivire indusă*” (Figura 1.3) presupune că enzima este flexibilă și conformația centrului activ poate fi modificată pentru a se potrivi substratului.

În modelul de „*potrivire indusă*” orientarea finală a stării active – pozițiile precise ale grupurilor catalitice și resturilor care intervin în cataliză - este indusă numai după ce legarea substratului modifică structura enzimatică.

Conform acestei teorii, există multiple stări conformaționale adoptate de enzimă, substratul având o afinitate mai mare pentru starea activă. Modelele prezentate reprezintă teorii utilizate pentru a raționaliza mecanismul prin care o enzimă își adoptă statutul catalitic funcțional. Cu toate acestea, ele nu reușesc să descrie alostericitatea [17,19].



Figura 1.2. Modelul „*lacăt-cheie*” pentru legarea substratului



Figura 1.3. Modelul „*potrivire-indusă*” pentru legarea substratului

1.2.1.1. Enzime cu importanță industrială și aplicațiile acestora

Enzimele hidrolitice, cum ar fi lipazele, protezele, glicozidazele și alte hidrolaze, rămân cele mai importante enzime comerciale, cu mult peste 90% din cota de piață. Aceste enzime hidrolitice sunt utilizate în principal în detergenți, hrană pentru animale, producția de bioetanol, producția de îndulcitori, industria băuturilor și a alimentelor, industria celulozei și hârtiei, industria textilă. Mai sunt utilizate și în sinteza organică, la îndepărtarea biofilmelor și în terapii digestive.

Cataliza enzimatică oferă mai multe avantaje cumulate: condiții blânde de reacție, specificitate de substrat un grad ridicat de chemo-, regio-, și enantioselectivitate, utilizarea unei cantități reduse de biocatalizator, posibilitatea de reutilizare a biocatalizatorilor, reducerea sau eliminarea produșilor secundari de reacție, realizarea unor reacții care în mod convențional necesită mai multe etape într-un singur proces fără a fi nevoie de etape de protecție/deprotejare.

Enzimele oferă astăzi o parte importantă din spectrul de catalizatori disponibili chimiei sintetice [20].

Tabel 1.2. Exemple de enzime și aplicații ale acestora [20]:

| |
|--|
| Acetolactat decarboxilaza liază se folosește la obținere berii și a vinului pentru a reduce timpul de maturare |
| Adenozin deaminaza este o adenozin deaminază de bovină și se folosește ca înlocuitor de enzimă pentru pacienți cu o eliminare inadecvată a 2-deoxiadenozinei. |
| Alcool dehidrogenaze: (ADH) pot fi atât (S) cât și (R) specifice, se folosesc pentru sinteza de compuși chirali |
| Amidaza se folosește pentru hidroliza enantioselectivă a aminoacizilor racemici |
| Amilaze și glucoamilaze (endo- și exoglucanază) sunt cele mai importante enzime în funcție de volum și cota de piață, cu o gamă largă de aplicații pentru obținerea de biocombustibili, sirop de porumb cu conținut ridicat de fructoză, etc. |
| Catalaza are multe aplicații în fabricarea brânzei, prepararea bumbacului pentru vopsire, degradarea peroxidului de hidrogen folosit pentru înălbirea sau dezinfectare materialelor, industria alimentară. |
| Celulaza este o enzimă hidrolitică folosită pentru obținerea celei de-a doua generație de biocombustibili, cât și în industria textilă. |
| Cutinaza are proprietăți hidrolitice similare cu ale lipazelor și esterazelor. Are aplicații potențiale în industria alimentară, cosmeticelor, pesticide, degradarea hidrolitică a polietilen tereftalatului (PET) |
| Esteraza este o enzimă hidrolitică utilizată în sinteza compusilor optici puri |
| β-Galactozidaza se folosește în industria alimentară pentru produsele fără lactoză |
| β-Glucanaza se utilizează pentru degradarea glucanilor din malț, în industria alimentară și industria berii. |
| Glutamat dehidrogenaza are aplicații la determinarea enzimatică a amoniacului în industria alimentară și în probele biologice. |
| Invertaza hidrolizează zaharoza la zahăr invertit (fructoză și zaharoză), care se folosește pentru siropul de glucoză-fructoză. |
| Izomeraza se folosește pentru obținerea siropului de glucoză-fructoză și a siropului de fructoză, prin izomerizarea glucozei rezultate la hidroliza amidonului |
| Lactoperoxidaza , împreună cu glucozoxidaza, sunt utilizate în reacții tip cascadă, deoarece în prezența glucozei generează <i>in situ</i> produși antimicrobiali utilizați în cosmetică (Biovert) |

| |
|--|
| Lipaza este o enzimă hidrolitică foarte utilizată în industria alimentară, textilă, a detergentilor sau în sinteza organică, de exemplu pentru acilare enantioselectivă sau esterificare. |
| Lacaza este o oxidoreductază utilizată în industria hârtiei, textilă, aromelor și parfumurilor, industria alimentară, la epurarea apei reziduale. |
| Termolisina este o metaloprotează utilizată în producția aspartamului. |

1.2.2. Lipaze utilizate în procese biocatalitice

Lipazele (triacilglicerol acilhidrolaze EC 3.1.1.3) au fost descrise ca fiind unele dintre cele mai promițătoare enzime pentru utilizarea în sinteza organică [21,22].

De-a lungul timpului au fost dezvoltate cu succes noi aplicații biotehnologice folosind lipaze pentru sinteza biopolimerilor și a biodieselului, a obținerii de compuși farmaceutici enantiopuri, chimicale utilizate în industria agricolă și arome [23].

Există o varietate de surse naturale de lipaze, cum ar fi plantele, animalele și microorganismele (în special bacterii și ciuperci). Provenind din diferite surse, lipazele au variații considerabile în specificitățile lor de reacție [21].

Lipazele prezintă interes deosebit ca biocatalizatori, datorită gamei variate de reacții pe care le pot cataliza (Figura 1.4) [24].

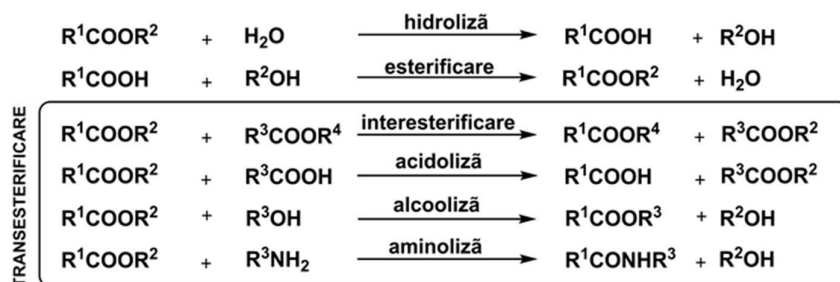


Figura 1.4. Reacții catalizate de lipaze

Mecanismul reacției de transesterificare catalizată de lipaze

Mecanismul lipazei implică triada catalitică Asp-His-Ser. Gruparea carboxilat a acidului aspartic este legată prin legături de hidrogen de histidină și azotul histidinei este legat tot prin legături de hidrogen de guparea -OH a serinei. Primul pas al reacției este creșterea nucleofilicității grupării -OH a serinei sub acțiunea histidinei, care atrage protonul -OH-ului serinic, formând un oxianion. Oxianionul format atacă apoi substratul (carbonul din gruparea carbonil), formând un intermediar tetraedric 1 (Figura 1.5). Oxianionul format este stabilizat de aminoacizii din apropiere (aspartat și histidină), prin legături de hidrogen. Apoi, electronii de pe oxianion sunt transferați înapoi la gruparea carbonil, iar protonul histidinei este transferat digliceridei, care este eliberată/formată ulterior.

Esterul format al serinei reacționează cu alcoolul pentru a finaliza transesterificarea. Azotul histidinei îndepărtează hidrogenul din molecula de alcool, formând astfel anionul de alchiloxid. Acesta atacă carbonul carbonilic, iar oxianionul

intermediar este stabilizat printr-o legătură de hidrogen (intermediarul tetraedric 2), după care electronii sunt transferați înapoi la carbonul grupării carbonil și se formează acidul gras liber. Oxigenul serinei recuperează apoi hidrogenul de la histidină, pentru a restabili legătura de hidrogen.

Acidul aspartic servește la extragerea sarcinii pozitive a histidinei în perioadele în care este complet protonată [25].

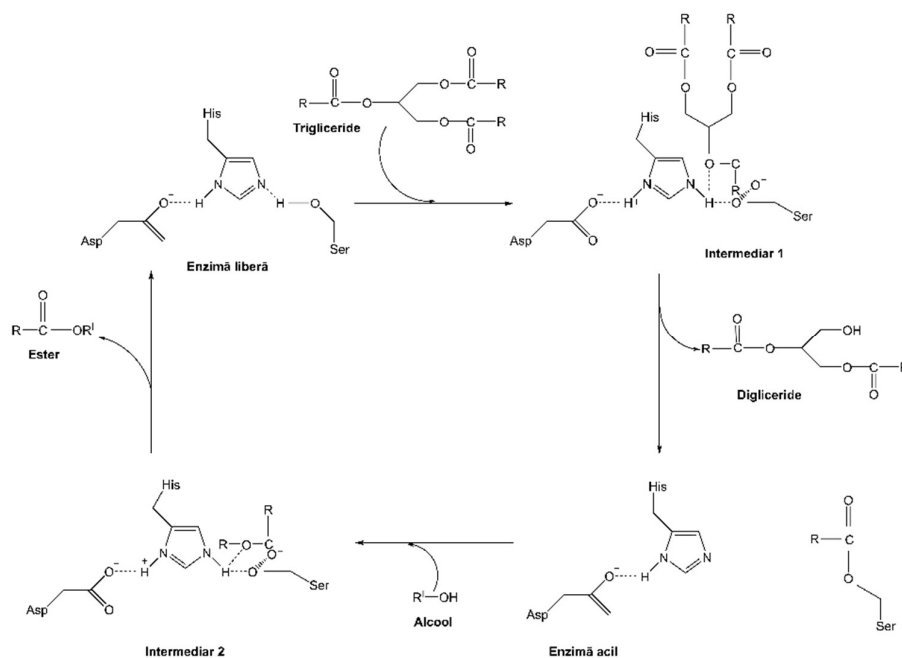


Figura 1.5. Mecanismul reacției de transesterificare catalizată de lipaze

1.2.2.1. Lipaza din *Candida antarctica*

Drojdia *Candida antarctica* produce două lipaze diferite, A și B. Așa cum este indicat de numele drojdiei, această tulpină a fost izolată inițial în Antarctica, cu scopul de a găsi enzime cu proprietăți extreme. Ambele lipaze A și B au fost purificate și caracterizate.

Cele două lipaze sunt foarte diferite. Astfel lipaza Cal A este dependentă de calciu și este foarte termostabilă, în timp ce lipaza Cal B este mai puțin termostabilă dar independentă de calciu. De asemenea, cele două lipaze diferă între ele prin specificitatea de substrat. Lipaza Cal A este activă într-o manieră nespecifică față de trigliceride. De fapt, această lipază are o preferință unică față de gruparea sn-2 a esterilor și are o activitate scăzută față de esterii simpli. În contrast, lipaza Cal B este mai puțin activă față de trigliceridele mari, dar foarte activă față de o gamă largă de esteri, amide și tioli [26].

Tabel 1.3. Caracteristici ale lipazei Cal A, comparativ cu Cal B [27].

| | Cal A | Cal B |
|---|------------------|--------------|
| masă moleculară (kDa) | 45 | 33 |
| punct izoelectric (pI) | 7,5 | 6,0 |
| pH optim | 7 | 7 |
| activitate specifică (LU/mg) | 420 | 435 |
| termostabilitate la 70°C ^a | 100 [100] | 15 [0] |
| interval pH stabil ^b | 6-9 | 7-10 |
| activare interfacială | Da (dar scăzută) | Nu |
| specificitate de poziție față de trigliceride | sn-2 | sn-3 |

^aActivitatea reziduală după incubare la 70°C în 0,1M soluție tampon Tris (pH 7,0) timp de 20 min și 120 min., ^bvaloare de pH la care mai mult de 75 % din activitate este recuperată după incubare timp de 20 h la temperatura camerei.

Lipaza *Candida antarctica* B (Cal B) este o proteină monomerică formată din 317 de resturi de aminoacizi, cu dimensiuni de 3-40-20 Å. Este un multitriptofan (Trp 52, 65, 104, 113 și 155) și multitirozină (Tyr 61, 82, 91, 135, 183, 203, 234, 235, 300). Aparține familiei α/β -hidrolazelor, cu o triadă catalitică formată din Ser, Asp/Glu și His, o caracteristică a tuturor hidrolazelor serice. Centrul activ al Cal B constă din triada catalitică comună Ser105 - Asp187 - His224 și spre deosebire de cele mai multe lipaze, nu are nici un capac care să acopere intrarea în centrul activ și astfel nu apare fenomenul de activare interfacială. Lipaza Cal B este un catalizator eficient pentru reacții de hidroliză, dar și de esterificare în solvenți organici [28].

Comparativ cu alte lipaze, Cal B are un spațiu limitat în centrul activ și prin urmare poate să prezinte un grad ridicat de selectivitate, în special pentru substraturile alcoolice. Are însă un grad ridicat de specificitate și față de donorii de acil. Enzima are o preferință catalitică pronunțată față de enantiomerul (*R*) al alcoolilor secundari. Această selectivitate poate fi utilizată, în funcție de produsul izolat, atât pentru a produce atât enantiomerul (*-R*) cât și enantiomerul (*-S*) [26].

Lipaza *Candida antarctica* A (Cal A): Unitatea cristalografică asimetrică conține doi monomeri ai Cal A. Aceștia nu se leagă între ei sau cu molecule cu simetrie asemănătoare și astfel nu formează un dimer.

La fel ca și Cal B, face parte din familia α/β -hidrolazelor. Cal A are un domeniu discret de capac. Capacul este format din 217-308 reziduuri de aminoacizi. Există o cavitate între domeniul α/β -hidrolazei și capac. Trei reziduuri din această cavitate formează triada centrului activ Ser184 - Asp334 - His336. Ser 184 este nucleofilul care atacă substratul pentru a forma intermediarul acil-enzimă.

Serina este activată de resturile de histidină și acid aspartic în așa numita „triadă catalitică” mecanismul fiind același pentru toate hidrolazele serice [29].

În reacția de interesterificare a trigliceridelor, lipaza Cal A este mai degrabă neselectivă. Studiile efectuate nu au dezvăluit nici o specificitate neobișnuită în esterificarea alcoolilor simpli și s-a constatat că are o activitate specifică relativ scăzută în comparație cu multe alte lipaze. Nu au existat indicii că enzima posedă caracteristici unice, în afară de termostabilitatea extrem de ridicată [27].

1.2.2.2. Lipaze din *Pseudomonas sp.*

Lipaza din *Burkholderia cepacia* (Amano PS): cunoscută anterior ca lipaza din *Pseudomonas cepacia*, este o enzimă extracelulară și este una dintre cele mai utilizate enzime ca biocatalizator.

Utilizarea extensivă a acestei lipaze se datorează capacității sale de a recunoaște o mare varietate de substraturi, rezistenței la temperaturi ridicate și toleranței față de solvenți organici.

Amano PS este o polipeptidă formată din 320 de reziduuri de aminoacizi și are o masă moleculară de 33128 Da. Centrul activ include triada catalitică Ser87 - His286 - Asp264. Stereo- și regioselectivitatea lipazei Amano PS a fost mult studiată. În diferite publicații s-a încercat corelarea schimbărilor conformaționale ale lipazei cu selectivitatea acesteia. Enantioselectivitatea lipazei Amano PS a fost modificată folosind tehnici de mutație genetică. Tehnicile de acest tip au fost utilizate și pentru a îmbunătăți selectivitatea pentru acizi grași [30].

Lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK): lipazele *Pseudomonas* au fost clasificate în trei grupuri (1,2 și 3) pe baza secvențelor de aminoacizi. Lipaza Amano AK are o masa moleculară de 50 kDa și îi lipsește semnalul N-terminal al unei peptide și un reziduu Cys [31,32].

Lipaza Amano AK preferă acizii grași de mărime mică și medie, hidrolizează legăturile atomilor de carbon primari (ex. legăturile C1 și C3 ale glicerolului) și legăturile atomilor de carbon secundari ai esterilor [33].

1.2.2.3. Stabilitatea lipazelor în solvenți organici și la temperatură

Lipazele (EC 3.1.1.3) pot cataliza reacții diverse, cum ar fi amidarea, esterificarea și transesterificarea esterilor în medii anhidre, pentru diferite substraturi, fără a-și schimba stereoselectivitatea și regioselectivitatea [34]

Procesele industriale de biotransformare pot fi realizate în condiții dificile, la valori extreme ale pH-ului și temperaturii, presiune înaltă, în prezența sărurilor, metalelor și solvenților organici.

De regulă, substraturile și/sau produșii lipazelor/esterazelor nu sunt solubile în apă [35]. Stabilitatea termică este de asemenea o cerință majoră pentru enzimele comerciale, fiind critică pentru aplicațiile industriale, deoarece denaturarea termică este o cauză comună a inactivării enzimei [36]. Prin urmare, o proprietate relevantă cu potențial în aplicațiile biotehnologice este toleranța enzimei la solvenți organici și la temperaturi ridicate [35].

a) Stabilitatea lipazelor în solvenți organici

Cea mai importantă problemă de utilizare a enzimelor în prezența solvenților organici este natura non-nativă a solventului organic pentru funcțiile catalitice ale enzimei.

Activitatea și stabilitatea enzimelor depind de natura solventului (miscibil cu apă sau nemiscibil, protică sau aprotică etc.) și conținutul de apă al enzimei [35].

Deoarece stabilitatea unei enzime în solvenții hidrofilici poate fi redusă datorită efectului de pătrundere a solventului pe suprafața enzimei, determinând denaturarea structurii proteinelor, stabilizarea enzimei pentru utilizarea în astfel de solvenți este o problemă importantă pentru aplicațiile industriale [35, 37].

Conformația catalitică a enzimelor este cea din soluțiile apoase, iar reziduurile de aminoacizi din structura enzimei apropiate de centrul activ interacționează în mod obișnuit cu moleculele de apă. Astfel, inactivarea enzimei și instabilitatea sunt inevitabile în prezența moleculelor organice.

Mohtashami și colab. au investigat influența solvenților protici și aprotici (metanol și hexan) asupra structurii lipazei din *Burkholderia cepacia* și lacazei din *Trametes versicolor*, folosind simularea de dinamici moleculare. S-a constatat că structura terțiară a enzimelor este factorul determinant în stabilitatea lor, atât față de molecule organice polare cât și nepolare. S-a mai constatat că structurile beta sunt mai predispuse la destabilizare în solvenții organici, comparativ cu structurile secundare de helix [38, 39].

b) Termostabilitatea lipazelor

Termostabilitatea unei enzime se referă la rezistența sa de a atinge forma denaturată ireversibil [40].

Biocatalizatorii termostabili permit realizarea reacțiilor la temperaturi mai ridicate, ceea ce are avantajele reactivității mărite (viteză de reacție mai mare, restricții de difuzie mai scăzute), randamentului superior al procesului (creșterea solubilității produșilor și substraturilor), vâscozității mai scăzute și reducerea problemelor de contaminare [41].

Ca și în cazul solvenților, temperatura are efect negativ asupra reziduurilor flexibile din apropierea centrului activ al enzimelor, care sunt esențiale atât pentru cataliză cât și pentru legarea substratului de enzimă. Se știe relativ puțin despre rolul acestora în stabilitatea enzimelor. Factorul B (sau valoarea B), este utilizat pentru a reprezenta flexibilitatea reziduurilor și indică parametrii de deplasare atomică obținuți din datele cu raze X. Reziduurile flexibile, care au mai puține interacțiuni cu alți aminoacizi, pot produce modificări locale în interiorul unor rețele foarte complexe de conexiuni necovalente. Reziduurile determină/declanșează denaturarea ireversibilă a enzimei, datorită instabilității lor termice mari. Prin urmare, introducerea de mutații pentru rigidizarea reziduurilor flexibile poate fi o modalitate eficientă de a îmbunătăți termostabilitatea enzimelor. Cu toate acestea, stabilizarea reziduurilor flexibile numai pe baza analizei factorului B, fără a lua în considerare alți factori structurali, are rezultate limitate [39].

Metodele utilizate cel mai frecvent pentru depășirea problemelor de stabilitate a enzimelor sunt utilizarea diferitelor tehnici de imobilizare și recurgerea la mutageneză enzimatică (combinația ambelor fiind, de asemenea, posibilă) [42].

S-a dovedit că imobilizarea a îmbunătățit stabilitatea termică a enzimelor în special la temperaturile critice la care enzimele încep să își piardă activitatea. Studiile care au evaluat stabilitatea termică nu oferă însă informații privind modul în care imobilizarea a afectat conformațiile acestor enzime. Sunt necesare mai multe studii comparative cu enzime la temperaturi mai ridicate pentru a elucida efectele imobilizării asupra relației stabilitate-activitate [37].

În prezent *imobilizarea enzimelor și a celulelor întregi* este metoda esențială pentru dezvoltarea proceselor biocatalitice, ce vizează îmbunătățirea stabilității operaționale a enzimei pentru permiterea utilizării acestora *în solvenți organici și la temperaturi ridicate, în reactoare*. Imobilizarea duce și la o separare mai ușoară a biocatalizatorului de amestecul de reacție, ceea ce face posibilă reutilizarea sa [43, 44].

În cadrul acestei teze, au fost efectuate studii privind efectul de denaturare a solvenților organici și al temperaturi asupra lipazelor din *Pseudomonas fluorescens*,

Burkholderia cepacia și *Candida antarctica* B native și imobilizate. Imobilizarea s-a realizat prin entrapare în sol-gel (SGE-1) și entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite 545 (SGE-A).

1.3. Oxidaze și utilizarea lor în biotehnologii

1.3.1. Lacaze

Lacazele (benzendiol: oxigen reductaze, EC 1.10.3.2) aparțin unui grup mic de enzime numite proteine de cupru, care catalizează oxidarea diverselor substraturi cu reducerea simultană a oxigenului molecular la apă [45, 46].

Lacaza este una dintre puținele enzime care au fost subiect de studiu de la sfârșitul secolului trecut. A fost descrisă pentru prima dată de Yoshida când a extras-o din exudatele copacului japonez *Rhus vernicifera*. Caracteristica lacazelor este dată de cei patru atomi de Cu pe care îi conține în structură, caracteristică descoperită de Bertrand [47,48].

Lacaza se găsește într-o varietate mare de plante și ciuperci, cât și în bacterii. În plante, lacaza a fost identificată în copaci, varză, napi, sfeclă, mere, cartofi, pere și în alte vegetale. Lacaza a fost de asemenea găsită într-o multitudine de insecte: *Bombys*, *Calliphora*, *Diploptera*, *Drosophila*, *Lucilia*, *Manduca*, *Musca*, *Oryctes*, *Papilio*, *Phormia*, etc. [49].

În 1896 atât Bertrand cât și Laborde au observat pentru prima dată prezența lacazei în ciuperci [47,48].

Majoritatea lacazelor descrise în literatură au fost izolate din ciuperci: ascomycetes, deuteromycetes și basidiomycetes. Lacaza din *Monocillium indicum* a fost prima lacază caracterizată dintr-o ascomycete, având activitate peroxidativă. Cei mai frecvenți producători de lacaze sunt ciupercile care produc putrefacția lemnului *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea*, *Trametes villosa*, *Trametes gallica*, *Cerena maxima*, *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus eryngii*, etc.

Spre deosebire de plante și ciuperci, unde lacazele sunt foarte răspândite, activitatea lor a fost raportată doar în câteva bacterii, care includ: *Azospirillum lipoferum*, *Marinomonas mediterranea*, *Streptomyces griseus* și *Bacillus subtilis* [49].

Mecanism: Cataliza cu lacaze se datorează prezenței unor centre diferite de cupru în molecula enzimatică. Toate lacazele sunt caracterizate prin prezența a cel puțin unui atom de cupru tip-1 (T1) care este responsabil de culoarea albastră și unde are loc și oxidarea substratului reducător, împreună cu cel puțin alți trei atomi de cupru suplimentari: un atom de tip-2 (T2), și doi atomi de tip-3 (T3), aranjați într-un grup trinuclear unde oxigenul molecular este redus la două molecule de apă [50,51].

În Figura 1.6, domeniile cupredoxin (D1, D2 și D3) sunt reprezentate cu verde, albastru și roz. Sferile albastre violete reprezintă ioni de cupru, iar sferile roșii reprezintă coordonarea moleculelor de apă. Reziduurile căii interne de transfer de la Cu-T1 la grupul trinuclear Cu-T2/T3 sunt reprezentate cu galben. Reziduurile implicate în prima sferă de coordonare catalitică a ionilor de cupru și interacțiunea acestora sunt reprezentate prin linii punctate negre [51].

Moleculele de substrat sunt legate în apropierea centrului T1-Cu, care este mai mic decât centrul de legare al oxigenului (molecula de substrat este oxidată de către centrul T1-Cu). Are loc obstrucționarea unui electron (format în urma oxidării substratului) printr-un mecanism care implică substratul și centrul T1-Cu. Astfel,

moleculile de substrat sunt transformate în radicali liberi, care pot fi supuși unei alte reacții de oxidare sau de cuplare radicalică, având ca rezultat formarea de oligomeri sau polimeri.

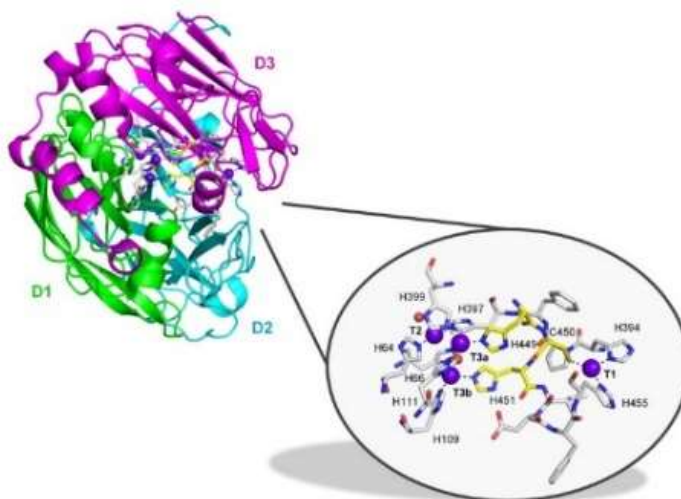


Figura 1.6. Structura generală și detaliile centrului activ al lacazei (*Trametes trogii*) [51].

[51] Reprinted from *Biotechnology Advances*, Vol 33 / (1), D. M. Mate, M. Alcalde, Laccase engineering: From rational design to direct evolution, Pages No. 25-40, Copyright 2015, with permission from Elsevier

Electronul obstructionat se deplasează de la centrul T1-Cu la clusterul trinuclear printr-o cale cisteină-histidină. Centrul trinuclear, care joacă un rol important în mecanismul catalitic, este format din ionii de cupru de tip-2 și tip-3. Procesul catalitic începe după ce moleculele de oxigen se atașează de cluster-ul trinuclear și inhibă/blochează intrarea ulterioară a oricărei alte molecule. Centrul T2-Cu reacționează cu două molecule de histidină și o moleculă de apă, în timp ce centrul T3-Cu reacționează cu trei molecule de histidină și o moleculă de hidroxid.

În etapa finală, molecula de oxigen este transformată în apă de lacază, în două etape. În prima etapă, primul electron este redus de centrul T2-Cu și T3-Cu, în timp ce reducerea celui de-al doilea electron este asistată de mediatorul de peroxid care are o legătură cu centrul T2-Cu și T1-Cu, legat de centrul T3-Cu prin legături covalente cistidină-histidină [52,53].

1.3.1.1. Sistemul mediator al lacazei

În general lacazele au un potențial de oxidare scăzut, care restricționează procesul de oxidare la grupările fenolice. Totuși, aceste enzime pot prezenta o capacitate mare de oxidare și față de compuși non-fenolici, în prezența unui mediator. Anumite molecule de mediator pot acționa ca purtători de electroni între substrat și enzimă (Figura 1.7). Mediatorii modulează potențialul redox al sistemului de reacție și prin urmare extind domeniul de aplicare al lacazelor și la structurile non-fenolice [48,54].

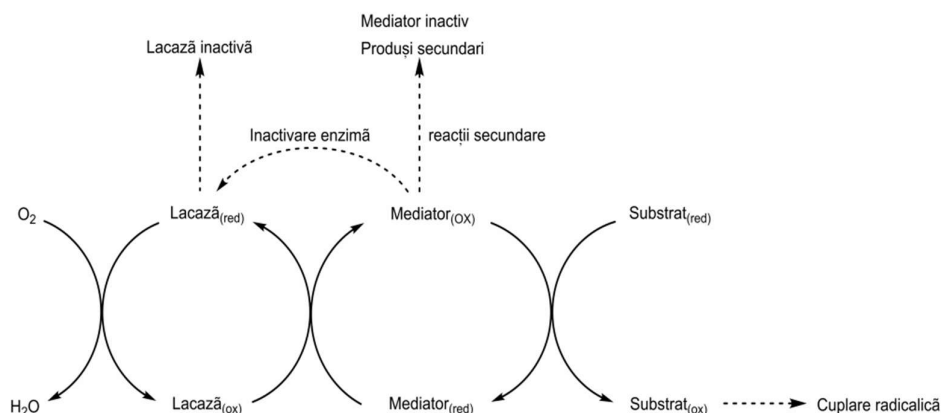


Figura 1.7. Sistemul catalitic mediator de oxidare a lacazei și potențialele efecte secundare nedorite

Prima substanță identificată ca mediator al lacazei a fost 1-(3-cloro-4-metoxifenil)etanol (ABTS). Acesta este oxidat (pierde un electron) în prezența lacazei, pentru a produce 1-(3-clor-4-metoxifenil)etanona, cu reducerea oxigenului la o moleculă de apă. În continuare, 1-(3-cloro-4-metoxifenil)etanona suferă o altă transformare structurală pentru a forma 2-cloro-1,4-dimetoxibenzen și 3-cloro-4-metoxibenzaldehidă [54]. S-au descoperit și alte substanțe care pot funcționa ca mediatori ai lacazelor, în special compuși cu funcțiuni N-hidroxi și s-a constatat că aceștia prezintă potențiale redox ridicate și reactivitate puternică față de lignină. Compușii N-hidroxicilici care prezintă reactivitate redox sunt: 1-hidroxibenzotriazolul (HBT), urmat de acidul violuric (VLA), N-hidroxiftalimida (HPI) și TEMPO.

Au fost identificate trei mecanisme de reacție pentru oxidarea substraturilor non-fenolice prin intermediul mediatorilor și anume: (1) transferul de electroni (ET), (2) transferul atomilor-radicali de hidrogen (HAT) și (3) mecanismul ionic.

ABTS folosește calea ET, în timp ce compuși N-hidroxicilici precum HBT, VLA sau HPI efectuează transferul atomilor-radicali de hidrogen.

Pentru radicalul stabil TEMPO și derivații acestuia (de ex. peroxi) este propus un mecanism ionic, în care lacaza oxidează radicalul stabil oxil la ionul de oxoamoniu, care apoi obstrucționează α -protonul substratului. Reciclarea hidroxilaminei rezultate nu este încă pe deplin înțeleasă, dar Arendes și colab. au propus o re-oxidare catalizată de lacază ca fiind mai probabilă decât oxidarea cu oxigen sau cu ionul de oxoamoniu [48].

1.3.1.2. Aplicații ale lacazelor

Există multe aplicații potențiale pentru lacaze în diferite industrii și sectoare tehnologice, cele mai importante fiind:

- *Industria alimentară*: se pot utiliza în anumite procese care îmbunătățesc sau modifică aspectul culorii alimentelor sau băuturilor, la determinarea acidului ascorbic, gelifierea pectinei, în panificație [55].
- *Industria hârtiei*: s-a demonstrat că utilizarea lacazelor poate substitui reactivii care conțin clor folosiți în industria de prelucrare a hârtiei, reducând astfel poluarea cauzată de compușii organici cu clor [56].
- *Industria textilă*: înălbirea și vopsirea fibrelor, modificarea și/sau îmbunătățirea proprietăților textilelor. Bioremedierea apelor uzate folosite în industria textilă reprezintă de asemenea o aplicație importantă a lacazelor [57].
- *Biocombustibili*: se folosesc pentru polimerizarea și îndepărtarea compușilor fenolici care inhibă fermentația zaharurilor prezente în materialul hidrolizabil lignocelulozic [58].
- *Chimia organică*: lacazele pot fi utilizate în chimia sintetică pentru fabricarea polimerilor și compușilor farmaceutici [59].
- *Nanotehnologii*: dezvoltarea celulelor de biocombustibil (imobilizate pe catod pentru furnizarea de energie) și biosenzorilor pentru a detecta diferiți compuși și metaboliți (ex. determinarea glucozei, compușilor fenolici și aminelor aromatice) [60].
- *Industria cosmetică*: decolorarea și/sau vopsirea părului implică de obicei utilizarea de substanțe chimice dure, care pot deterioara părul. Precursorii de coloranți pot fi oxidați la agentul colorant folosind lacază, în locul agentului chimic [61].

1.3.2. Peroxidaze

Hreanul (*Armoracia rusticana*) este o plantă perenă rezistentă, cultivată în regiuni temperate ale lumii în principal pentru valoarea culinară a rădăcinilor sale. Aceasta este, de asemenea, o sursă bogată de peroxidază, o enzimă care conține hem și care utilizează apa oxigenată pentru oxidarea unei mari varietăți de compuși organici și anorganici.

Producerea peroxidazei din rădăcinile de hrean are loc la scală relativ mare datorită utilizărilor comerciale ale enzimei, de exemplu ca și componentă a kiturilor de diagnostic clinic.

Deși termenul peroxidază de hrean este folosită oarecum generic, rădăcina plantei conține o serie de izoenzime peroxidazice din care izoenzima C (HRP) C este cea mai abundentă. Izoenzima C peroxidază din hrean cuprinde un singur polipeptid format din 308 reziduuri de aminoacizi, secvența care a fost determinată de Welinder în 1976. Capătul N-terminal este blocat de piroglutamat, iar capătul C-terminal este eterogen, din unele molecule lipsind Ser308. Există 4 punți disulfidice între reziduurile de cisteină 11–91, 44–49, 97–301 și 177–209 și o punte de sare îngropată între Asp99 și Arg123[62].

Peroxidazele folosesc apa oxigenată sau hidroperoxizi organici ca și co-substrat pentru a cataliza oxidarea unei game largi de substraturi organice și anorganice.

Aceste enzime sunt capabile să degradeze poluanții eficient datorită specificității ridicate. Este important să se adăuge cantitatea corectă de apă oxigenată, deoarece adăugarea unor cantități în exces poate inactiva enzima.

Reacțiile cu peroxidază au loc atunci când enzima reacționează cu o moleculă de apă oxigenată, enzima va fi oxidată pentru a genera un radical cationic, care se numește Compus I, iar H_2O_2 va fi redusă la apă. Apoi, Compusul I va suferi o reducere și oxidează un substrat organic pentru a forma Compusul II și radicalul organic (Figura 1.8).

În cele din urmă, Compusul II oxidează o a doua moleculă organică pentru a da un alt radical organic, iar enzima va fi redusă la forma sa de repaus. Radicalii organici liberi, care se formează în timpul procesului, sunt responsabili de degradarea poluanților [63].

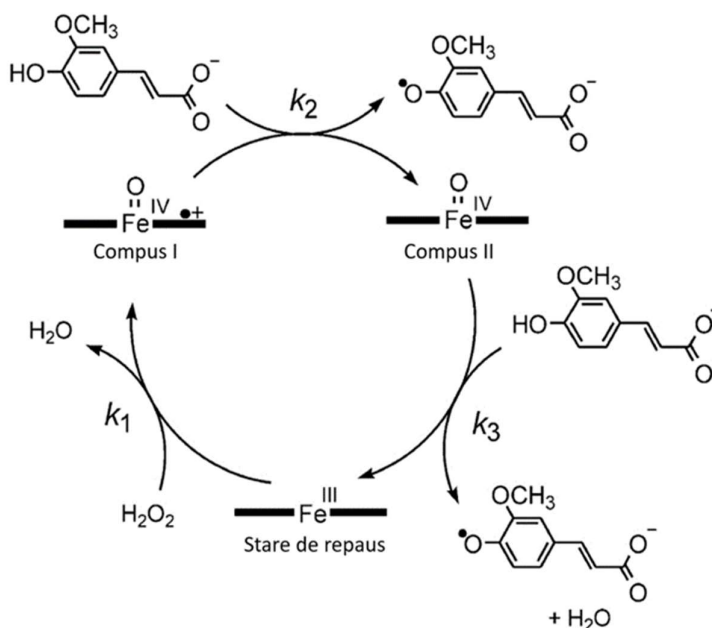


Figura 1.8. Ciclul catalitic al peroxidazei din hrean (HRP C) cu ferul ca substrat reducător. Constantele de viteză k_1 , k_2 și k_3 caracterizează viteza de formare a Compusului I, viteza de reducere a Compusului I, respectiv viteza de reducere a Compusului II [62].

1.4. Imobilizarea enzimelor

Imobilizarea a fost descoperită în 1916, când s-a demonstrat că activitatea invertazei nu este împiedicată atunci când enzima este adsorbită pe o matrice solidă,

cum ar fi cărbunele sau hidroxidul de aluminiu. Acest aspect a dus la dezvoltarea tehnicilor de imobilizare disponibile în prezent.

Tehnicile inițiale au avut încărcări cu enzimă foarte scăzute, în funcție de suprafețele disponibile. La sfârșitul anilor 90 s-au dezvoltat diferite metode covalente de imobilizare a enzimelor. Cu toate că imobilizarea enzimelor a fost studiată de mai mulți ani, apariția în ultima perioadă a unui număr mare de lucrări de cercetare și de sinteză indică un interes continuu în acest domeniu [64,65].

Aplicațiile enzimelor la nivel industrial sunt limitate de lipsa stabilității operaționale pe termen lung și de recuperarea și reutilizarea dificilă a enzimei. Aceste dezavantaje pot fi depășite adesea prin imobilizarea enzimei [66,67].

O enzimă imobilizată este o enzimă care este atașată fizic de o matrice insolubilă în apă, suport, transportor, sau izolarea biomoleculilor într-o anumită regiune din spațiu prin metode chimice [68,69].

Enzima imobilizată poate fi descrisă cu două seturi de variabile: parametri non-catalitici și parametri catalitici. Parametri non-catalitici sunt legați de natura fizică și chimică a părții non-catalitice, în special forma, mărimea și lungimea, în timp ce parametri catalitici sunt legați de funcțiile catalitice, cum ar fi activitatea, selectivitatea și stabilitatea enzimei (Tabel 1.4) [70].

Tabel 1.4. Criterii pentru obținerea de enzime imobilizate robuste

| Parametri | Cerințe | Beneficii |
|------------------------|---|--|
| Funcții non-catalitice | Forma și dimensiunea particulei să fie potrivite Obținere/preparare ușoară | Separare ușoară, controlul reacției este simplificat Designul reactorului sa fie flexibil |
| | Stabilitate mecanică ridicată | Structura internă nu suferă modificări semnificative |
| | Stabilitate chimică ridicată | Nu are loc descompunerea catalizatorului solid, ne-contaminare |
| Funcții catalitice | Activitate ridicată (U/g) | Productivitate ridicată în timp și spațiu |
| | Selectivitate ridicată | Număr scăzut de reacții secundare, ușurința separării produșilor, poluare redusă |
| | Specificitate de substrat largă | Toleranță la variații ale structurii substratului |
| | Stabilitate în solvenți organici | Modificarea echilibrului de reacție în prezența solvenților organici |
| | Termostabilitate | Reducerea timpului de reacție prin creșterea temperaturii |
| Proces | Stabilitate operațională | Eficientizarea costurilor de producție |
| | Stabilitate conformatională | Modularea proprietăților enzimelor |
| | Reutilizare Spectru larg de utilizare | Cost redus al catalizatorului |

| | | |
|--------------------------------------|---|---|
| | Reproductibilitate Design ușor și rapid | Toleranță la variații de proces Asigură calitatea produsului Înțelegere bună a procesului de dezvoltare |
| Considerații economice și ecologice | Volum redus Ușor de separat Design rațional Utilizare în siguranță | Costuri reduse pentru manipulare Pericol mai redus pentru mediu Evitarea testărilor laborioase Îndeplinirea cerințelor de protecția mediului |
| Drepturi de proprietate intelectuală | Inovativ Atractiv Competitiv | Protecția drepturilor de proprietate intelectuală Autorizat/cu licență Consolidarea poziției în marketing |

Funcțiile catalitice sunt concepute pentru a atinge activitatea dorită, selectivitate, specificitatea substratului, productivitatea și randamentul în spațiu-timp.

Scopul este acela de a avea mai puține reacții secundare, toleranță ridicată la variațiile structurale ale substraturilor, productivitate ridicată, randament spațiu-timp și durabilitate ridicată a catalizatorului [70].

1.4.1. Avantajele și dezavantajele imobilizării

Există mai multe motive pentru utilizarea unei enzime într-o formă imobilizată. Pe lângă manipularea mai convenabilă a enzimei, imobilizarea asigură o separare ușoară a enzimei de produs, reducând astfel la minimum sau eliminând contaminarea cu proteine a produsului.

Imobilizarea facilitează, de asemenea, recuperarea eficientă și reutilizarea enzimelor costisitoare, în multe aplicații fiind o condiție indispensabilă pentru viabilitatea economică și utilizarea enzimelor în sisteme continue „fixed-bed”.

Un avantaj suplimentar este o stabilitate adesea sporită, atât în condiții de depozitare cât și în condiții de reacție, de exemplu față de denaturarea datorată căldurii, solvenților organici sau autolizei. Performanța îmbunătățită a enzimelor prin stabilitatea mărită și reutilizarea repetată se reflectă în productivitățile mai mari ale catalizatorului (kg produs/kg enzimă) care, la rândul lor, determină costurile enzimelor per kg de produs.

Imobilizarea este în general necesară pentru o performanță optimă în solvenți organici. În metoda tradițională de utilizare a enzimelor ca pulberi liofilizate, multe dintre moleculele enzimatică nu sunt ușor accesibile moleculelor de substrat. În plus, liofilizarea poate provoca perturbații structurale pronunțate, ducând adesea la dezactivare. Spre deosebire de aceasta, dispersia moleculelor de enzime prin imobilizare asigură, în general, o mai bună accesibilitate și/sau o stabilizare suplimentară a enzimelor față de denaturarea în mediul organic.

Un alt beneficiu al imobilizării este acela că permite utilizarea enzimelor în procesele în cascadă multi-enzimatică și chemo-enzimatică.

O problemă majoră întâlnită în proiectarea proceselor în cascadă catalitică este incompatibilitatea diferiților catalizatori și o posibilă soluție este imobilizarea acestora, înlăturând astfel interacțiunea reciprocă care ar putea avea ca rezultat inhibarea și/sau dezactivarea. O imobilizare controlată poate deveni nu numai o soluție pentru îmbunătățirea stabilității enzimei, dar poate să reducă și inhibarea enzimei, să îmbunătățească selectivitatea sau specificitatea enzimei [67,71,72,73].

Reticiența industriei de a utiliza enzime imobilizate are de-a face cu anumite dezavantaje ale acestor tehnici și anume pierderea activității și costul fabricării. Activitatea enzimatică este adesea mai redusă în urma imobilizării, datorită modificărilor conformaționale apărute în structura enzimei și limitării datorate transferului de masă mai anevoios.

De asemenea, metodele de imobilizare pot afecta negativ activitatea enzimatică în condițiile în care implică mai multe etape în care enzima este supusă acțiunii unor diverși reactivi. Forțele de forfecare și variațiile de temperatură pentru perioade mai scurte sau mai lungi pot fi de asemenea dăunătoare pentru activitatea enzimatică.

Efectele imobilizării asupra proprietăților enzimei, adică activitate, stabilitate și reutilizare, variază în funcție de metoda aplicată, caracteristicile enzimei, caracteristicile suportului și condițiile procesului.

Există de obicei un echilibru între stabilitate și activitate la imobilizare și pentru fiecare aplicație trebuie evaluat care metodă de imobilizare și suport sunt cele mai potrivite, având în vedere atât efectele asupra proprietăților enzimice, cât și costul imobilizării și orice restricție / cerință legate de aplicarea acestora, de exemplu în industria alimentară sau farmaceutică [74,75,76].

1.4.2. Metode de imobilizare

Au fost dezvoltate diferite tehnici de imobilizare, cele mai importante fiind prezentate în Figura 1.9: adsorbție, entrapare/ încapsulare, afinitate, legare covalentă și reticulare [77].

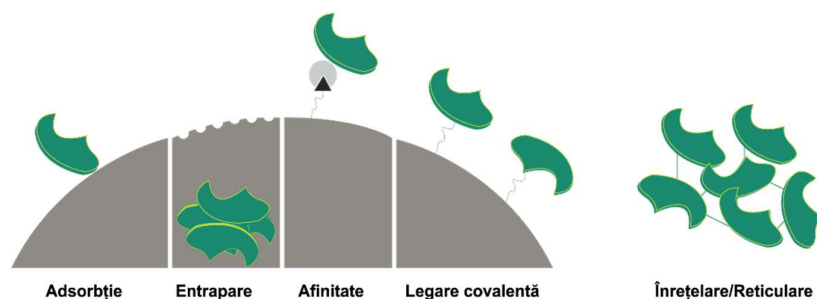


Figura 1.9. Tehnici de imobilizare

1.4.2.1. Imobilizarea prin adsorbție

Adsorbția fizică a unei enzime pe un suport solid este probabil cel mai simplu mod de a imobiliza o enzimă. Metoda se bazează pe interacțiunea fizică nespecifică dintre proteina enzimatică și suprafața matricei prin amestecarea unei soluții concentrate de enzimă cu suportul solid. Legarea se realizează în principal prin legături de hidrogen, interacțiuni hidrofobe și interacțiuni de tip Van der Waals [78,79].

Principalele caracteristici necesare materialelor folosite ca suporturi pentru imobilizarea eficientă a enzimelor sunt prezentate în Figura 1.10 [80].

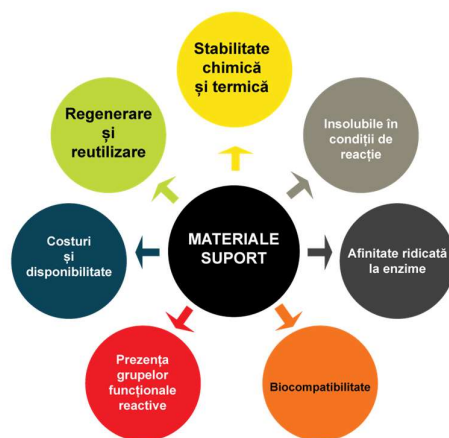


Figura 1.10. Principalele caracteristici ale materialelor utilizate ca suporturi pentru imobilizarea enzimelor

Trebuie amintit faptul că selectarea adecvată a unei matrice este direct legată de tipul enzimei și de procesul în care va fi utilizat sistemul biocatalitic [81].

O mare varietate de materiale de origine anorganică și organică au fost evaluate ca suporturi pentru biocatalizatori, cele mai frecvent utilizate fiind: dioxidul de siliciu, oxizii anorganici, materialele minerale, materialele pe bază de carbon, polimerii sintetici, biopolimerii.

Există și materiale noi utilizate ca suporturi pentru imobilizarea enzimelor care pot oferi proprietățile dorite pentru anumite enzime sau pentru cerințele unui proces tehnologic dat. Exemple de asemenea materiale sunt: particule magnetice, materiale mezoporoase, nanoparticule, materiale ceramice, nanotuburi din carbon, membrane polimerice, materiale hibride organice-organice, materiale hibride organice-anorganice, materiale hibride anorganice-anorganice [80].

1.4.2.2. Imobilizarea prin entrapare/ încapsulare


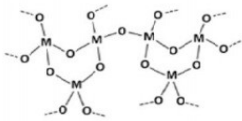
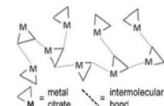
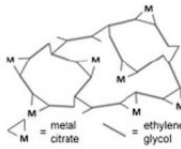
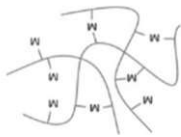
Entraparea/încapsularea enzimei sau a celulelor libere într-o matrice reticulată reprezintă o altă abordare generală pentru imobilizarea enzimelor, fiind cel mai bun mijloc de a evita orice influență negativă asupra structurii unei enzime.

Entraparea enzimelor folosind tehnicile sol-gel pe bază de silice a fost aplicată pe scară largă pentru imobilizarea enzimelor, fiind o modalitate deosebit de simplă și eficientă de a imobiliza multe tipuri de enzime. Sol-gelurile sunt materiale de tip silice foarte poroase și ușor de preparat [81,82].

Entraparea lipazelor în matrici de silice hidrofobe formate prin hidroliza $\text{RSi}(\text{OCH}_3)_3/\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$, așa cum a fost raportată inițial în 1996, a fost îmbunătățită de-a lungul anilor printr-o serie de modificări. Aceste modificări constau mai ales într-o varietate de aditivi adăugați în timpul procesului de obținere a matricii de sol-gel, ce pot conduce la o activitate crescută și o stereoselectivitate sporită a lipazelor [83]. Deși sol-gelurile sunt poroase, difuzia substratului către enzimă poate fi restricționată și trebuie luate măsuri pentru a evita acest lucru.

Sol-gelul este o sticlă inertă chimic care poate fi modelată în orice mod dorit. Acesta poate fi proiectat pentru a fi foarte stabil din punct de vedere termic și mecanic, dar un sol-gel standard este fragil. Sol-gelurile au fost utilizate pe scară largă în imobilizarea proteinelor și în special la dezvoltarea biosenzorilor [81,82].

Table 1.5. Clasificarea celor 5 tipuri diferite de geluri relevante pentru sinteza materialelor de tip sol-gel [73].

| Gel | Legătură | Sursă | Reprezentare grafică gel |
|--|---|---|---|
| Coloidal | Particule conectate prin legături Van der Waals sau de hidrogen | Oxid metallic sau coloizi hidroxilici |  |
| Metal-oxid polimer | Polimeri anorganici interconectați prin legături covalente sau legături intermoleculare | Hidroliza și condensarea alcoxizilor metalici ex. SiO_2 din tetrametilortosilicat |  |
| Complex metallic | Complecși metalici interconectați prin legături slabe | Soluție concentrată de complecși metalici (ex. soluție apoasă de citrat metallic sau etanol metallic) |  |
| Complex polimeric I (complex polimerizabil in situ) metoda Pechini | Polimeri organici interconectați prin legături covalente și legături coordinative | Poliesterificare între un alcool polihidroxic (ex. etilenglicol) și un acid carboxilic cu un complex metallic (ex. citrat metallic) |  |
| Complex polimeric II (polimeri coordinativi și reticulați) | Polimeri organici interconectați prin legături coordinative și intermoleculare | Polimeri coordinativi (ex. alginat și soluțiile unor săruri metalice (apoase)) |  |

Ca și în cazul preparării sol-gelului tradițional, punctul de plecare pentru bioîncapsulare este precursorul. Acesta este de obicei un silicat de alchil, un alcoximetalat, un alcoxisilan sau un amestec al acestora (Figura 1.11) [84].

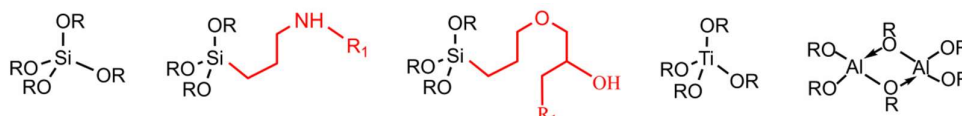


Figura 1.11. Exemple de precursori sol-gel: tetraalcoxisilani, trialcoxisilani funcționali, alcoximetalați

Precursorul este hidrolizat de apă, fie spontan, fie în cataliză acidă sau bazică (Figurile 1.12, 1.13) pentru a forma derivați hidroxilici (acizi siliciici, hidroximetalați, hidroxisilani etc.), iar procesul de hidroliză este urmat de reacții de condensare care pot fi și ele bazice sau acide (Figurile 1.14, 1.15). Acestea dau naștere unor polimeri solubili, coloidali și în cele din urmă în fază separată (polisilicați, polisiloxani etc.), care produc matricele finale (silice, metalosilicat, oxid metalic și siloxan). Folosind această tehnică de bază și procesele de preparare specifice (de exemplu, turnarea în bloc/matrită, polimerizarea cu emulsie inversă, acoperirea cu strat fluidizat) se pot obține hidrogeluri sau xerogeluri în diferite configurații (de exemplu monolit, granule, microparticule sau filme groase și subțiri) [84,85].

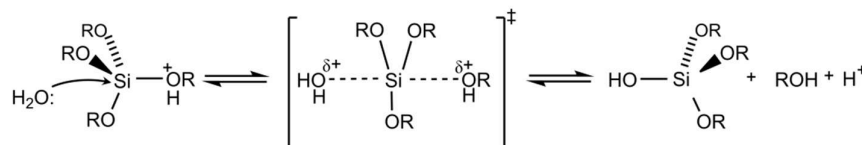


Figura 1.12. Hidroliza acidă a alcoxizilor de siliciu

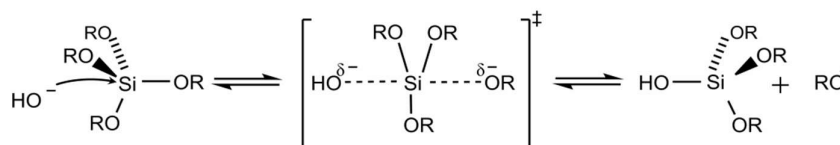


Figura 1.13. Hidroliza bazică a alcoxizilor de siliciu

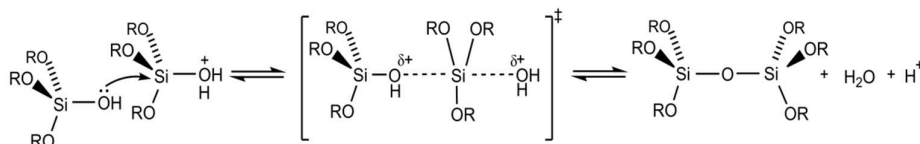


Figura 1.14. Condensare acidă a alcoxizilor de siliciu

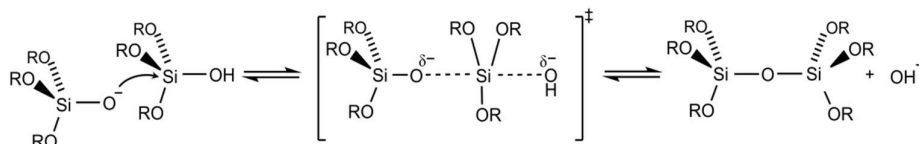


Figura 1.15. Condensare bazică a alcoxizilor de siliciu

1.4.2.3. Imobilizarea prin afinitate

Prin utilizarea interacțiunilor biospecifice de afinitate, pot fi păstrate toate avantajele imobilizării prin adsorbție și pot fi combinate cu biospecificitatea.

Aceste strategii exploatează selectivitatea acestor tip de interacțiuni și sunt, prin urmare, foarte specifice în ceea ce privește identitatea structurilor de legare, precum și localizarea moleculelor la care are loc legarea.

Aceasta oferă condiții în care desorbția poate fi controlată mai bine și elimină deplasarea nespecifică în timpul reacției [86,87].

1.4.2.4. Imobilizarea prin legare covalentă

Adesea, interacțiunile fizice dintre enzime și suporturile de silice nu sunt suficient de puternice pentru a menține moleculele de enzime în interiorul porilor. Desorbția de pe suporturi este o limitare critică pentru utilizarea acestora în forma lor „pură”.

O altă metodă promițătoare pentru prevenirea desorbției enzimei de pe/din suporturile de silice este legarea covalentă a enzimei de suport [88].

Această metodă se bazează pe formarea legăturilor covalente între materialul suport și câteva grupări funcționale ale resturilor de aminoacizi de pe suprafața enzimei. De obicei, suportul trebuie activat mai întâi de un reactiv specific, pentru a crește electrofilicitatea grupărilor sale funcționale, apoi aceste grupări reacționează cu grupările puternic nucleofile ale enzimei. Avantajul acestei metode este rezistența legăturii și în consecință stabilitatea imobilizării [89].

1.4.2.5. Imobilizare prin reticulare

Tehnica de reticulare a proteinei prin reacția glutaraldehidei cu grupări reactive NH_2 de pe suprafața proteinei a fost inițial dezvoltată în anii 1960 de Doscher și colab. [90].

Utilizarea unui suport duce în mod inevitabil la o scădere a activității, datorită introducerii unei mari părți de balast necatalitic, variind de la 90% până la > 99%, ceea ce are ca rezultat randamente și productivități mai scăzute.

Acest lucru nu este atenuat prin utilizarea de încărcări enzimatice mai mari, deoarece încărcarea cu o cantitate mai mare de enzimă duce la pierderea activității datorită accesibilității dificile a moleculelor de substrat la centrul activ al enzimei deoarece enzima se depune în mai multe straturi pe suprafața suportului sau poate fi situată adânc în porii suportului, fiind inaccesibil substratului [91].

Imobilizarea prin înrețelare a moleculelor de enzime cu un agent bifuncțional de reticulare, cel mai frecvent glutaraldehidă, elimină acest dezavantaj deoarece masa moleculară a agentului de reticulare este neglijabilă comparativ cu cea a enzimei, iar biocatalizatorul rezultat este format practic doar din enzimă activă [92].

În consecință, există un interes mare în ceea ce privește enzimele imobilizate fără suport. Imobilizarea prin reticulare a fost recent denumită ca metodă de imobilizare a enzimelor fără suport [93].

Există mai multe tehnici de imobilizare prin reticulare:

- la începutul anilor `90, cristalele enzimaticice reticulate (**CLECs**) preparate prin reticularea enzimei cristalizate, au demonstrat activități excelente și stabilitate operațională într-o varietate de biotransformări. Cu toate acestea, un dezavantaj major al CLECs este puritatea ridicată necesară pentru cristalizarea enzimei, ceea ce înseamnă prețuri ridicate.

- prepararea agregatelor enzimaticice reticulate (**CLEAs**), care presupune precipitarea enzimei din soluție tampon și reticularea agregatelor fizice rezultate, de exemplu cu glutaraldehidă. Poate fi realizată cu succes cu preparate enzimaticice brute, deoarece precipitarea se utilizează adesea pentru purificarea enzimelor. CLEA combină în esență purificarea și imobilizarea într-o singură operație [94].

1.4.3. Imobilizarea lipazelor și a lacazelor

Imobilizarea lipazelor și a lacazelor este un instrument puternic pentru aplicarea acestor enzime în procesele industriale. Obiectivul principal al imobilizării este recuperarea biocatalizatorului prin etape simple de separare, cum ar fi filtrarea.

În acest scop, biocatalizatorul trebuie să fie suficient de activ și stabil pentru a fi reutilizat în mai multe cicluri de reacție [32]. Imobilizarea biocatalizatorilor este benefică din punct de vedere economic pentru funcționarea bioproceselor în sistem continuu [95], iar utilizarea unei enzime imobilizate permite simplificarea în mare măsură a design-ului reactorului și controlul eficient al reacției [96].

Deși au fost raportate numeroase studii de imobilizare a lipazelor și a lacazelor într-o gamă extinsă de aplicații industriale, proiectarea de noi protocoale care să permită îmbunătățirea proprietăților enzimelor imobilizate rămâne un obiectiv mereu actual [32,96].

1.4.3.1. Imobilizarea lipazelor din *Candida antarctica* și *Pseudomonas sp.*

Rapoartele privind imobilizarea enzimelor au apărut pentru prima dată în anii 1960 [97]. Datorită diversității aplicațiilor industriale ale lipazelor există o mare varietate de tehnici de imobilizare ale acestora, iar cele mai importante sunt prezentate în Figura 1.16 [98].

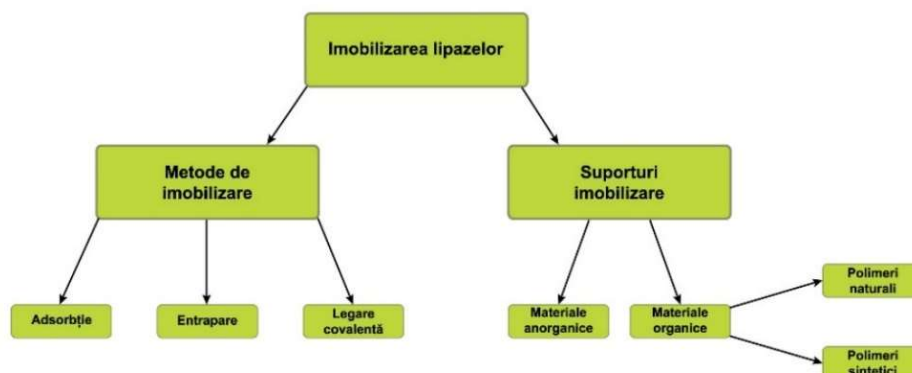


Figura 1.16. Metode și suporturi folosite la imobilizarea lipazelor

În continuare vor fi trecute în revistă cele mai recente studii de imobilizare a lipazelor care au fost utilizate și în partea experimentală a tezei.

Lipazele au structuri complexe, care au posibilitatea de a suferi schimbări conformaționale importante în timpul deschiderii / închiderii structurii lor. Manoel și colab. [99] au imobilizat lipaza din *Pseudomonas cepacia* pe suporturi de agaroză cu grupări octil și CNBr. Imobilizarea pe agaroză funcționalizată cu grupări octil nu este o adsorbție hidrofobă convențională, dar este o imobilizare care implică forma deschisă a lipazei.

Imobilizarea lipazelor prin adsorbție pe suporturi hidrofobe poate fi explicată prin mecanismul de „activare interfacială”. În prezența unei interfețe hidrofobe (cum ar fi o interfață lipid / apă) au loc rearanjări conformaționale importante, rezultând o „conformație deschisă”. În acest caz, lipazele sunt puternic adsorbite pe interfețe hidrofobe [99,100].

Imobilizarea pe agaroză funcționalizată cu grupări octil este mai lentă la o tărie ionică ridicată, dar enzima imobilizată pe acest suport își păstrează forma deschisă, în timp ce imobilizarea pe CNBr nu depinde de tăria ionică, iar conformația închisă/deschisă depinde de condițiile de mediu [99].

S-a raportat imobilizarea enzimei Cal B pe rășini epoxidice de tip Purolite ECR8205F, Purolite ECR8214F și Immobead IB150P, fără modificarea suprafețelor suporturilor [101].

Pena și colab. au raportat imobilizarea lipazelor din *Candida antarctica* Cal A și Cal B pe octil agaroză acoperită cu polietilenimină [102].

Lee și colab. au imobilizat lipaza Cal B prin tehnologia SLIP (depunere de lichid ionic pe un suport) și au testat preparatul în transesterificarea în fază gazoasă continuuă a propionatului de vinil cu 2-propanol [103].

Nanoparticulele au fost studiate intensiv pentru imobilizarea enzimelor, demonstrat de numărul ridicat al publicațiilor recente din literatura de specialitate pe această temă [104]. *Candida antarctica* B (Cal B) a fost imobilizată în polimeri PEG-poli (uree-uretan) prin polimerizarea miniemulsiilor în trepte [105,106].

De asemenea, Cal B a fost imobilizată prin legare covalentă utilizând chitosanul ca suport, care a fost activat în etape cu glicidol, etilendiamină (EDA) și glutaraldehidă [107].

Sim și colab. au raportat o nouă metodă de imobilizare prin legare covalentă într-o singură etapă, folosind suporturi de silice nemodificate, care utilizează un linker bifuncțional, care nu necesită catalizatori de tipul metalelor tranziționale [108].

Cal B a fost imobilizată covalent pe suporturi epoxidice Immobead-350 (IB350) și pe glicoxil-agaroză pentru a obține o rezoluție cinetică mai bună. Biocatalizatorii obținuți au fost utilizați în rezoluția hidrolitică a clormetil-2-(o-metoxifenoxi)etil acetatului [109].

În ultimii ani, lipazele au fost imobilizate cu succes și prin reticulare. Guajardo și colab. au raportat imobilizarea lipazei Cal B prin reticulare (CLEA) [99]. Brem și colab. au realizat imobilizarea lipazei Amano AK din *Pseudomonas fluorescens* tot prin tehnica CLEA [111], Shah și colab. au raportat imobilizarea lipazei din *Pseudomonas cepacia* (Amano PS) prin tehnica CLEA [112]. Lipaza Amano PS din *Burkholderia cepacia* imobilizată prin reticulare (CLEA) cu glutaraldehidă, fără aditivi, a fost raportată și de Hara și colab. în 2008 [113].

Imobilizarea enzimelor prin tehnica sol-gel a fost de asemenea mult studiată și un număr mare de lipaze cum ar fi *Pseudomonas fluorescens*, *Penicillium roqueforti*, *Thermomyces lanuginosus*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus niger*, *Candida antarctica B*, etc. au fost imobilizate cu succes prin această tehnică [114].

Itabaiana și colab. au raportat imobilizarea lipazei Cal B prin tehnica sol-gel folosind ca precursor silanic TEOS [115].

Lipaza Amano PS imobilizată prin tehnica sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite a fost testată în reacția de transesterificare a trioleinei pentru obținerea oleatului de metil [116].

Imobilizarea lipazei Amano AK prin tehnica sol-gel folosind sisteme binare sau ternare de silani precursori a fost raportată de grupul condus de prof. Poppe [117].

A fost raportată imobilizarea lipazei Cal B pe particule epoxidice de silice modificate pentru obținerea unei suprafețe și a unui volum specific mare, prin procedeul sol-gel în prezența unui copolimer [118].

Contribuții importante la dezvoltarea tehnicilor de entrapare în sol-gel a lipazelor au fost aduse de Reetz și colab. prin imobilizarea lipazei Amano PS în geluri de silice hidrofobe inerte chimic [119]. *Burkholderia cepacia* a fost imobilizată prin sol-gel folosind metiltrimetoxisilan (MTMS) și tetrametoxisilan (TMOS) ca precursori [120].

A fost raportată entraparea simultană a lipazelor din *Pseudomonas cepacia* sau *Candida antarctica* și a Fe_3O_4 în materiale sol-gel hidrofobe derivate din $CH_3Si(OCH_3)_3$ (MTMOS), sau în prezența altor precursori hidrofobici [121]. Lipaza din *Pseudomonas cepacia* a fost entrapată în sol-gel, matricea sol-gel fiind preparată prin policondensarea tetrametoxisilanului hidrolizat și izobutiltrimetoxisilanului [122].

Weiser și colab. au raportat noi biocatalizatori obținuți prin entraparea lipazei Cal B în matrici sol-gel folosind trei compoziții ternare de organosilani [123]. Lipaza *Pseudomonas sp.* a fost entrapată prin tehnica sol-gel folosind ca suport PHOMS (polihidroximetilsiloxan), sintetizat prin folosirea precursorului poli (dimetilsiloxan co-metilhidrosiloxan) [124].

1.4.3.2. Imobilizarea lacazelor

În continuare vor fi prezentate cele mai recente studii privind tehnicile de imobilizare a lacazelor.

Mohammadi și colab. au raportat imobilizarea covalentă pe suporturi sol-gel funcționalizate cu grupări epoxidice a lacazei din *Myceliophthora thermophila* [125].

Imobilizarea lacazei a fost realizată prin legare covalentă pe micro-biochar rezultat din lemn de pin, compost și coajă de migdale funcționalizat cu acid citric pentru a îmbunătăți procesul de legare a enzimei de suport [126].

Kadam și colab. au raportat imobilizarea covalentă a lacazei din *Trametes versicolor* pe nanotuburi haloisit modificate cu Fe_3O_4 și funcționalizate cu chitosan, folosind glutaraldehidă ca agent de legare [127]. În 2017 același grup a raportat imobilizarea lacazei din *Trametes versicolor* pe nanotuburi haloisit modificate cu Fe_3O_4 și funcționalizate cu γ -aminopropiltriethoxisilan, folosind de asemenea glutaraldehidă ca linker [128].

Maryskova și colab. au imobilizat lacaza din *Trametes versicolor* pe nanofibre de poliamidă 6/chitosan, folosind ca și distanțator albumina serică de bovină și hexametilendiamina (HMD), iar ca agent de reticulare glutaraldehidă [129].

În 2016 Nguyen și colab. au raportat imobilizarea lacazei din *Trametes versicolor* pe suporturi de chitosan, folosind ca agent de reticulare glutaraldehidă [130].

Amin și colab. au raportat imobilizarea covalentă a lacazei din *Trametes versicolor* pe nanoparticule de magnetită modificate, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{SiO}_2$ Kit-6, iar preparatele obținute au fost testate în procesul de ameliorare a delignificării reziduurilor organice ale uleiului de măsline [131].

Gao și colab. au realizat coimobilizarea lacazei și a 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil (TEMPO) pe nanoparticule magnetice Fe_3O_4 , funcționalizate cu grupări amino prin tehnica de reticulare cu glutaraldehidă [132].

Yuan și colab. au imobilizat lacaza din *Coriolus versicolor* prin adsorbție pe suporturi de nanoceluloză bacterială (BNC), iar performanțele catalitice ale preparatelor obținute au fost testate în reacția de oxidare a ABTS-ului fiind utilizate cu succes în 10 cicluri de reacție [133].

Tarasi și colab. au raportat imobilizarea prin adsorbție fizică pe trei tipuri de nanoparticule magnetice Fe_3O_4 îmbunătățite a lacazei din *Trametes versicolor* [134].

Cao și colab. au raportat imobilizarea lacazei pe polidopamină modificată 3D, interconectă cu silice macroporoasă [135].

Kacem și colab. au realizat în premieră imobilizare lacazei din *Trametes versicolor* prin entrapare într-o membrană polimerică de incluziune, din lichid ionic [PILMs] și policlorură de vinil [136].

Wu și colab. au raportat imobilizarea lacazei pe fibre "electrospun" din poliuretanic, poliacrilonitril amidoximă și β -ciclodextrină, prin metoda de coordonare a ionilor de Fe(III) [137].

1.5. Biocataliza în sistem de reacție continuu

Biocataliza a devenit o alternativă la cataliza chimică în diferite procese de fabricație de substanțe chimice la scară industrială datorită mai multor avantaje, care includ selectivitatea ridicată, diversitatea și natura ecologică a acestora [138].

Cu toate acestea, sunt necesare eforturi semnificative pentru a realiza procese la scară industrială viabile din punct de vedere economic [139].

În ciuda progresului semnificativ în sinteza asimetrică, metoda de producție dominantă pentru obținerea unui singur enantiomer în sinteza pe scară largă constă în rezoluția cinetică a racemașilor [140].

Lipazele sunt cele mai utilizate enzime, deoarece pot cataliza rezoluții cinetice și reacții sintetice în mediu apos sau în solvenți organici în absența cofactorilor [141]. Drept rezultat, lipazele sunt folosite pentru rezoluția chirală a medicamentelor, a

preparării diferiților substituenți ai untului de cacao, în producția de biocombustibili, modificarea grăsimilor, sinteza produselor cosmetice, ca agenți de ameliorare a aromei și pentru accelerarea degradării deșeurilor [142].

Proiectarea rațională a unor biocatalizatori noi, mai eficienți, a favorizat dezvoltarea entrapări în sol-gel a enzimelor, în principal a lipazelor. Această tehnică permite reglarea fină a proprietăților fizice ale matricei, care poate fi corelată cu structura substratului, precum și cu activitatea, selectivitatea și stabilitatea enzimei [83,143].

O sinergie între biocataliză și utilizarea reactoarelor s-a dovedit a fi un instrument puternic pentru dezvoltarea rapidă a proceselor biocatalitice, alături de optimizarea procesului și oferă posibilitatea de a explora noi procese inovative [138].

Alături de imobilizare, tehnologia de utilizare a biocatalizatorilor în reactoare oferă mijloace suplimentare de îmbunătățire a eficacității biotransformărilor [144], de reducere a costurilor catalizatorului/procesului și are un impact favorabil asupra costului produsului [145].

Design-ul bioreactoarelor este important în dezvoltarea proceselor catalizate de enzime. Odată ce un microorganism este selectat și condițiile de reacție/ producție sunt optimizate la scară de laborator, următoarea etapă este ridicarea la scară a procesului, astfel încât să poată fi obținute cantități mari de produs într-un mod rentabil. Selectarea unui reactor adecvat este esențială pentru astfel de procese și joacă un rol major în producția la scară largă [146].

Balcão și colab. au publicat o sinteză a diferitelor tehnici de imobilizare a lipazelor și utilizare biocatalizatorilor rezultați în diferite configurații de reactoare, cum sunt reactorul cu amestecare perfectă - tip șarjă (STR), reactorul cu pat fix (PBR), reactorul cu pat fluidizat (FBR), bioreactorul cu membrană (MBR). Cele mai frecvente reactoare utilizate în procesele catalizate de enzime sunt STR (deoarece este ușor de operat) și reactoarele cu pat fix (PBR).

Dezavantajul reactorului cu amestecare perfectă - tip șarjă (STR) este productivitatea scăzută, datorită limitărilor de volum [139,147].

Reactoarele tip coloană cu pat fix oferă ca avantaje: o conversie mai mare pe unitatea de masă a catalizatorului, reciclabilitatea, funcționarea continuă, capacitatea de a efectua sinteze în mai multe trepte prin cuplarea consecutivă a reactoarelor cu diferite enzime și inhibarea minimă a biocatalizatorului în comparație cu reactoarele cu amestecare perfectă-tip șarjă (STR) [138, 146]. Majoritatea sintezelor biocatalitice în flux continuu ai intermediarilor chirali optic activi la scară relativ mare sunt realizate utilizând lipaze imobilizate în reactoare tip coloană cu strat fix de catalizator [148].

În studiul prezentat în capitolul de Contribuții originale, lipaza din *Candida antarctica* B (Cal B) a fost utilizată în rezoluția cinetică continuă a unor substraturi racemice de o mare importanță practică [144,149].

Substraturile selectate: alifatic (*rac*-2-octanol, *rac*-1) și aromatic (*rac*-1-feniletanol, *rac*-2) au fost deja investigați în procese de rezoluție cinetică în reacții catalizate de lipază [150] și de alte grupuri [148], dar procese în flux continuu care utilizează lipaze entrapate în sol-gel nu au fost încă raportate pentru aceste substraturi. Derivații chirali ai 1-feniletanolului sunt materii prime importante pentru intermediarii sintetici din industria chimică fină și farmaceutică, agrochimice și produse naturale [151,152].

1.6. Procese biotehnologice inovative realizate cu enzime oxidative

1.6.1. Oxidarea glucozei la acid glucaric

Interesul pentru acizii organici derivați din zaharuri a crescut continuu în ultimii ani, ca parte a eforturilor de dezvoltare a biorefinăriilor care produc nu numai biocombustibili ci și substanțe chimice care le înlocuiesc pe cele obținute în prezent din petrol. Mai mult de 50% dintre cele mai căutate substanțe chimice obținute biologic sunt acizi organici. Cei obținuți prin oxidarea directă a mono sau oligozaharidelor sunt denumiți acizi zaharici. Unii dintre acești acizi, cum este acidul D-gluconic, sunt deja produși și utilizați la scară industrială [153]. Acidul gluconic este o substanță chimică importantă, care are o gamă largă de aplicații în industria farmaceutică și alimentară [154].

Acidul D-glucaric este produs la o scară redusă [155] și a fost identificat ca „o substanță chimică cu valoare adăugată mare obținută din biomasă”, datorită rolului său esențial în sinteza unei varietăți de detergenți biodegradabili, agenți de complexare a metalelor și a polimerilor biodegradabili utilizați în obținerea de fibre rezistente la întindere, filme, adevizi și îngrășăminte vegetale [156].

Este de asemenea cunoscut că acidul glucaric are proprietăți antitumorale și chemopreventive, efecte de scădere a colesterolului și este un agent viabil de chelare pentru un produs important utilizat în radiografia tumorilor sau pentru depistarea precoce a infarctului miocardic [157].

Departamentul de Energie al Statelor Unite ale Americii a selectat acidul D-glucaric, obținut din D-glucoză sau L-guloză ca fiind unul dintre cele 12 substanțe chimice de bază pe care se va putea baza dezvoltarea industriei chimice în viitorul apropiat (denumite „platform chemicals”) [158].

Zaharurile pot fi transformate în acizi zaharici fie chimic, fie biotehnologic [153].

În literatură sunt descrise mai multe metode de obținere a acidului D-glucaric din D-glucoză. Oxidările chimice care implică oxigen și pH ridicat au fost citate încă din 1907 și erau investigate și la sfârșitul anilor 1980 [159].

Oxidarea cu acid azotic este cea mai studiată metodă chimică pentru obținerea acizilor aldarici. Această metodă nu a ajuns însă la utilizare pe scară largă, în principal datorită faptului că conversia a fost scăzută, dar și datorită naturii exoterme a reacției de oxidare. De asemenea, reacția generează ca produși secundari o cantitate semnificativă de oxizi de azot, periculoși pentru mediu [153].

Acidul D-glucaric a fost obținut și prin oxidarea D-glucozei utilizând diverși catalizatori metalici. Lee și colab. au raportat în 2016 oxidarea glucozei cu cărbune activ, SiO_2 și Al_2O_3 depuși pe un catalizator de Pt în apă, la pH acid, bazic și neutru. Catalizatorul Pt/C în apă a prezentat cea mai mare activitate în ceea ce privește randamentul de acid glucaric obținut (74%) [160]. Catalizatori bimetalici PtPd depuși pe TiO_2 au fost raportați pentru oxidarea directă într-o singură etapă a glucozei la acid glucaric de Jin și colab. [161].

Acizii aldarici pot fi de asemenea obținuți și din acizii uronici corespunzători, catalizatorii de aur pe diferite suporturi fiind utilizați cu succes pentru aceste reacții. În 2015 Rautianien a raportat oxidarea acidului galacturonic și glucuronic la acizi lor aldarici folosind Au / Al_2O_3 la pH 8-10, 40-60°C, cu oxigen ca oxidant [162].

Darrien și colab. au studiat oxidarea diferitelor zaharuri C6 și C5 în prezența Pt/C la pH 9 și Au-Pt ZrO_2 , în condiții de pH necontrolate [163].

O serie de oxidări ale grupărilor alcoolice la aldehydă, catalizate de ionul oxoamoniu, au fost dezvoltate și perfecționate în ultimii ani. Este raportată oxidarea

cu catalizatorul 4-AcNH-TEMPO a D-glucozelor la acid D-glucaric folosind clorul sau bromul ca element oxidant terminal [157].

A fost de asemenea demonstrată oxidarea D-(+)-glucozei la acid D-glucaric utilizând ca agenți de oxidare și co-catalizatori TEMPO și 4-acetamido-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (4-acetamido-TEMPO) [164].

Producerea microbiană a acidului glucaric într-o manieră eficientă și ecologică a prezentat de asemenea interes mare pentru cercetare [165].

Liu și colab. au raportat aplicarea unei strategii „fusion expression” pentru a mări activitatea specifică a MIOX (myo-inositol oxigenază) și a sintezei acidului glucaric. Glucoza (ca sursă de carbon pentru creșterea celulară) și myo-inositolul (ca substrat pentru obținerea acidului glucaric) au fost co-alimentate în culturi pentru a obține o activitate specifică a MIOX mai mare și pentru a produce acid glucaric [156].

Un amestec format din trei enzime, complexat cu un schelet proteic numit „rosettasome scaffold” pentru a hidroliza substratul hemicelulozic și pentru a transforma cu randament ridicat acidul 4-metilglucuronic eliberat în acidul dicarboxilic corespunzător, a fost raportat de Lee și colab. [166].

Moon și colab. au dezvoltat o cale biosintetică pentru producerea acidului glucaric folosind enzime din trei surse diferite: Ino1 din *S. cerevisiae*, MIOX provenit din șoareci și Udh din *P. syringae*. O fosfatază endogenă a participat de asemenea, la producerea acidului glucaric [167].

Concentrația acidului glucaric în mediul de cultură a *S. cerevisiae* a fost crescută la 6 g/l în prin integrarea genei miox4 din *A. Thaliana* și a genei udh din *Pseudomonas syringae* în secvența Delta a genomului. Exprimarea completă din secvența Delta a mărit atât numărul de copii ale genei țintă, cât și stabilitatea lor [165].

Uronat dehidrogenaza Tb-UDH din *T. bispora*, clonată și exprimată în *E. coli*, a dus la producerea acidului glucaric, reacția având loc în prezența coenzimei NADH [168].

Sakuta și colab. au raportat producția de D-glucarat și D-mannarat din D-glucuronat respectiv D-manuronat, catalizată de o glucoză dehidrogenază pirolochinolinchinon-dependentă și producerea D-glucaratului din L-guluronat catalizată de o altă dehidrogenază, DHPDH [158].

Utilizarea și integrarea catalizei chimice heterogene și a biocatalizei, în special utilizarea enzimelor, vor deveni din ce în ce mai importante într-o industrie chimică viitoare bazată pe resurse regenerabile [169].

În capitolul Contribuții originale va fi prezentat un nou concept enzimatic pentru a transforma carbohidrații în acizi aldarici în mediu apos. În prima etapă, glucoza a fost oxidată la acid gluconic folosind glucozoxidaza și catalaza, reacția având loc rapid și selectiv la pH 5. Pentru a doua etapă, de asemenea la pH 5, s-a adăugat TEMPO și lacază. Lacaza activează TEMPO pentru a oxida restul alcoolului primar al acidului gluconic, utilizând oxigen molecular ca oxidant.

1.6.2. Eliminarea enzimatică a coloranților reziduali din ape

Utilizarea enzimelor pentru tratarea apelor reziduale care conțin coloranți a fost studiată intens, pe baza capacității enzimelor de a modifica structura inițială a coloranților și de a obține astfel compuși care pot fi degradați sau eliminați mai ușor [170,171,172].

O gamă largă de enzime, în special oxidoreductazele, s-au dovedit a fi catalizatori excelenți în procesul de purificare a apelor uzate, datorită condițiilor ușoare de reacție, capacității de transformare a substanțelor complexe, stereospecificității și ratelor de reacție mai mari în comparație cu catalizatorii chimici [171,172,173]. Oxidoreductazele pot cataliza reacțiile de degradare a fenolilor, anilinelor, benzidinelor, clorofenolelor și a diferitelor substanțe aromatice heterociclice [174].

Degradarea coloranților reziduali poate fi influențată de o serie de factori, cum ar fi concentrația și structura colorantului, prezența altor compuși, pH-ul și temperatura efluentului [175]. Atunci când sunt utilizate enzime pentru eliminarea acestor poluanți din apele uzate, proprietățile biocatalizatorului trebuie reglate corespunzător pentru a asigura cea mai mare eficiență, luând în considerare toți acești factori.

Peroxidazele vegetale au fost intens studiate ca instrument util pentru bioremedierea deșeurilor industriale. În special, peroxidaza din hrean (HRP) este un catalizator utilizat pe scară largă în reacțiile enzimice [176]. HRP a prezentat avantaje importante incluzând activitate și selectivitate ridicată, rezistență ridicată la inhibare de către diferiți compuși pe un interval larg de concentrații, precum și operabilitate ridicată și fiabilitate în diferite condiții de tratament [174].

Studiile au arătat că HRP poate precipita în mod eficient o mare varietate de compuși organici, compuși aromatici cum ar fi coloranți și compuși fenolici, în prezența de H_2O_2 . HRP a fost utilizată pe scară largă în tratarea apelor uzate, deoarece este stabilă și de asemenea prezintă activitate catalitică pe un interval larg de temperatură și pH [177].

Recent s-a constatat că clorofenolii, încadrați ca „poluanți prioritari” de Agenția pentru Protecția Mediului din SUA, pot fi îndepărtați din apa contaminată de către HRP. Evident, la fel ca și alte enzime native, HRP are mai multe dezavantaje precum stabilitate scăzută, sensibilitate ridicată la inactivare și dificultate de reutilizare [178]. Imobilizarea s-a dovedit a fi o soluție viabilă pentru a depăși astfel de dezavantaje, îmbunătățind activitatea, stabilitatea și recuperarea enzimei. Enzimele imobilizate ar putea fi aplicate pe scară largă în diverse medii de reacție chiar și în condiții dure [179].

Până în prezent, imobilizarea HRP a fost realizată folosind mai multe suporturi: chitosan modificat, matrice polimerică de acrilamidă, alginat, copolimeri de metacrilat de glicidil, aminopropil activat cu glutaraldehidă, mărgelile de sticlă, magnetită, rășini schimbătoare de ioni și diverși polimeri [173,180,181,182]. Imobilizarea prin legare covalentă între suport și enzimă este considerată adecvată pentru obținerea de biocatalizatori cu stabilitate operațională ridicată [183]. Alături de proprietățile fizice ale suportului, structura și reactivitatea grupului activ atașat la suport sunt esențiale pentru o imobilizare de succes. Suporturile activate cu grupări epoxidice sunt foarte stabile, pot fi stocate mult timp și pot fi utilizate pentru imobilizarea enzimelor care urmează să fie utilizate în laborator sau la scară industrială [184].

Imobilizarea enzimelor pe suporturi activate cu grupări epoxidice se realizează prin legarea covalentă, crescând astfel stabilitatea enzimei și diminuând posibilele efecte adverse ale solvenților organici, produselor formate sau a temperaturii asupra activității enzimei [185,186]. Legăturile covalente se formează între suport și grupările nucleofile din structura enzimelor, cum ar fi grupările amino, hidroxil sau tiol. Prin imobilizarea pe astfel de suporturi, modificările conformaționale sunt mult diminuate [185].

Există studii de imobilizare pe suporturi de poliacrilamidă epoxidice, precum Eupergit® C [187]. O altă posibilitate este utilizarea unui agent de reticulare cu catenă lungă care conține grupări epoxidice. Un nanocompozit din nanofire macroporoase de ZnO / SiO₂ A fost utilizat ca suport pentru imobilizarea HRP prin reticulare *in situ*, cu dietilen glicol diglicidil eter ca reticulant [188].

2. Contribuții originale

2.1 Obiectivele tezei de doctorat

Scopul principal al imobilizării enzimelor este reutilizarea acestora în mai multe cicluri de reacție și folosirea lor pentru un timp mai îndelungat. Deși s-au dezvoltat o serie de noi strategii în ultimii 20 de ani și protocoalele pentru imobilizarea enzimelor instabile sunt numeroase, din păcate marea majoritate a acestora nu au atins un grad de implementare masivă în ce privește prepararea biocatalizatorului eterogen îmbunătățit [189].

În acest context, știința imobilizării enzimelor cere noi soluții pentru a se obține biocatalizatori eterogeni cu proprietăți mai bune decât enzimele solubile/native. Prepararea biocatalizatorilor imobilizați foarte stabili permite următoarele: (1) timp operațional mai mari ai enzimei, crescând numărul total al cifrei de afaceri; (2) utilizarea enzimelor într-un mediu neconvențional (temperaturi, solvenți etc.) pentru a crește concentrațiile de substraturi pentru intensificarea proceselor sau pentru a schimba echilibrul reacțiilor; (3) proiectarea sistemelor de reacție fără solvent; și (4) prevenirea contaminărilor microbiene [190].

Pentru toate enzimele, posibilitatea de a fi imobilizate și utilizate într-o formă eterogenă aduce avantaje industriale și de mediu importante, cum ar fi procesarea simplificată în procesul de downstream sau a operațiilor proceselor continue [191].

Obiectivul principal al tezei de doctorat a fost obținerea de biocatalizatori cu eficiență ridicată și potențiale aplicații în procese ale chimiei verzi.

În contextul actualelor cerințe pentru utilizarea enzimelor în procesele industriale, au fost abordate următoarele obiective științifice: (1) imobilizarea lipazelor în sol-gel pentru realizarea de rezoluții cinetice a amestecurilor racemice; (2) stabilitatea preparatelor în solvenți organici, la temperatură și posibilitatea de reutilizare a acestora; (3) optimizarea reacțiilor de rezoluție racemică folosind un program experimental factorial și un sistem cu flux continuu „packed-bed”, pe substraturile 2-octanol și 1-feniletanol; (4) imobilizarea lacazei prin legare covalentă și adsorbție pentru obținerea acidului D-glucaric și (5) imobilizarea peroxidazei prin legare covalentă, pentru eliminarea unor coloranți din apă.

2.2 Creșterea stabilității lipazelor în procese de rezoluție cinetică prin imobilizare în matrici de sol-gel cu grupări vinilice

În acest studiu, prin imobilizarea unor lipaze din diferite surse în matrici de sol-gel conținând grupări funcționale vinilice au fost obținute matrici hibride de tip vinil-polisiloxan, în care prezența grupărilor vinilice influențează atât proprietățile matricii de sol-gel cât și hidrofobicitatea ei și interacțiunea cu enzima.

Lipazele din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK), *Burkholderia cepacia* (Amano PS), *Candida antarctica* B (Cal B) și *Candida antarctica* A (Cal A) au fost

imobilizate prin tehnica sol-gel, folosind sisteme binare și ternare de silani precursori care conțin și grupări vinilice. Activitatea și enantioselectivitatea biocatalizatorilor obținuți a fost testată în reacțiile de acilare a trei alcooli secundari alifatici (2-hexanol, 2-heptanol și 2-octanol) în mediu *n*-hexan. Precursorii silanici cu grupări nehidrolizabile vinilice au fost foarte puțin folosiți anterior pentru procese de imobilizare și influența lor asupra structurii și morfologiei catalizatorului, dar mai ales asupra eficienței catalitice a reprezentat un obiectiv major al acestei teze.

2.2.1. Imobilizarea lipazei din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) prin tehnica sol-gel și sol-gel combinată cu adsorbție

a) Imobilizarea lipazei Amano AK prin entrapare în matrici de sol-gel

Rezultatele obținute pentru biocatalizatorii cu lipază Amano AK imobilizată prin entrapare în sol-gel (SGE-1), exprimate ca și conversie a alcoolului [%], activitate de transesterificare [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] și exces enantiomeric al produsului e.e.p.[%], determinate pe baza analizelor GC, sunt prezentate în Tabelele 2.1-2.3. Utilizarea ca aditiv a lichidului ionic [Omim]BF₄ a fost stabilit pe baza unor cercetări anterioare [150]

Activitățile de transesterificare prezentate în aceste tabele (dar și în alte tabele și figuri care vor urma) au fost calculate pe baza conversiei obținute după 24 de ore de reacție, considerându-se că singurul proces care are loc este cel de transesterificare și că în condițiile procesului nu se produc reacții concurente, cum ar putea fi hidroliza esterilor prezenți în sistemul de reacție. Aceste activități de transesterificare nu sunt activități reale în sensul definiției activității enzimatică (care presupune un calcul bazat pe viteza inițială de reacție), prin urmare ele exprimă de fapt eficiența catalitică a enzimei în condiții experimentale bine definite. Beneficiul cel mai important al acestui mod de abordare este simplificarea studiului comparativ al diferitelor preparate obținute prin imobilizare, atât între ele cât și față de enzima nativă.

Biocatalizatorii obținuți prin tehnica de entrapare în sol-gel (SGE-1) cu lipază Amano AK au fost testați în reacția de rezoluție cinetică a 2-hexanolului, 2-heptanolului și a 2-octanolului, prin acilare enantioselectivă cu acetat de vinil. Preparatele imobilizate au fost obținute folosind diverse amestecuri ternare de silani precursori, dintre care viniltrimetoxisilanul (VTMOS) și feniltrimetoxisilanul (PhTMOS) conțin grupări organice nehidrolizabile capabile să influențeze imobilizarea enzimei și proprietățile sale după imobilizare, în timp ce tetrametoxisilanul (TMOS) contribuie doar la formarea structurii polisiloxanice a matricei.

Din Tabelele 2.1-2.3 se observă că cele mai mari valori ale activității de transesterificare și conversiei s-au obținut pentru raportul molar PhTMOS:VTMOS:TMOS (1,6:0,4:1), indiferent de substratul testat. În cazul acestor preparate cu lipază Amano AK, prezența grupării fenil în concentrație mai mare în matricea hibridă de sol-gel a avut efect mai favorabil asupra activității de transesterificare decât cea a grupării vinil. Matricea de sol-gel obținută fără a avea grupări organice în structura sa a avut activitate catalitică slabă.

Tabel 2.1. Acilarea **2-hexanolului** catalizată de lipaza **Amano AK** imobilizată prin entrapare în sol-gel cu [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare.

| Silani precursori/raport molar | Conv. [%] | A _{trans} [μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹] | e.e. _{p.} [%] |
|--------------------------------|-----------|--|------------------------|
| Lipază nativă (control) | 32 | 1,334 | 74 |
| TMOS | 5 | 0,022 | 54 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | 5 | 0,041 | 74 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | 14 | 0,114 | 86 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | 11 | 0,093 | 88 |

Tabel 2.2. Acilarea **2-heptanolului** catalizată de lipaza **Amano AK** imobilizată prin entrapare în sol-gel cu [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare.

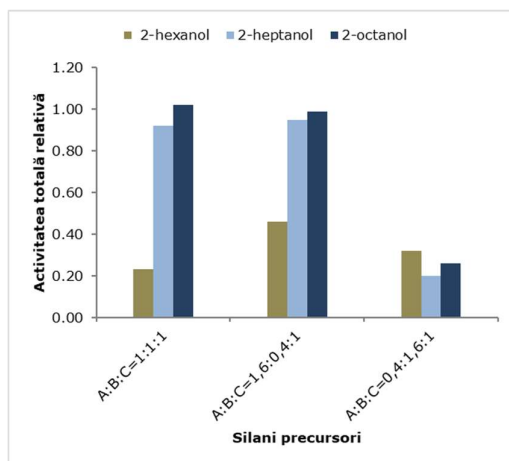
| Silani precursori/raport molar | Conv. [%] | A _{trans} [μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹] | e.e. _{p.} [%] |
|--------------------------------|-----------|--|------------------------|
| Lipază nativă (control) | 34 | 1,416 | 70 |
| TMOS | 6 | 0,030 | 64 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | 21 | 0,172 | 78 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | 32 | 0,251 | 78 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | 7 | 0,061 | 72 |

Tabel 2.3. Acilarea **2-octanolului** catalizată de lipaza **Amano AK** imobilizată prin entrapare în sol-gel cu [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare.

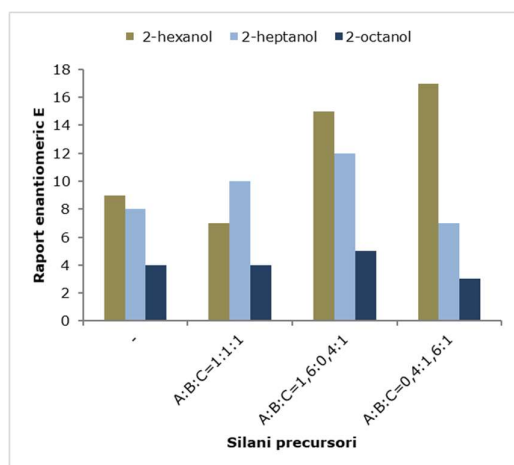
| Silani precursori/raport molar | Conv. [%] | A _{trans} [μmol·h ⁻¹ ·mg ⁻¹] | e.e. _{p.} [%] |
|--------------------------------|-----------|--|------------------------|
| Lipază nativă (control) | 45 | 1,853 | 50 |
| TMOS | 11 | 0,036 | 18 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | 30 | 0,249 | 56 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | 39 | 0,342 | 56 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | 12 | 0,105 | 46 |

Pe baza rezultatelor prezentate în Tabelele 2.1-2.3 s-au reprezentat grafic activitatea totală relativă și enantioselectivitatea exprimată prin valoarea raportului eentiomeric E, în funcție de raportul molar al silanilor precursori (Figura 2.1a și 2.1b).

Acești parametri s-au calculat pe baza activităților totale de transesterificare obținute în urma imobilizării raportate la activitatea totală a enzimei native supuse imobilizării, respectiv prin determinarea raportului enantiomeric E pe baza conversiei și a excesului enantiomeric al (R)-esterului. Activitatea totală relativă este importantă deoarece reprezintă o măsură a eficienței procesului de imobilizare în ansamblul ei.



a)



b)

Figura 2.1. Influența raportului molar al silanilor precursori asupra activității totale relative (a) și a raportului enantiomeric E (b) a biocatalizatorilor (obținuți cu lipază din *Pseudomonas fluorescens*) entrapați în sol-gel, în reacția de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului, 2-heptanolului și a 2-octanolului în *n*-hexan la 40°C (A=PhTMOS, B=VTMOS, C=TMOS).

Cele mai ridicate valori ale activității totale relative au fost obținute în cazul substraturilor 2-heptanol și 2-octanol, folosind preparate ternare immobilizate la rapoartele molare PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 și 1,6:0,4:1, adică la un conținut mai mare de grupări fenil în matricea de sol-gel. Pentru substratul 2-hexanol, valorile activităților totale regăsite după immobilizare au fost de 5 ori mai mici comparativ cu activitatea totală a enzimei native supuse immobilizării, pentru toate substraturile testate. Prin urmare, eficiența catalitică a acestor biocatalizatori immobilizați este mai mare față de alcoolii secundari cu catenă liniară mai lungă.

În cazul raportului enantiomeric E, cele mai bune rezultate au fost obținute pentru 2-hexanol, la rapoarte molare PhTMOS:VTMOS:TMOS de 0,4:1,6:1 și 1,6:0,4:1. În primă instanță s-ar putea considera că enantioselectivitatea față de acest substrat a fost mai bună, însă la conversii scăzute un asemenea rezultat este normal într-un proces de rezoluție cinetică, deoarece la început enantiomerul favorizat se formează întotdeauna cu viteză mai mare.

b) Imobilizarea lipazei Amano AK prin entrapare în matrici de sol-gel combinată cu adsorbție

Metoda imobilizării prin entrapare în matrici de sol-gel combinată cu adsorbție implică utilizarea unui adsorbent care să contribuie la îmbunătățirea transferului de masă între substrat și centrul activ al enzimei ca urmare a distribuirii xerogelului format pe suprafața materialului respectiv. În acest studiu s-a utilizat Celite 545, un aluminosilicat pe bază de pământ de diatomee, format din particule cu dimensiuni cuprinse între 0,02 și 0,1 mm.

Rezultatele obținute pentru biocatalizatorii cu lipază Amano AK, imobilizați prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (SGE-A), exprimate ca și conversie [%], activitate [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] și e.e._p [%] determinate pe baza analizelor GC, sunt prezentate în Tabelele 2.4-2.6. imobilizarea s-a realizat atât cu sisteme ternare cât și cu sisteme binare de silani precursori.

Așa cum se poate observa din Tabelele 2.4-2.6, în cazul folosirii sistemelor binare de silani precursori, cele mai mari valori ale eficienței catalitice în reacțiile de transesterificare s-au înregistrat la un raport molar VTMOS:TMOS de 4:1, dar conversiile și activitățile obținute au fost foarte mici pentru toate aceste preparate. Când imobilizarea s-a realizat folosind 3 silani precursori, cele mai mari valori ale activității de transesterificare s-au obținut la raport molar PhTMOS:VTMOS:TMOS de 1:1:1 pentru toate substraturile testate, iar conversiile au crescut până la 43% în cazul 2-octanolului.

Tabel 2.4. Acilarea **2-hexanolului** catalizată de lipaza **Amano AK** imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție folosind [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare.

| Silani precursori/raport molar | Conv. [%] | A ^{trans} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] | e.e. _p [%] |
|--------------------------------|-----------|---|-----------------------|
| Lipază nativă (control) | 32 | 1,334 | 74 |
| VTMOS:TMOS 1:1 | 2 | 0,018 | 98 |
| VTMOS:TMOS 2:1 | 2 | 0,019 | 98 |
| VTMOS:TMOS 3:1 | 4 | 0,033 | 72 |
| VTMOS:TMOS 4:1 | 10 | 0,085 | 84 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | 24 | 0,196 | 86 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | 23 | 0,190 | 86 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | 11 | 0,085 | 98 |

Ca și în cazul biocatalizatorilor obținuți cu trei precursori silanici prin metoda SGE-1 (fără adsorbție), creșterea conținutul de grupări vinilice în matricea de sol-gel nu a avut ca rezultat creșterea activității de transesterificare.

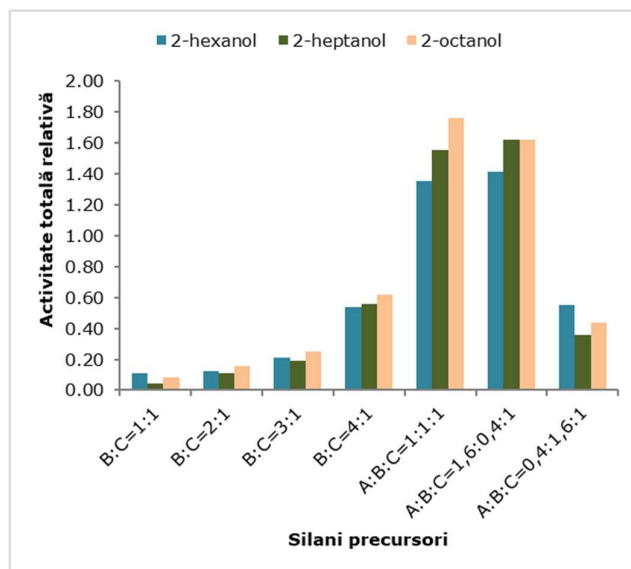
Tabel 2.5. Acilarea **2-heptanolului** catalizată de lipaza **Amano AK** imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție folosind [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare.

| Silani precursori/raport molar | Conv. [%] | A _{trans} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] | e.e. _{p.} [%] |
|--------------------------------|-----------|---|------------------------|
| Lipază nativă (control) | 34 | 1,416 | 70 |
| VTMOS:TMOS 1:1 | 1 | 0,007 | 62 |
| VTMOS:TMOS 2:1 | 2 | 0,019 | 68 |
| VTMOS:TMOS 3:1 | 4 | 0,032 | 72 |
| VTMOS:TMOS 4:1 | 11 | 0,093 | 78 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | 29 | 0,238 | 76 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | 29 | 0,233 | 78 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | 7 | 0,058 | 76 |

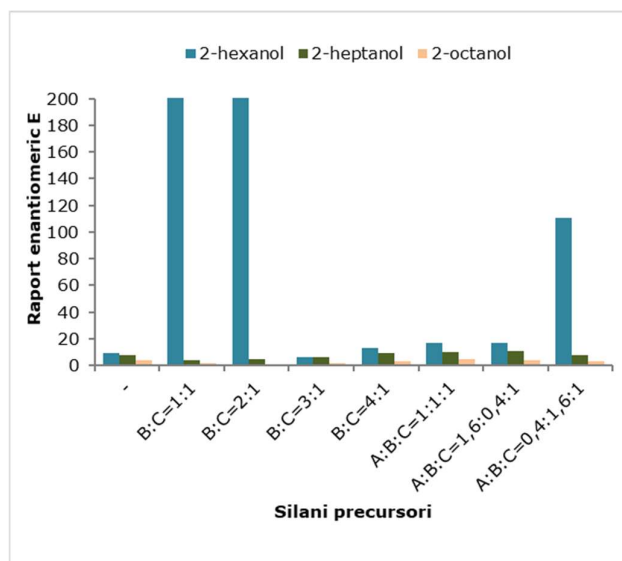
Tabel 2.6. Acilarea **2-octanolului** catalizată de lipaza **Amano AK** imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție folosind [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare.

| Silani precursori/raport molar | Conv. [%] | A _{trans} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] | e.e. _{p.} [%] |
|--------------------------------|-----------|---|------------------------|
| Lipază nativă (control) | 45 | 1,853 | 50 |
| VTMOS:TMOS 1:1 | 2 | 0,019 | 30 |
| VTMOS:TMOS 2:1 | 4 | 0,035 | 10 |
| VTMOS:TMOS 3:1 | 7 | 0,056 | 32 |
| VTMOS:TMOS 4:1 | 16 | 0,136 | 52 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | 43 | 0,353 | 56 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | 36 | 0,304 | 54 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | 11 | 0,094 | 42 |

Activitatea totală relativă și enantioselectivitatea, calculate pe baza rezultatelor din Tabelele 2.4-2.6, au fost reprezentate grafic în funcție de raportul molar al silanilor precursori, pentru a avea o imagine sintetică despre eficiența acestor biocatalizatori (Figura 2.2a și b).



a)



b)

Figura 2.2. Influența raportului molar al silanilor precursori asupra activității totale relative (a) și a raportului enantiomeric E (b) al biocatalizatorilor (obținuți cu lipază din *Pseudomonas fluorescens*) imobilizați prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție, în reacția de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului, 2-heptanolului și a 2-octanolului în *n*-hexan la 40°C (A=PhTMS, B=VTMS, C=TMOS).

S-au obținut valori mari ale activității totale relative pentru preparatul ternar PhTMOS:VTMOS:TMOS la rapoarte molare de 1:1:1 și 1,6:0,4:1, pentru toate substraturile testate, în timp ce folosirea de sisteme binare de silani precursori a dus la preparate cu activitate scăzută.

Folosind un sistem binar de silani precursori s-au obținut valori mari ale raportului enantiomeric, însă pe baza unor conversii de cel mult 16% și prin urmare aceste rezultate nu pot fi considerate elocvente pentru a afirma că preparatele respective au enantioselectivitate ridicată.

Se poate trage concluzia că folosind sistemul ternar de precursori silanici se obțin preparate cu activitate ridicată, dar enantioselectivitatea moderată a lipazei native din *Pseudomonas fluorescens* față de această serie de alcooli secundari alifatici nu se modifică semnificativ în urma imobilizării.

2.2.2. Imobilizarea lipazei din *Burkholderia cepacia* (Amano PS) prin tehnica sol-gel și sol-gel combinată cu adsorbție

a) Imobilizarea lipazei Amano PS prin entrapare în matrici de sol-gel

Rezultatele obținute pentru biocatalizatorii cu lipază Amano PS imobilizați prin entrapare în sol-gel (metoda SGE-1), exprimate ca și conversie [%], activitate [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] și e.e._p [%] determinate pe baza analizelor GC, sunt prezentate în Tabelele 2.7-2.9. Așa cum se poate observa din aceste date, cele mai mari valori ale activității de transesterificare și conversiei s-au obținut în cazul sistemului ternar, la raport molar 1,6:0,4:1 al silanilor precursori PhTMOS:VTMOS:TMOS, indiferent de substratul testat, la fel ca în cazul preparatelor obținute cu lipaza Amano AK.

Tabel 2.7. Acilarea **2-hexanolului** catalizată de lipaza **Amano PS** imobilizată prin entrapare în sol-gel folosind [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare.

| Silani precursori/raport molar | Conv. [%] | A _{trans} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] | e.e. _p [%] |
|--------------------------------|-----------|---|-----------------------|
| Lipază nativă (control) | 31 | 1,227 | 80 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | 29 | 0,236 | 86 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | 38 | 0,306 | 84 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | 17 | 0,136 | 86 |

Tabel 2.8. Acilarea **2-heptanolului** catalizată de lipaza **Amano PS** imobilizată prin entrapare în sol-gel folosind [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare.

| Silani precursori/raport molar | Conv. [%] | A _{trans} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] | e.e. _p [%] |
|--------------------------------|-----------|---|-----------------------|
| Lipază nativă (control) | 16 | 0,630 | 86 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | 27 | 0,221 | 86 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | 43 | 0,334 | 84 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | 14 | 0,119 | 86 |

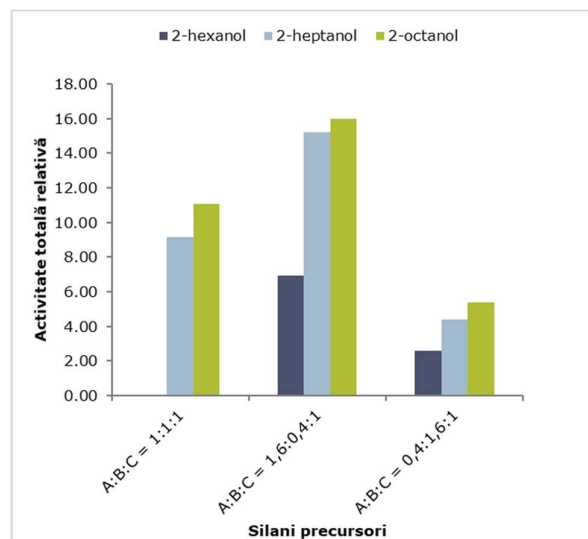
Tabel 2.9. Acilarea *2-octanolului* catalizată de lipaza **Amano PS** imobilizată prin entrapare în sol-gel folosind [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare.

| Silani precursori/raport molar | Conv. [%] | A ^{trans} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] | e.e.p. [%] |
|--------------------------------|-----------|---|------------|
| Lipază nativă (control) | 19 | 0,798 | 74 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | 41 | 0,338 | 76 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | 54 | 0,457 | 70 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | 22 | 0,185 | 74 |

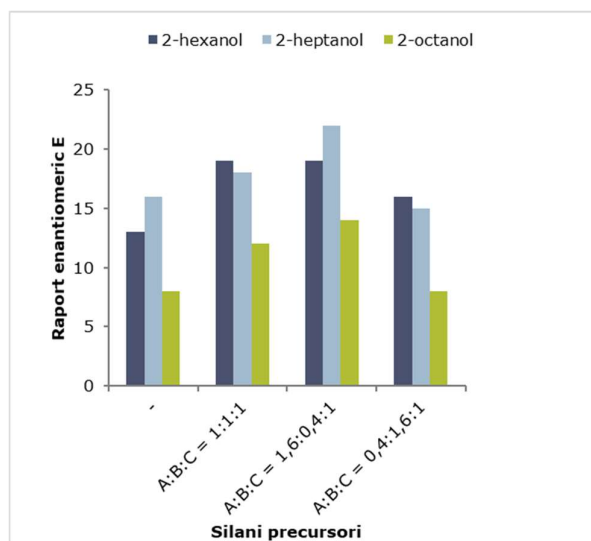
Pe baza rezultatelor prezentate în Tabelele 2.7-2.9 s-au calculat activitatea totală relativă și enantioselectivitatea, acestea fiind reprezentate grafic în funcție de raportul molar al silanilor precursori (Figura 2.3a și 2.3b).

În urma imobilizării prin entrapare în sol-gel cele mai bune valori ale activității totale relative s-a obținut atunci când s-a folosit sistemul ternar PhTMOS:VTMOS:TMOS la un raport molar 1,6:0,4:1, pentru toate substraturile testate. Se confirmă și în cazul acestei lipaze efectul favorabil al unui conținut mai mare de grupări organice, în special fenil, asupra eficienței catalitice după imobilizare. Activitățile efective au atins 53% și 57% din activitatea enzimei native în cazul substraturilor 2-heptanol și 2-octanol, iar activitățile totale regăsite după imobilizare au fost de până la 15 ori mai mari (la raportul molar 1,6:0,4:1) comparativ cu activitatea totală a lipazei introduse la imobilizare, ceea ce demonstrează un evident efect activator al matricii, probabil prin interacțiune hidrofobă cu enzima.

În ceea ce privește enantioselectivitatea biocatalizatorilor obținuți, în Figura 2.3b se poate observa că valorile raportului enantiomeric E în general au crescut comparativ cu enzima nativă, excepție făcând preparatul obținut cu un raport molar de 0,4:1,6:1 al silanilor precursori în reacția de acilare a 2-octanolului. În cazul acestei enzime s-a ajuns deja la valori E de peste 20, pe baza unor conversii de 40-50%, ceea ce înseamnă biocatalizatori cu perspective de aplicare în procese de rezoluție cinetică.



a)



b)

Figura 2.3. Influența raportului molar al silanilor precursori asupra activității totale relative (a) și a raportului enantiomeric E (b), în reacția de acilare enantioselectivă în *n*-hexan, la 40°C, a 2-hexanolului, 2-heptanolului și a 2-octanolului folosind biocatalizatori obținuți cu lipază din *Burkholderia cepacia* entrapați în sol-gel (A=PhTMOS, B=VTMOS, C=TMOS).

b) Imobilizarea lipazei Amano PS prin entrapare în matrici de sol-gel combinată cu adsorbție

Și în cazul lipazei din *Burkholderia cepacia* au fost obținute două serii de preparate imobilizate prin metoda combinată, una pe bază de amestecuri binare și cealaltă pe bază de amestecuri ternare de silani precursori. Rezultatele obținute pentru biocatalizatorii cu lipază Amano PS, imobilizați prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (SGE-A), exprimate ca și conversie [%], activitate [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] și e.e.p.[%] determinate pe baza analizelor GC, sunt prezentate în Tabelele 2.10-2.12.

Tabel 2.10. Acilarea **2-hexanolului** catalizată de lipaza **Amano PS** imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție, folosind [Omim]BF₄ ca aditiv

| Silani precursori/raport molar | Conv. [%] | A _{trans} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] | e.e.p. [%] |
|--------------------------------|-----------|---|------------|
| Lipază nativă (control) | 31 | 1,227 | 80 |
| VTMOS:TMOS 1:1 | 27 | 0,215 | 86 |
| VTMOS:TMOS 2:1 | 12 | 0,098 | 84 |
| VTMOS:TMOS 3:1 | 24 | 0,193 | 86 |
| VTMOS:TMOS 4:1 | 12 | 0,100 | 84 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | 27 | 0,228 | 86 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | 28 | 0,233 | 86 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | 24 | 0,197 | 86 |

Tabel 2.11. Acilarea **2-heptanolului** catalizată de lipaza **Amano PS** imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție, folosind [Omim]BF₄ ca aditiv

| Silani precursori/raport molar | Conv. [%] | A _{trans} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] | e.e.p. [%] |
|--------------------------------|-----------|---|------------|
| Lipază nativă (control) | 16 | 0,630 | 86 |
| VTMOS:TMOS 1:1 | 3 | 0,021 | 86 |
| VTMOS:TMOS 2:1 | 5 | 0,041 | 86 |
| VTMOS:TMOS 3:1 | 15 | 0,123 | 86 |
| VTMOS:TMOS 4:1 | 5 | 0,043 | 86 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | 27 | 0,220 | 86 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | 31 | 0,256 | 86 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | 15 | 0,128 | 88 |

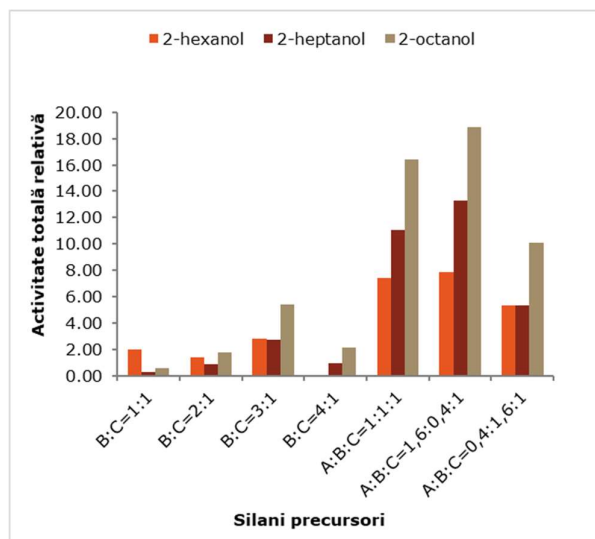
Tabel 2.12. Acilarea **2-octanolului** catalizată de lipaza **Amano PS** imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție, folosind [Omim]BF₄ ca aditiv

| Silani precursori/raport molar | Conv. [%] | A ^{trans} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] | e.e. _p [%] |
|--------------------------------|-----------|---|-----------------------|
| Lipază nativă (control) | 19 | 0,798 | 74 |
| VTMOS:TMOS 1:1 | 5 | 0,042 | 44 |
| VTMOS:TMOS 2:1 | 10 | 0,084 | 64 |
| VTMOS:TMOS 3:1 | 30 | 0,245 | 74 |
| VTMOS:TMOS 4:1 | 11 | 0,096 | 64 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | 38 | 0,327 | 74 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | 42 | 0,359 | 72 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | 30 | 0,242 | 74 |

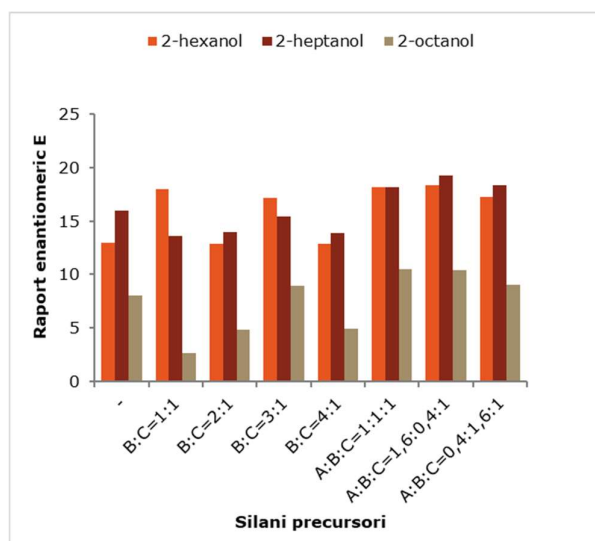
Se poate observa că în cazul preparatelor obținute din amestecuri binare de precursori în care una dintre componente a fost VTMOS, cele mai ridicate valori ale activității de transesterificare s-au obținut la un raport molar VTMOS:TMOS de 1:1 în cazul substratului 2-hexanol (dar la diferență mică de raportul 3:1), respectiv 3:1 în cazul substraturilor 2-heptanol și 2-octanol. Astfel, se poate considera că în cazul sistemelor binare creșterea conținutului de grupări vinilice în matricea de sol-gel are efect favorabil, dar numai până la o anumită limită.

În cazul matricilor de imobilizare pe bază de sisteme ternare de precursori silanici cele mai bune valori ale activității de transesterificare s-a obținut pentru raportul molar de 1,6:0,4:1 (PhTMOS:VTMOS:TMOS), indiferent de substratul testat, tendința fiind aceeași ca și în cazul entrapării sol-gel clasice (fără adsorbție).

Pe baza rezultatelor prezentate în Tabelele 2.10-2.12 s-au calculat activitățile totale relative și valorile raportului enantiomeric E, care s-au reprezentat grafic în funcție de raportul molar al silanilor precursori (Figura 2.4a și b).



a)



b)

Figura 2.4. Influența raportului molar al silanilor precursori asupra activității totale relative (a) și a raportului enantiomeric E (b), în reacția de acilare enantioselectivă la 40°C, în *n*-hexan, a 2-hexanolului, 2-heptanolului și a 2-octanolului, folosind biocatalizatori obținuți cu lipază din *Burkholderia cepacia* imobilizați prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (A=PhTMOS, B=VTMOS, C=TMOS)

Și în urma imobilizării prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (Figura 2.4a) s-au obținut valori ridicate ale activității totale relative. Folosind sistemul ternar

PhTMOS:VTMOS:TMOS (1,6:0,4:1), în cazul 2-octanolului a fost observată o creștere a activității totale relative de 18 ori, comparativ cu lipaza nativă. În cazul enantioselectivității (Figura 2.4b), cele mai bune rezultate au fost obținute pentru 2-hexanol și 2-heptanol, unde valorile raportului enantiomeric au fost în jur de 20, indiferent de raportul molar al silanilor precursori. Entraparea combinată cu sol-gel reprezintă o variantă foarte avantajoasă din punct de vedere tehnologic, deoarece biocatalizatorul are stabilitate foarte bună, conferită de prezența suportului pe care se depune matricea de sol-gel. Deoarece activitățile catalitice sunt similare cu cele de la entraparea simplă în sol-gel și enantioselectivitatea se menține ridicată, aceste preparate pot fi considerate adecvate pentru o viitoare utilizare la scară mai mare.

2.2.3. Imobilizarea lipazei din *Candida antarctica* B (Cal B) prin tehnica sol-gel combinată cu adsorbție

Acest studiu s-a realizat în completarea unor studii anterioare pentru biocatalizatori cu lipază Cal B imobilizați prin entrapare clasică în sol-gel (SGE-1) [192]. Substraturile de alcooli secundari au fost aceleași ca și în cazul lipazelor AK și PS, calculându-se conversia [%], activitatea de transesterificare [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] și e.e.p. [%] după 24 de ore de reacție, în mediu de n-hexan (Tabelele 2.13-2.15).

S-au obținut valori ridicate ale activității de transesterificare, atât pentru biocatalizatorii obținuți folosind sisteme binare de silani precursori cât și pentru cei obținuți cu sisteme ternare de silani precursori. Deoarece s-a utilizat aceeași metodologie de reacție (pentru a avea rezultate comparabile) ca și în studiile precedente, adică timp de reacție de 24 h și temperatura de 40°C, în condițiile în care eficiența catalitică a fost ridicată s-a ajuns în majoritatea reacțiilor la conversiile maxime de 50%, Cal B având enantioselectivitate practic totală pentru substraturile respective. Prin urmare, activitățile de transesterificare calculate după 24 h sunt foarte apropiate (în jur de $0,4 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) și în condițiile de reacție utilizate nu se poate face o deosebire reală între preparate.

Tabel 2.13. Acilarea *2-hexanolului* catalizată de lipaza **Cal B** imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție cu [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare.

| Silani precursori/raport molar | Conv. [%] | A _{trans} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] | e.e.p. [%] |
|--------------------------------|-----------|---|------------|
| Lipază nativă (control) | 28 | 0,929 | 96 |
| VTMOS:TMOS 1:1 | 47 | 0,341 | 98 |
| VTMOS:TMOS 2:1 | 51 | 0,373 | 98 |
| VTMOS:TMOS 3:1 | 49 | 0,373 | 98 |
| VTMOS:TMOS 4:1 | 56 | 0,365 | 98 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | 50 | 0,396 | 98 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | 50 | 0,405 | 98 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | 50 | 0,388 | 97 |

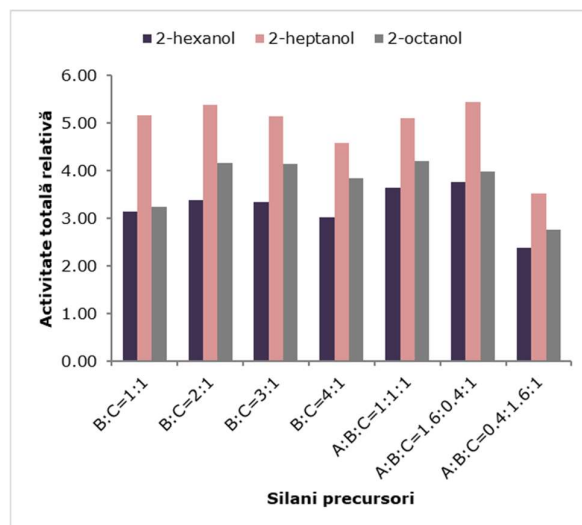
Tabel 2.14. Acilarea *2-heptanolului* catalizată de lipaza **Cal B** imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție cu [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare.

| Silani precursori/raport molar | Conv. [%] | A _{trans} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] | e.e. _{p.} [%] |
|--------------------------------|-----------|---|------------------------|
| Lipază nativă (control) | 31 | 0,647 | 98 |
| VTMOS:TMOS 1:1 | 50 | 0,390 | 98 |
| VTMOS:TMOS 2:1 | 50 | 0,414 | 98 |
| VTMOS:TMOS 3:1 | 50 | 0,399 | 98 |
| VTMOS:TMOS 4:1 | 50 | 0,385 | 98 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | 50 | 0,386 | 98 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | 50 | 0,408 | 98 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | 50 | 0,401 | 96 |

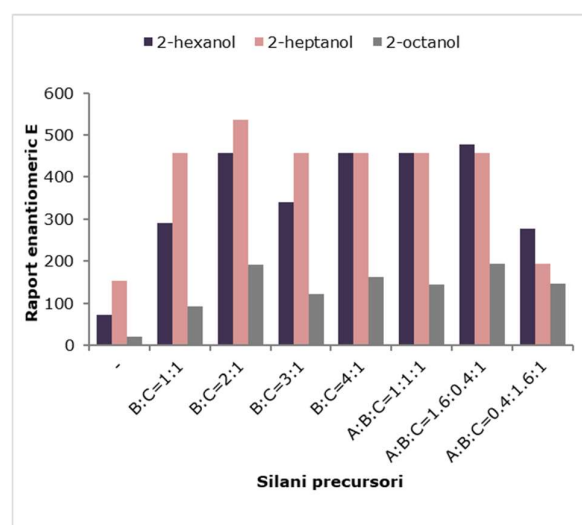
Tabel 2.15. Acilarea *2-octanolului* catalizată de lipaza **Cal B** imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție cu [Omim]BF₄ ca aditiv de imobilizare.

| Silani precursori/raport molar | Conv. [%] | A _{trans} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] | e.e. _{p.} [%] |
|--------------------------------|-----------|---|------------------------|
| Lipază nativă (control) | 18 | 0,824 | 89 |
| VTMOS:TMOS 1:1 | 45 | 0,312 | 95 |
| VTMOS:TMOS 2:1 | 50 | 0,406 | 96 |
| VTMOS:TMOS 3:1 | 49 | 0,410 | 95 |
| VTMOS:TMOS 4:1 | 50 | 0,410 | 95 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | 50 | 0,405 | 95 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | 50 | 0,380 | 96 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | 50 | 0,402 | 95 |

Pe baza rezultatelor prezentate în Tabelele 2.13-2.15 au fost calculate activitatea totală relativă și enantioselectivitatea și s-a reprezentat grafic în funcție de raportul molar al silanilor precursori (Figura 2.5a și 2.5b).



a)



b)

Figura 2.5. Influența raportului molar al silanilor precursori asupra activității totale relative (a) și a raportului enantiomeric E (b), în reacția de acilare enantioselectivă în *n*-hexan, la 40°C, a 2-hexanolului, 2-heptanolului și a 2-octanolului, folosind biocatalizatori obținuți cu lipază din *Candida antarctica* B imobilizați prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (A=PhTMOS, B=VTMOS, C=TMOS).

Așa cum era de așteptat, valorile sunt apropiate și pentru aceste caracteristici, în special pentru activitatea totală relativă. Chiar în aceste condiții, valorile activității totale relative au fost mari, între 3 și 5, ceea ce denotă o activare consistentă a enzimei în urma imobilizării.

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

În consecință, preparatele obținute prin imobilizarea lipazei din *Candida antarctica* B prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție au avut activitate catalitică și enantioselectivitate foarte ridicate, indiferent de sistemul binar sau ternar și raportul molar al silanilor precursori care au fost utilizați în aceste experimente. Concluzia cea mai importantă este că există o varietate mare de preparate care au eficiență catalitică ridicată pe substraturile model și din acestea vor putea fi selectate cele care sunt eficiente pe diverse alte substraturi. Asemenea studii au fost realizate pentru alcooli secundari cu structură heteraromatică [193], dar nu fac obiectul acestei teze. În vederea determinării condițiilor optime de imobilizare este nevoie de studiul evoluției în timp al acestor reacții de rezoluție cinetică, pentru a determina timpul de reacție după care se ajunge la conversie de 50%.

2.2.4. Imobilizarea lipazei din *Candida antarctica* A prin tehnica sol-gel

Obținerea biocatalizatorilor cu eficacitate catalitică ridicată, selectivitate și stabilitate reprezintă una dintre cele mai mari provocări din zilele noastre. Lipaza din *Candida antarctica* A (Cal A) a fost mai puțin studiată în reacții biocatalitice comparativ cu Cal B, dar este o enzimă promițătoare datorită stabilității termice și selectivității pentru anumite substraturi care nu sunt transformate de alte enzime (ex. alcooli terțiari).

În acest studiu, lipaza Cal A a fost imobilizată prin entrapare în matrici de sol-gel, folosind sisteme binare și ternare de silani precursori, octiltrimetoxisilan/tetrametoxisilan (OcTMOS:TMOS, la un raport molar 1:1), feniltrimetoxisilan/tetrametoxisilan (PhTMOS:TMOS la un raport molar de 1:1), viniltrimetoxisilan/tetrametoxisilan (VTMOS:TMOS la un raport molar de 1:1), feniltrimetoxisilan/metiltrimetoxisilan/ tetrametoxisilan (PhTMOS:MeTMOS:TMOS la un raport molar de 1,6;0,4:1) și feniltrimetoxisilan/viniltrimetoxisilan/ tetrametoxisilan (PhTMOS:VTMOS:TMOS la un raport molar de 1,6:0,4:1).

Selecția precursorilor silanici și utilizarea ca materie primă pentru matricea sol-gel a diferitelor combinații de tetrametoxisilan sau trimetoxisilan având o grupare fenil, octil sau vinil nehidrolizabilă, a fost demonstrată în studiile noastre anterioare pentru lipazele din *Candida antarctica* B, *Pseudomonas fluorescens* și *Burkholderia cepacia* [150,194,195]. Ca aditiv s-a folosit lichidul ionic [Omin]BF₄.

S-a studiat influența metodei de imobilizare și natura silanilor precursori asupra eficienței catalitice și a enantioselectivității lipazei.

2.2.4.1. Studiul influenței metodei de imobilizare a lipazei Cal A și a compoziției sistemului de silani precursori asupra eficienței catalitice a biocatalizatorului imobilizat

Reacția de acilare a alcoolilor secundari 2-hexanol, 2-heptanol și 2-octanol cu acetat de vinil s-a realizat la 40°C, în *n*-hexan și a fost folosită ca reacție model pentru evaluarea proprietăților catalitice ale biocatalizatorilor imobilizați.

S-au realizat studii în timp pentru a urmări evoluția conversiei în cazul preparatelor imobilizate prin două metode diferite, SGE-1 și SGE-2, comparativ cu lipaza nativă. Au fost prelevate și analizate probe la diferite intervale de timp pentru reacția de acilare a 2-hexanolului, catalizată de lipaza *Candida antarctica* A nativă și imobilizată, iar rezultatele sunt prezentate în Figura 2.6, respectiv Figura 2.7. Activitățile de transesterificare și valorile exceselor enantiomerice ale produșilor de reacție sunt prezentate în Tabelul 2.16 și Tabelul 2.17.

Din Figura 2.6 se poate observa că pentru enzima imobilizată prin metoda SGE-1 (fără prepolimer) folosind un sistem de silani precursori PhTMOS:TMOS la un raport molar de 1:1, conversia a fost aproape totală după 24 de ore, mai mare decât în cazul enzimei native și a preparatului imobilizat cu VTMO:TMOS (la același raport molar 1:1), pentru care conversia a ajuns doar la 55%, respectiv 53%. Evident, structura chimică a grupelor nehidrolizabile a silanilor precursori regăsite în matricea sol-gel are o influență importantă asupra activității.

Acest efect se datorează probabil hidrofobicității diferite a grupării fenil în comparație cu gruparea vinil, o caracteristică esențială în special în cazul reacțiilor care au loc în mediu nepolar. O concentrație ridicată de grupări fenil are efect favorabil asupra activității lipazelor imobilizate în sol-gel, observat și pentru lipaza Cal B, în studii anterioare [150].

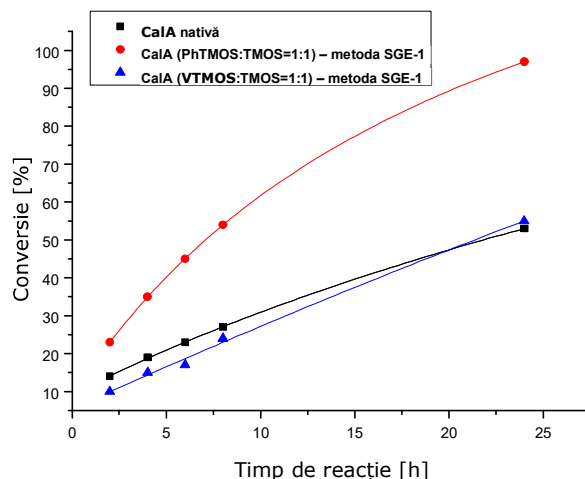


Figura 2.6. Acilarea 2-hexanolului cu acetat de vinil în *n*-hexan timp de 24 de ore, catalizată de lipaza *Candida antarctica* A nativă (negru), respectiv imobilizată prin entrapare în sol-gel cu metoda SGE-1 cu PhTMOS:TMOS la raport molar 1:1 (roșu) și VTMO:TMOS la raport molar 1:1 (albastru)

Metoda SGE-2 de imobilizare se bazează pe formarea unui sol prepolimer, urmat de gelifiere după schimbarea pH-ului în domeniul bazic, prin adăugarea de amoniac. Rezultatele obținute după utilizarea biocatalizatorilor SGE-2, prezentate în Tabelul 2.16 și Figura 2.7 indică o scădere a valorilor parametrilor determinați (conversie și activitatea de transesterificare) comparativ cu rezultatele obținute cu metoda SGE-1, unde s-a folosit ca și catalizator NaF pentru reacția de condensare și policondensare. Conversia după 24 de ore a ajuns la 31% pentru preparatele obținute

cu PhTMOS și TMOS (comparativ cu >99% când s-a folosit metoda SGE-1 cu același sistem de silani precursori) și mai puțin de 26% pentru preparatele obținute folosind un amestec ternar de silani precursori ce conține și MeTMOS ca al treilea precursor (PhTMOS:MeTMOS:TMOS, la un raport molar de 1,6:0,4:1).

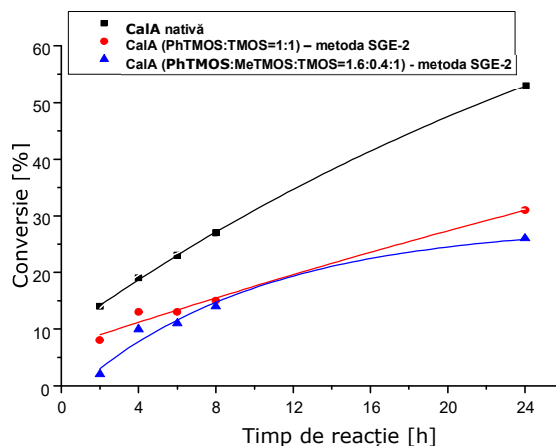


Figura 2.7. Acilarea 2-hexanolului cu acetat de vinil în *n*-hexan la 40°C timp de 24 de ore, catalizată de lipaza din *Candida antarctica* A, nativă (negru), respectiv imobilizată prin entrapare în sol-gel folosind metoda SGE-2 cu PhTMOS:TMOS la raport molar 1:1 (roșu) și cu PhTMOS: MeTMOS:TMOS la raport molar 1,6:0,4:1 (albastru).

Tabel 2.16. Influența metodei de imobilizare și a compoziției sistemului de silani precursori asupra activității lipazei *Candida antarctica* A, imobilizată prin entrapare în sol-gel, în reacția de acilare a alcoolilor alifatici secundari cu acetat de vinil

| Biocatalizator | $A_{trans}[\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}]$ | | | | | |
|--|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 2-hexanol | | 2-heptanol | | 2-octanol | |
| Cal A imobilizată Silani precursori (raport molar) | Metoda SGE-1 | Metoda SGE-2 | Metoda SGE-1 | Metoda SGE-2 | Metoda SGE-1 | Metoda SGE-2 |
| OctMOS:TMOS (1:1) | 0,825 | 0,710 | 0,720 | 0,726 | 0,808 | 0,865 |
| PhTMOS:TMOS (1:1) | 0,806 | 0,156 | 0,770 | 0,094 | 0,775 | 0,089 |
| VTMOS:TMOS (1:1) | 0,433 | 0,156 | 0,301 | 0,052 | 0,329 | 0,055 |
| PhTMOS:MeTMOS:TMOS (1,6:0,4:1) | 0,793 | 0,146 | 0,744 | 0,082 | 0,842 | 0,083 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS (1,6:0,4:1) | 0,705 | 0,102 | 0,720 | 0,042 | 0,834 | 0,042 |
| Cal A Nativă | 0,854 | | 0,348 | | 0,490 | |

Majoritatea biocatalizatorilor obținuți prin metoda SGE-1 (Tabelul 2.16) au avut o activitate excelentă pentru toate substraturile testate. Singura excepție a fost preparatul cu VTMOs:TMOS la raport molar de 1:1, cu activități de până la 50% mai mici comparativ cu ceilalți biocatalizatori, în funcție de substratul testat.

Valorile acestor activități au fost remarcabile în comparație cu enzima nativă Cal A, doar cu 20% mai mică în cazul 2-hexanolului și cu până la 40% mai mari în cazul 2-heptanolului și a 2-octanolului. Rezultatele prezentate sunt mai bune comparativ cu rezultatele raportate anterior pentru Cal B în aproape aceleași condiții [150], demonstrând viabilitatea și eficiența acestei metode de imobilizare a enzimei Cal A, chiar și dacă aceste activități mari sunt asociate cu o enantioselectivitate scăzută, cum va fi arătat.

Contrar metodei SGE-1, metoda SGE-2 a dus la obținerea de biocatalizatori cu activități mai mici în comparație cu enzima nativă. Excepție a făcut preparatul obținut cu precursori OctTMOS și TMOS utilizat în reacția de acilare cu 2-heptanol și 2-octanol, unde valorile activităților obținute au fost apropiate cu cele obținute cu metoda SGE-1 și considerabil mai mari decât cele obținute cu Cal A nativă.

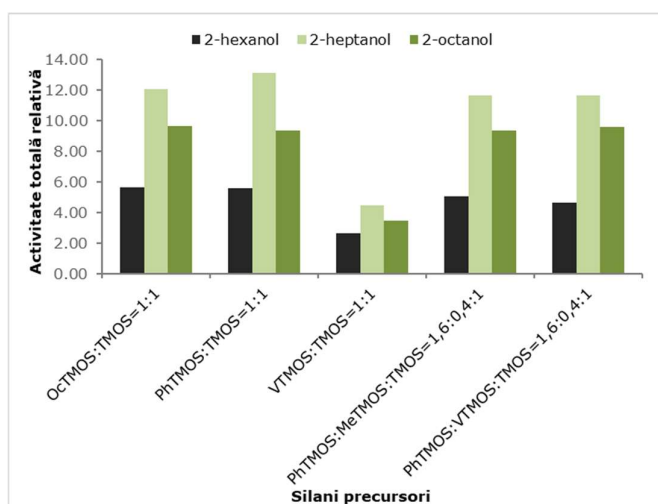


Figura 2.8. Influența metodei de imobilizare asupra activității totale relative a lipazei imobilizate *Candida antarctica A* prin metoda SGE-1, în reacția de acilare a alcoolilor secundari cu acetat de vinil.

Activitatea relativă totală a fost calculată cu scopul de a evidenția eficiența imobilizării sol-gel, demonstrată prin valori mai mari ale activității calculate pentru toată cantitatea de preparat imobilizat comparativ cu activitatea totală a enzimei supuse imobilizării. O creștere spectaculoasă a fost observată pentru biocatalizatorii imobilizați prin metoda SGE-1, până la de 13 ori comparativ cu lipaza nativă pentru substratul 2-heptanol, așa cum rezultă din Figura 2.8.

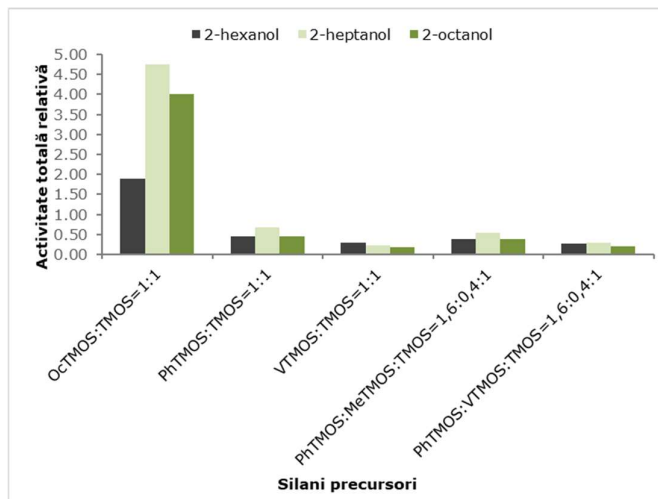


Figura 2.9. Influența metodei de imobilizare asupra activității relative totale a lipazei imobilizate *Candida antarctica* A prin metoda SGE-2, în reacția de acilare a alcoolilor secundari cu acetat de vinil.

Pentru biocatalizatorii obținuți cu metoda SGE-2, valorile activității totale relative au fost mai mici de 1, ceea ce înseamnă că o parte a activității a fost pierdută în timpul imobilizării sau accesul substratului la enzima entrapată a fost blocat. O altă posibilă explicație a pierderii activității observată după imobilizarea prin metoda SGE-2 poate fi din cauza unor schimbări în structura enzimei (o puternică rigidizare), ceea ce duce la scăderea activității catalitice, explicație găsită și de Rodriguez și colab. [196]. Preparatul obținut cu OctTMOs și TMOS a făcut excepție, având o activitate totală relativă mai mare de 2. Se poate presupune că prezența grupei octil (puternic hidrofobă) în matrice a fost benefică pentru activitatea lipazei și influențează structura materialului mesoporos obținut, facilitând transferul de masă către și de la centrul activ.

Excesul enantiomeric este un alt parametru esențial pentru rezoluția cinetică enzimatică și este deosebit de importantă pentru Cal A, deoarece enzima are o enantioselectivitate scăzută pentru majoritatea substraturilor testate [197]. Așa cum se vede din Tabelul 2.17, valorile enantioselectivității reacției de acilare catalizată de preparatele imobilizate obținute prin metoda SGE-1 au fost foarte scăzute, pentru toți alcoolii testați. Viteza reacției de transacilare a fost practic aceeași pentru ambii enantiomeri prezenți în substratul racemic, la fel ca și în cazul enzimei native Cal A.

Contrar metodei SGE-1, prin metoda SGE-2 de imobilizare s-au obținut biocatalizatori (exceptând preparatele obținute cu OctTMOs și TMOS) cu care se pot obține valori ridicate ale excesului enantiomeric pentru produși și valori excelente ale raportului enantiomeric ($E > 100$), pentru toate substraturile. Când $E > 100$ se poate considera că biocatalizatorul discriminează eficient enantiomerii prezenți în amestecul racemic și procesul este potrivit pentru a fi realizat la scală mare.

Tabel 2.17. Îmbunătățirea enantioselectivității lipazei din *Candida antarctica* A, în funcție de protocolul de imobilizare. Valorile excesului enantiomeric e.e.p.[%] au fost determinate pentru rezoluția cinetică a alcoolilor secundari alifatici racemici.

| Biocatalizator | Exces enantiomeric e.e.p.[%] | | | | | |
|-------------------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 2-hexanol | | 2-heptanol | | 2-octanol | |
| | Metoda SGE-1 | Metoda SGE-2 | Metoda SGE-1 | Metoda SGE-2 | Metoda SGE-1 | Metoda SGE-2 |
| Silani precursori (raport molar) | | | | | | |
| OctMOS:TMOS (1:1) | 2 | - | - | 1 | - | 1 |
| PhTMOS:TMOS (1:1) | - | 94 | 1 | 93 | 1 | 71 |
| VTMOS:TMOS (1:1) | 13 | 99 | 25 | 97 | 20 | 98 |
| PhTMOS:MeTMOS:TMOS (1,6:0,4:1) | 1 | 99 | 1 | 98 | 1 | 98 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS (1,6:0,4:1) | 1 | 99 | 1 | 97 | - | 98 |
| Cal A Nativă | | 8 | | 2 | | 2 |

Doar pe baza acestor date experimentale este imposibil de explicat această creștere de enantioselectivitate în urma imobilizării. Un studiu realizat de Wikmark și colab. a demonstrat că prin modificarea genetică a Cal A s-au obținut mutanți cu selectivitate îmbunătățită pentru transacilarea 1-feniletanolului, valorile lui E crescând de la 3 până la mai mult de 100 [197]. Acest studiu arată aproximativ aceeași creștere a enantioselectivității, doar prin alegerea potrivită a condițiilor de imobilizare.

Aceste rezultate demonstrează că imobilizarea enzimelor poate reprezenta un instrument simplu și eficient pentru schimbarea proprietăților enzimelor și entraparea în sol-gel poate fi o variantă în acest sens [198].

2.2.5. Concluzii

În urma imobilizării lipazelor din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK), *Burkholderia cepacia* (Amano PS), *Candida antarctica* B (Cal B) și *Candida antarctica* A (Cal A) în matrici de sol-gel conținând grupări funcționale vinilice s-au obținut pentru fiecare lipază noi biocatalizatori, cu proprietăți catalitice adecvate pentru reacții de rezoluție cinetică.

Pentru a determina efectul prezenței grupărilor vinil în matricea sol-gel asupra activității și enantioselectivității, biocatalizatorii obținuți au fost testați în reacții de acilare a 3 alcoolii secundari alifatici (2-hexanol, 2-heptanol și 2-octanol), în mediu *n*-hexan.

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

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

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

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

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

Lipaza Cal A a fost imobilizată prin două metode sol-gel (SGE-1 și SGE-2). La preparatele obținute conform metodei SGE-1 s-au obținut valori foarte ridicate ale activității de transesterificare, pentru toate substraturile studiate. În ceea ce privește enantioselectivitatea, s-a observat că lipaza nativă are o enantioselectivitate redusă, dar prin imobilizare folosind metoda SGE-2 s-au obținut biocatalizatori care discriminează eficient enantiomerii prezenți în amestecul racemic.

2.3. Caracterizarea biocatalizatorilor obținuți prin imobilizare în matrici de sol-gel cu grupări vinilice

S-a realizat caracterizarea structurală și morfologică și s-a studiat comportamentul termic pentru o selecție de preparate imobilizate din *Pseudomonas fluorescens* pe bază de amestecuri ternare de silani precursori, prezentate în Tabelul 2.18. Toate aceste preparate au avut proprietățile catalitice foarte bune, așa cum a rezultat din datele prezentate în subcapitolul 2.2 [184].

Tabel 2.18. Biocatalizatori obținuți cu lipază din *Pseudomonas fluorescens* caracterizați din punct de vedere structural, morfologic și al comportamentului termic

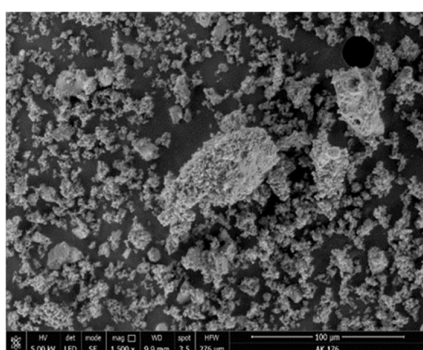
| Metoda de imobilizare | Biocatalizatori utilizați pentru caracterizarea proprietăților (silani precursori/rapoarte molare) |
|-----------------------|--|
| SGE-1 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 |
| SGE-1 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 |
| SGE-1 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 |
| SGE-A | PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1+Celite 545 |

2.3.1. Caracterizarea prin microscopie electronică de scanare–SEM

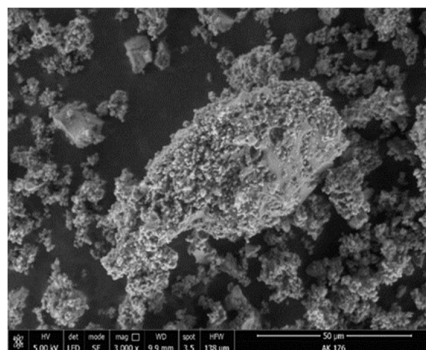
Studiile SEM au fost efectuate pentru a analiza efectul diferiților silani precursori și a procedurilor de imobilizare asupra morfologiei materialului sol-gel cu lipază entrapată/imobilizată. Această analiză arată caracteristici importante ale morfologiei biocatalizatorilor imobilizați și ale adsorbentului, informații care pot fi

corelate cu eficiența catalitică în reacția de transesterificare. Imaginile SEM sunt prezentate în Figura 2.10, la două rezoluții diferite, 1500x μm respectiv 3000x μm .

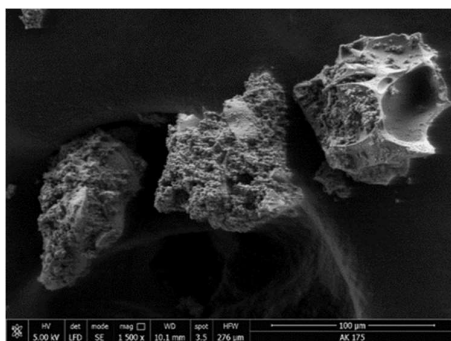
Imaginile SEM (Figura 2.10a și 2.10b) pentru preparatul obținut prin metoda SGE-1 la un raport molar PhTMOS:VTMOS:TMOS de 1,6:0,4:1 a silanilor precursori, cu conținut mai mare de grupări fenil, arată o structură tipică poroasă, specifică nanomaterialelor cu silice. O structură de microcanale se poate observa pe întreaga suprafață scanată, cu pori ordonați, structură care este corelată cu valorile bune obținute ale activității de transesterificare pentru toate substraturile testate, ceea ce înseamnă că substratul poate ajunge ușor la centrul activ al lipazei, fără obstacole semnificative datorate matricii sol-gel.



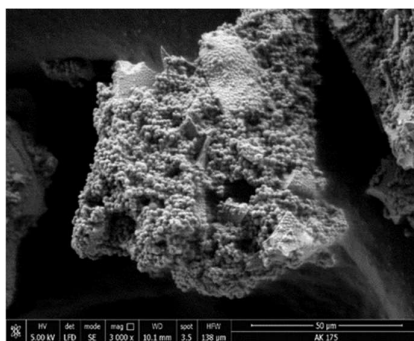
a)



b)



c)



d)

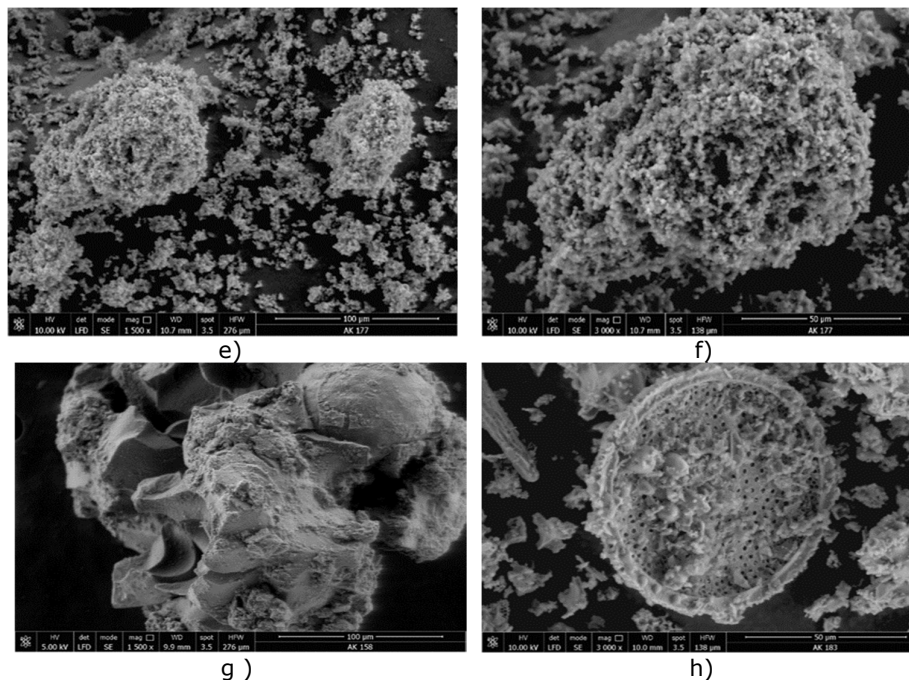


Figura 2.10. Imagini SEM ale lipazei din *Pseudomonas fluorescens* entrapată prin sol-gel (metodele SGE-1 și SGE-A) folosind diferite combinații ale precursorilor silanici: PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1, SGE-1 (a, rezoluție 1500x; b, rezoluție 3000x); PhTMOS:VTMOS:TMOS=1:1:1, SGE-1 (c, rezoluție 1500x; d, rezoluție 3000x); PhTMOS:VTMOS:TMOS=0,4:1,6:1, SGE-1 (e, rezoluție 1500x; f, rezoluție 3000x); (g) TMOS, SGE-1; PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1 + Celite 545, SGE-A (h)

În cazul preparatului enzimatic obținut la un raport echimolar între silanii precursori (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1:1:1, Figura 2.10d) porozitatea este apropiată cu cea a preparatului obținut având un conținut mai mare de grupări fenil și un conținut mai mic de grupări vinil (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1, Figura 2.10b), dar se poate observa o structură mai compactă, care se poate corela cu o mică scădere a activității.

Mai mult, creșterea conținutului de grupări vinil în matrice duce la o scădere semnificativă a valorilor activității de transesterificare și a excesului enantiomeric pentru toate substraturile testate, prezentate în Tabelele 2.1.- 2.6. Imaginile SEM ale preparatului (PhTMOS:VTMOS:TMOS=0,4:1,6:1), (Figura 2.10e și 2.10f) arată o structură mai poroasă, cu pori mici. Microporozitatea matricii probabil nu permite substratului să ajungă la centrul activ al lipazei, inducând o limitare a transferului de masă.

Printre biocatalizatorii entrapați în sol-gel, cele mai mici valori ale activității de transesterificare (în intervalul 0,022-0,036 $\mu\text{moli}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) au fost obținute folosind doar TMOS ca precursor pentru matricea sol-gel. Imaginile SEM ale acestui preparat sunt total diferite, morfologia este amorfă cu blocuri compacte și neregulate

(Figura 2.10g). Matricea este probabil prea strânsă, de aceea este esențial să se utilizeze precursori cu un conținut mai mare de alchil-trialcoxisilan față de tetraalcoxisilan, pentru a obține un material sol-gel cu o porozitate potrivită pentru transferul de masă corespunzător al reactantului și produsului.

Morfologia biocatalizatorului SGE-A obținut prin entrapare în sol-gel urmată de adsorbția pe un suport solid (Celite 545) a fost complet diferită. Se poate observa ușor că particulele de xerogel sunt formate atât pe suprafața suportului solid cât și în interiorul porilor (Figura 2.10h). Rezultatele au fost similare cu cele prezentate de Meunier și colab. [200]. Formarea matricii sol-gel în interiorul porilor suportului Celite 545 poate fi o explicație a scăderii ușoare a eficienței catalitice. Este posibil ca o cantitate mai mare de lipază să fi fost entrapată în interiorul porilor adsorbentului și difuzarea substratului devine mai lentă în acest caz. Este important de subliniat faptul că silanii precursori, aditivii și adsorbentul trebuie atent selectați pentru fiecare aplicație.

2.3.2. Caracterizarea prin microscopie de fluorescență – FITC

Imagistica microscopică confocală poate furniza informații importante privind distribuția enzimei immobilizate în interiorul matricii de sol-gel, care este esențială pentru accesibilitatea enzimei din partea moleculelor de substrat. Agregarea moleculei enzimei în timpul procesului de gelifiere nu poate fi exclusă, întrucât omogenitatea amestecului nu poate fi asigurată și timpul de gelifiere poate fi destul de lung. Prezența diferiților aditivi în timpul procesului de immobilizare are rolul de a preveni această agregare, pe lângă protejarea enzimei împotriva denaturării cauzate de diferite alte specii moleculare care pot fi prezente în sistem.

Luând în considerare că lipaza din *Pseudomonas fluorescens* nu are fluorescență naturală, a fost necesară marcarea sa cu un compus fluorocrom, fluorescein-isotiocianatul (FITC). Marcarea s-a realizat conform metodei PIERCE EZ-Label™ FITC Labeling Kit, apoi immobilizarea s-a efectuat folosind aceeași metodologie ca în cazul enzimei nemarcate, prin entrapare în sol-gel și entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite 545.

Figura 2.11a prezintă imaginea pentru immobilizarea prin entrapare în sol-gel SGE-1 (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1) a lipazei Amano AK în timp ce Figura 2.11b arată imaginea biocatalizatorului obținut prin metoda combinată cu aceiași silani precursori, folosind Celite 545 ca suport solid. Aceste imagini au fost înregistrate în modul de scanare, pentru o imagine mai bună a morfologiei suprafeței

Scanările cu laser au permis obținerea unei imagini tridimensionale a particulelor studiate la o adâncime de 2-5 μm. Profilul suprafeței enzimei immobilizate active demonstrează că enzima este distribuită atât la suprafață cât și în interiorul xerogelului. În ambele cazuri, lipazele marcate sunt distribuite în întreaga matrice, sugerând o uniformitate a enzimei în preparatele immobilizate.

În același timp, în cazul matricii sol-gel SGE-1 sintetizată doar cu TMOS (Figura 2.11c) se observă o fluorescență diferită, cu blocuri compacte care mențin enzima strânsă, o structură care poate fi corelată cu scăderea activității de transesterificare a biocatalizatorului. Cu toate că distribuția enzimei în interiorul matricii sol-gel nu pare să fie diferită, morfologia materialului a avut o influență puternică asupra eficienței catalitice. De aceea a fost necesar să se continue investigarea prin alte metode de caracterizare, pentru a avea o imagine mai completă asupra acestei influențe.

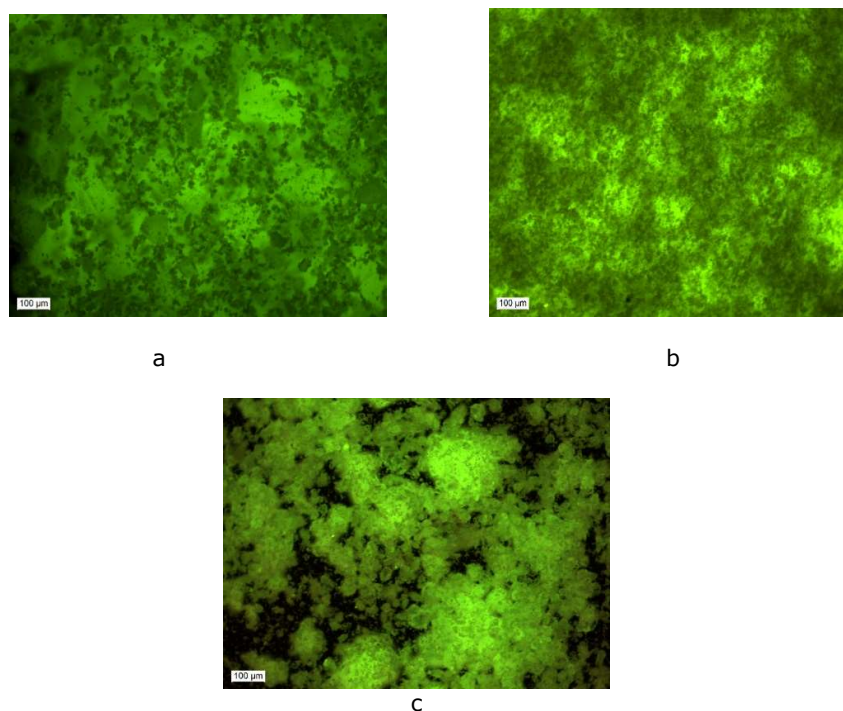


Figura 2.11. Imagini fluorescente (rezoluție 10x) ale lipazei Amano AK imobilizată prin sol-gel (a) FITC-marcată SGE-1 (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1); (b) FITC-marcată SGE-A (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1)+Celite 545 (c) FITC-marcată SGE-1 (TMOS);

2.3.3. Caracterizarea prin spectroscopie FT-IR

Spectroscopia FT-IR este una dintre cele mai populare metode de caracterizare a microstructurii materialelor de tip sol-gel. Rezultatele FT-IR au confirmat prezența grupelor funcționale alchil și aril ale silanilor precursori (Figura 2.12) în matricea sol-gel, dar analiza nu a fost capabilă să localizeze enzima, deoarece banda grupării amidice a fost acoperită de alte vibrații ale structurii matricii sol-gel.

Toate preparatele analizate au prezentat benzile caracteristice compușilor cu siliciu: 1055, 1041, 1028, 1037 cm^{-1} atribuite Si-O-Si (1090-1030 cm^{-1}); 786, 777, 767 cm^{-1} , benzi specifice legăturilor Si-CH₃ (860-760 cm^{-1}). Benzile intense Si-OH între 3700-3200 cm^{-1} lipsesc, ceea ce demonstrează că aproape toate grupările OH au fost implicate în matricea sol-gel, confirmând relația dintre reacția de condensare și contracție a diferitelor tipuri de silani precursori. Absența grupărilor reziduale Si-OH explică hidrofobicitatea matricii sol-gel și disponibilitatea acestor biocatalizatori de a fi folosiți în solvenți organici nepolari.

Benzile grupărilor metilen în regiunea 2800-2900 cm^{-1} , pot fi atribuite grupărilor alchil ale lichidului ionic folosit ca și aditiv. Am demonstrat anterior că acest

aditiv nu este complet îndepărtat în etapa de spălare, rămânând încorporat în structura matricii sol-gel [194].

Prezența grupărilor fenil în preparatele imobilizate (Figura 2.12b și 2.12c) este demonstrată de benzile specifice grupei CH din nucleul aromatic al benzenului și vibrației scheletului aromatic, la $734-736\text{ cm}^{-1}$ respectiv $696-698\text{ cm}^{-1}$. Aceste benzi se observă cel mai bine în spectrele preparatelor în care grupările fenil sunt în concentrație mai mare SGE-1 (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1). Benzile specifice de la 1409 cm^{-1} și 968 cm^{-1} , pot fi atribuite legăturilor ν_s și δ_{CH_2} , a grupărilor Si-CH=CH₂ ($1410-1390\text{ cm}^{-1}$; $960-980\text{ cm}^{-1}$), intensitatea benzilor este mai mare în preparatele SGE-1 (PhTMOS:VTMOS:TMOS=0,4:1,6:1), în conformitate cu creșterea concentrației grupărilor vinil în matricea sol-gel. Aceste rezultate confirmă că toți precursorii au fost incluși în matricea sol-gel, prezența acestor grupări funcționale fiind esențială pentru activitatea și stabilitatea operațională a enzimei entrapate.

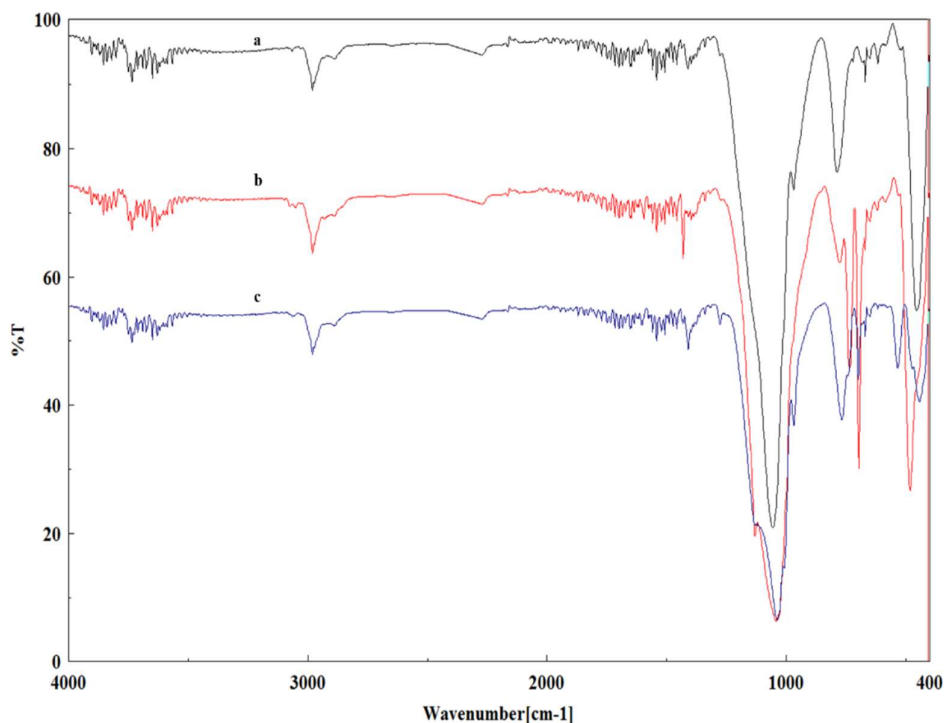


Figura 2.12. Spectre FT-IR ale preparatelor imobilizate cu lipază din *Pseudomonas fluorescens*, obținute prin entrapare în sol-gel cu diferiți silani precursori prin metoda SGE-1: (a) TMOS; (b) PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1; (c) PhTMOS:VTMOS:TMOS=0,4:1,6:1

2.3.4. Caracterizarea prin microscopie de forță atomică (AFM)

Imaginile AFM au fost înregistrate pentru a completa analiza SEM și pentru a investiga topografia suprafeței, deoarece analiza SEM nu oferă informații privind

conformația structurii interne poroase. AFM furnizează imagini tridimensionale ale suprafeței probei și este de ajutor în caracterizarea la scară nanometrică a suprafeței privind neomogenitatea și robustețea, precum și a morfologiei structurii poroase.

Măsurătorile particulelor din preparatele studiate au fost realizate pe baza datelor AFM. Numărul de nanounități și media volumului de nanounități au fost estimate din câteva imagini ale fiecărei probe.

Tabelul 2.19 rezumă măsurătorile AFM pentru biocatalizatori entrapați prin sol-gel. Numărul de nanounități a suprafeței scanate de $1 \mu\text{m}^2$, a fost între 176 și 680, iar media volumului de nanounități a variat de la 491 la 37 nm^3 .

Tabelul 2.19. Datele AFM ale lipazelor imobilizate prin sol-gel (numărul de nanounități raportat la o suprafață de $1 \mu\text{m}^2$, media volumului și suprafața medie a nanounității).

| Silani precursori (raport molar) / Cod preparat | Media numărului de nanounități | Media volumului de nanounități [nm^3] | Media suprafeței de nanounități [nm^2] |
|---|--------------------------------|--|---|
| TMOS / SGE-1 | 176 | 491 | 3,72 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS (1,6:0,4:1) / SGE-1 | 680 | 37 | 0,58 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS (1:1:1) / SGE-1 | 183 | 493 | 3,93 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS (0,4:1,6:1) / SGE-1 | 432 | 98 | 1,10 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS (1,6:0,4:1+Celite) / SGE-A | 387 | 110 | 1,20 |

Deși este dificil de a corela direct activitățile și enantioselectivitățile probelor studiate cu rezultatele AFM, această tehnică oferă informații valoroase.

Cel mai mic număr de nanounități a fost obținut pentru preparatele SGE-1 obținute doar cu precursorul TMOS în timp ce numărul cel mai mare a fost obținut pentru preparatele SGE-1, PhTMOS:VTMOS:TMOS (1,6:0,4:1), preparate pentru care s-au obținut cele mai bune rezultate ale activității.

Numărul de nanounități ale biocatalizatorilor (PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1+Celite) obținuți prin metoda combinată de imobilizare a fost mai mic comparativ cu aceleași preparate obținute fără adsorbția pe Celite. Modificarea relativă a cantității de silani precursori cu grupări fenil și vinil duc la structură nanoporoasă diferită, dar aceasta nu este corelată cu valorile activității. Interacțiunile hidrofobe care au loc în interiorul structurii poroase între grupările alchil și aril și ale zonei hidrofobe specifice din structura secundară a lipazei numită „capac” joacă probabil un rol decisiv atât în morfologia structurii poroase cât și în activitatea lipazei imobilizate, dar fără a se putea stabili o corelare cantitativă.

Așa cum se vede în Figura 2.13, toate materialele studiate au un conținut de nanostructuri cu nanounități bine definite, uniforme ca mărime. Mărimea mesoporilor variază între 2-4 nm pentru toate preparatele testate. Rugozitatea suprafeței (S_a) a preparatelor imobilizate prin sol-gel a fost între 0,12 și 0,01 nm; adâncimea (S_v) a avut valori de minim -1 nm și înălțimea maximă a picului (S_p) a ajuns la 2,8 nm pentru SGE-A (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1)+Celite 545 și doar de 1,1 nm pentru preparatele SGE-1. Rugozitatea depinde de natura precursorilor silanici, dar suprafața a fost uniformă și fină pentru toate preparatele, fără agregate mari.

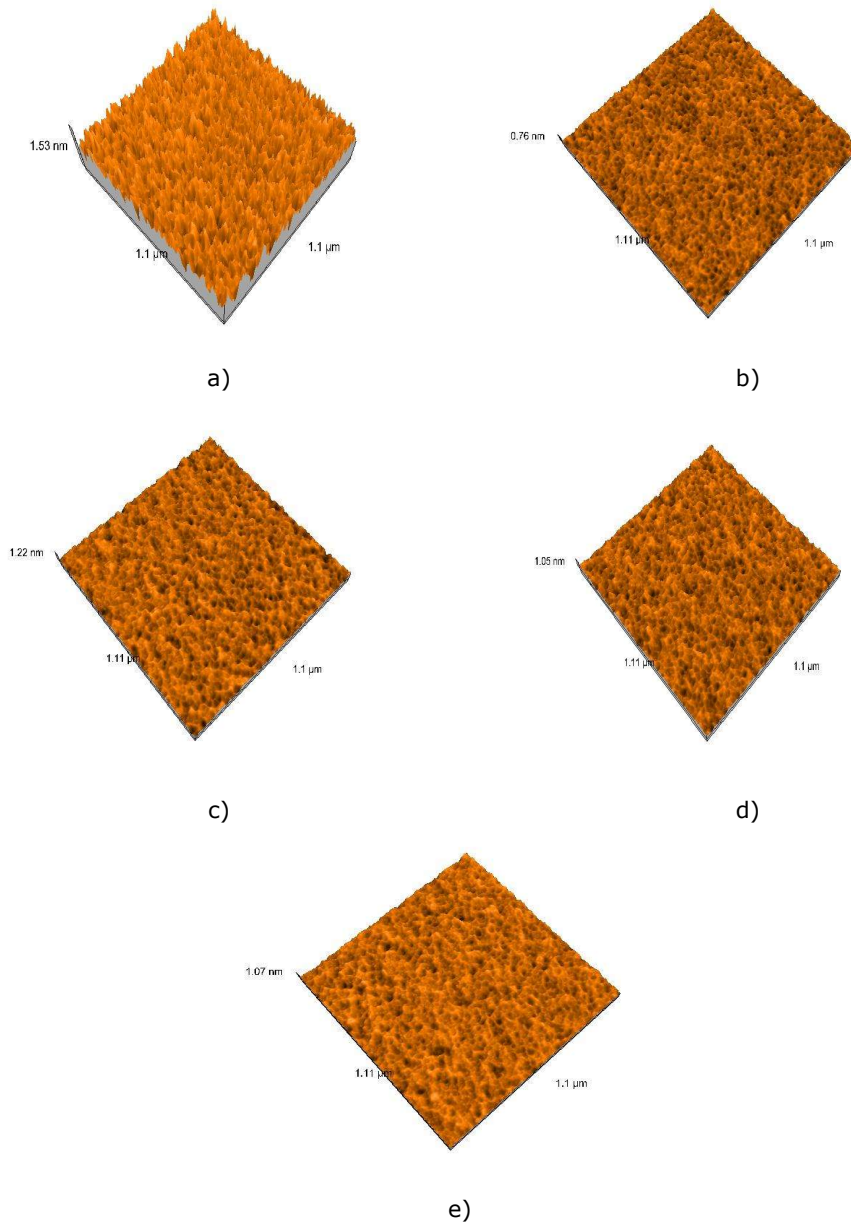


Figura 2.13. Imaginile 3D AFM ale lipazei immobilizate prin entrapare în sol-gel din *Pseudomonas fluorescens*, folosind diferite combinații de silani precursori: (a) SGE-1 (TMOS); (b) SGE-1(PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1), (c) SGE-1 (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1:1:1), (d) SGE-1 (PhTMOS:VTMOS:TMOS=0,4:1,6:1) și (e) SGE-A (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1)+Celite 545;

În toate probele testate, nanoparticulele au fost distribuite regulat, astfel imaginile AFM au confirmat rezultatele privind morfologia structurii materialului hibrid obținute folosind SEM și microscopia de fluorescență.

2.3.5. Analiza termică

2.3.5.1. Analiza termică a preparatelor immobilizate din lipaza *Pseudomonas fluorescens*

Analiza termogravimetrică (TGA) furnizează informații importante despre intervalul de temperatură în care probele suferă o schimbare conformațională majoră, prin monitorizarea profilului de pierdere în masă în funcție de temperatură. Curbele pierderilor de masă ale preparatelor immobilizate prin sol-gel au fost împărțite în trei regiuni, în funcție de fenomenele principale care pot schimba viteza acestui proces.

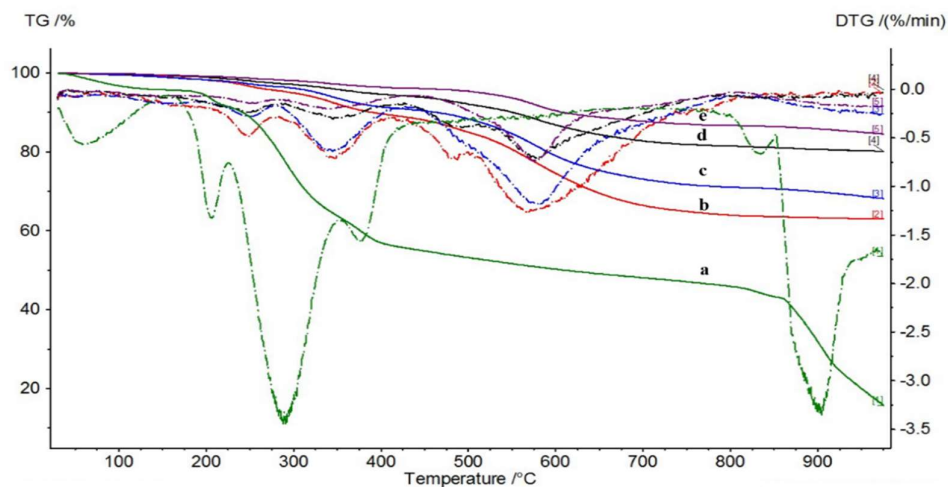


Figura 2.14. Termogramele pierderilor de masă (TG, linii continue) și derivatele pierderilor de masă (DTG, linii punctate) pentru: (a) lipaza nativă *Pseudomonas fluorescens* (verde); (b) SGE-1(PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1) (roșu); (c) Referința 1, matrice SG (albastru); (d) SGE-A (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1)+Celite 545 (negru); (e) Referința 2, matrice SG-A (roz).

Regiunea I a fost asociată cu pierderea apei și a unor molecule organice volatile, până la temperatura de 280°C.

Regiunea II, în intervalul 280-440°C, a fost asociată cu pierderea constituenților organici (C, H, O și N), volatili prezenți sau formați la începutul descompunerii organice, inclusiv prin descompunerea lipazei.

În regiunea III, pierderea de masă este asociată cu reacțiile de dehidroxilare și carbonizare ale compușilor organici [201]. La peste 800°C s-ar putea ca stabilitatea termică să fie atinsă sau materialul să fie complet dezintegrat.

Tabel 2.20. Comportamentul termic al biocatalizatorilor din *Pseudomonas fluorescens* obținuți prin entrapare în sol-gel.

| Silani precursori (raport molar) / Cod preparat | Pierdere de masă [%] | | | Masă reziduală [%] |
|---|----------------------|-----------|-----------|--------------------------|
| | 30-280°C | 280-440°C | 440-950°C | |
| Lipază nativă | 18,95 | 25,75 | 35,22 | 11,01 |
| Referință 1/matrice SGE Fără enzimă | 3,39 | 5,98 | 21,81 | 67,52 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS (1,6:0,4:1)/SGE-1 | 4,36 | 7,16 | 25,33 | 62,85 |
| Referință 2/matrice SGE-A Fără enzimă | 1,67 | 2,19 | 11,08 | 84,17 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS (1,6:0,4:1+Celite)/SGE-A | 2,52 | 3,41 | 13,68 | 80,07 |

În primul interval, pierdere de masă între 1,7-4,3 % s-a datorat evaporării apei și poate a unei cantități reduse de 2-propanol sau alți compuși volatili care rămân în preparat la finalul uscării. Așa cum era de așteptat, conținutul de apă al lipazei native a fost ridicat (pierdere de masă 19%), cu toate că enzima comercială este un material solid. Nu a fost surprinzător că preparatele care conțin lipază entrapată au o pierdere de masă cu aproximativ 1% mai mare decât matricea sol-gel fără lipază utilizată ca referință, întrucât lipaza a fost introdusă sub formă de soluție apoasă în amestecul de imobilizare și a rămas în stare hidratată la finalul procesului. Cantitatea mică de apă care este legată prin legături de hidrogen de resturile hidrofiele ale aminoacizilor din structura enzimei este esențială pentru a menține conformația centrului activ, chiar și în medii aproape anhidre [202].

Regiunea a doua și a treia sunt cele mai importante pentru profilele analizei termice ale preparatelor imobilizate. Așa cum se vede în Figura 2.14, descompunerea termică a părții organice a lipazei native este completă până la 440°C, indicând o pierdere de masă de 25,7%. Pentru comparație, s-a măsurat și conținutul de proteină folosind metoda Bradford, obținând 19% [w/w]. Diferența de 6,7% ar putea fi reprezentată de alți compuși organici adăugați ca și compuși de condiționare ai lipazei, care de asemenea pot fi descompuși până la 440°C. Prin urmare diferența de 1,2% dintre pierdere de masă a preparatelor imobilizate (SGE-1 PhTMOS:VTMOS:TMOS în raport molar 1,6:0,4:1) respectiv (SGE-A PhTMOS:VTMOS:TMOS în raport molar 1,6:0,4:1+Celite 545) și echivalentul materialului de referință în intervalul 280-440°C poate fi atribuită proteinei entrapate.

Curbele DTG arată că valoarea cea mai mare a vitezei de descompunere termică s-a deplasat spre temperaturi mai ridicate (pentru enzima nativă picul maxim a fost înregistrat la 290°C iar pentru preparatele imobilizate la 350°C), ceea ce indică o protecție mai bună împotriva creșterii temperaturii după imobilizare. Aceste concluzii au fost mai târziu confirmate prin conservarea activității lipazei la temperaturi înalte, demonstrată și de studiul stabilității termice.

Grupele funcționale organice legate covalent în structura matricii au fost descompuse aproape complet până la 750°C, dar potrivit termogramelor viteza pierderii de masă a avut două picuri. Primul pic, la aceeași temperatură de 350°C ca și în cazul descompunerii proteinei, a fost mai puțin intens (6% pierdere de masă pentru materialul de referință sol-gel și 2,2% pentru materialul sol-gel adsorbit pe Celite 545) și poate fi atribuit pierderii grupărilor funcționale localizate la suprafața particulei. Al doilea pic, la 570°C, a fost mai intens (reprezentând o pierdere de masă de 22% respectiv 11%), indicând descompunerea termică a grupărilor organice din interiorul porilor matricii de sol-gel.

Așa cum era de așteptat, atunci când s-a folosit metoda de imobilizare combinată masa totală pierdută a fost mai mică (aproximativ 20%) comparativ cu lipaza entrapată în sol-gel (aproximativ 37%). Această diferență este atribuită materialului anorganic Celite 545, care suferă doar o foarte slabă degradare termică chiar și la temperaturi mai mari de 800°C.

Curba pierderii de masă a lipazei native a fost complet diferită comparativ cu cea a biocatalizatorului imobilizat și cea mai mare surpriză a fost pierderea de masă, în jur de 900°C (așa cum arată picul din curba DTG), la fel și masa reziduală de 11%. Pierderea poate fi explicată de prezența unei cantități importante de aditiv anorganic (probabil o sare), care se descompune termic la temperaturi ridicate lăsând un reziduu de oxid.

2.3.5.2. Analiza termică a preparatelor imobilizate cu lipaza *Candida antarctica* B

Analiza termogravimetrică s-a folosit și pentru evaluarea stabilității termice și a degradării lipazei din *Candida antarctica* B imobilizate. În Figura 2.15 sunt prezentate imaginile TG înregistrate de la 30°C la 1000°C, cu o viteză de încălzire de 10°C min⁻¹, iar Tabelul 2.21 arată comportamentul termic al biocatalizatorilor.

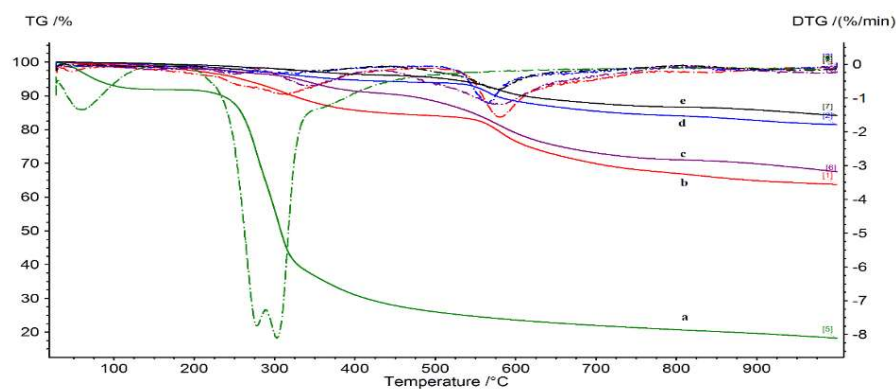


Figura 2.15. Termogramele (TG, linii continue) și derivatele acestora (DTG, linii punctate) obținute pentru: (a) lipaza din *Candida antarctica* B nativă (verde); (b) SGE-1 (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1) (roșu); (c) matricea SGE-1 (magenta); (d) SGE-A (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1 + Celite 545) (albastru); (e) matricea SGE-A (negru)

Tabel 2.21. Comportamentul termic al biocatalizatorilor din *Candida antarctica* B imobilizați prin tehnica sol-gel

| Silani precursori (raport molar) / Cod preparat | Pierdere de masă [%] | | | Masă reziduală [%] |
|---|----------------------|-----------|-----------|--------------------------|
| | 30-180°C | 180-400°C | 400-950°C | |
| Lipază nativă | 8,05 | 60,77 | 12,08 | 18,21 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS (1,6:0,4:1)/SGE-1 | 2,02 | 12,2 | 21,47 | 63,72 |
| Referință 1/matrice SGE-1 Fără enzimă | 1,43 | 7,11 | 22,63 | 67,52 |
| PhTMOS:VTMOS:TMOS (1,6:0,4:1)/SGE-A | 0,92 | 4,36 | 12,90 | 81,44 |
| Referință 2/matrice SGE-A Fără enzimă | 0,63 | 2,93 | 11,39 | 84,17 |

Curbele care indică pierderea de masă a preparatelor imobilizate prin sol-gel au fost împărțite în trei regiuni, la fel ca în cazul lipazei din *Pseudomonas fluorescens*:

În regiunea I în intervalul 30-180°C pierderea de masă a fost între 0,63-2,02% și s-a asociat cu pierderea apei și a unor particule organice mici. Așa cum era de așteptat, conținutul de apă al lipazei native a fost ridicat (aproximativ 8%).

Regiunea II în intervalul 180-400°C, a fost asociată cu descompunerea termică a părți organice (proteină), observându-se o pierdere semnificativă de masă de 60,77% pentru lipaza nativă, diferența dintre preparatul SGE-1 și matricea SGE-1 a fost de 5,09%, iar diferența dintre preparatele SGE-A și matricea SGE-A a fost de 1,43%.

În regiunea III în intervalul 400-950°C, pierderea de masă a fost asociată cu descompunerea termică finală a grupelor organice legate de matricea sol-gel.

Așa cum se vede în Figura 2.15, curbele TG ale lipazei native au fost complet diferite comparativ cu cele ale biocatalizatorilor imobilizați, având o pierdere totală de masa semnificativă, aproximativ 82%.

Când lipaza a fost imobilizată prin entrapare în sol-gel (SGE-1), pierderea de masă observată în intervalul de temperatură 400-950°C a fost de aproximativ 36%, în timp ce pentru lipaza imobilizată prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (SGE-A) pierderea de masă a fost mai redusă, aproximativ 19%. Diferența se datorește adsorbentului Celite, un material anorganic care are o stabilitate termică ridicată.

Studiul de stabilitate termică [195] demonstrează posibilitatea de menținere intactă a proprietăților catalitice ale enzimelor entrapate prin sol-gel pentru o perioadă mai lungă de timp.

2.3.6. Stabilitatea lipazelor imobilizate în solvenți organici

Activitatea enzimatică și enantioselectivitatea enzimelor sunt factori cruciali în procesele enzimatică și de asemenea le influențează potențialele aplicații [203]. Pe

de altă parte, eficiența unei enzime într-o reacție *in vitro* poate fi uneori influențată de stabilitatea operațională scăzută în solvenți organici. Pentru evaluarea stabilității în mediu de solvenți organici, cele trei lipaze microbiene studiate au fost imobilizate prin tehnica de entrapare în sol-gel (SGE-1) și entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite 545 (SGE-A), imobilizarea fiind realizată în toate cazurile folosind și un precursor cu grupări vinilice nehidrolizabile. Materialele obținute au fost supuse unei expuneri prelungite în solvenți organici cu polarități diferite, pentru a evalua potențialul acestora ca biocatalizatori industriali.

Activitatea de transesterificare a lipazelor imobilizate supuse studiului de stabilitate în solvenți organici a fost testată inițial în reacția de transesterificare a 2-hexanolului cu acetat de vinil în mediu de *n*-hexan, comparativ cu enzima nativă (Tabelul 2.22). Așa cum era de așteptat, activitățile preparatelor enzimatiche au fost mai mici comparativ cu enzima nativă. Cea mai mare valoare s-a înregistrat în cazul lipazei Cal B, de 36% raportată la activitatea lipazei native, o activitate excelentă luând în considerare că enzima reprezintă mai puțin de 5% din masa totală a materialului rezultat în urma procesului de imobilizare.

Tabel 2.22. Activitățile inițiale de transesterificare ale lipazelor imobilizate prin entrapare în sol-gel (SGE-1) și entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (SGE-A), determinate pentru reacția de acilare a 2-hexanolului cu acetat de vinil în *n*-hexan la 40°C, timp de 24h.

| Lipaze | Metoda de imobilizare | Conv. [%] | A _{trans} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$] | e.ep. [%] | E |
|--------|--|-----------|---|-----------|-----|
| AK | nativă | 40 | 1,536 | 70 | 9 |
| | SGE-1 (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1) | 21 | 0,130 | 90 | 24 |
| | SGE-A (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1) | 26 | 0,149 | 88 | 21 |
| PS | nativă | 44 | 1,334 | 78 | 15 |
| | SGE-1 (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1) | 45 | 0,330 | 82 | 21 |
| | SGE-A (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1) | 37 | 0,248 | 86 | 22 |
| Cal B | nativă | 31 | 1,044 | 98 | 152 |
| | SGE-1 (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1) | 50 | 0,378 | 98 | 458 |
| | SGE-A (PhTMOS:VTMOS:TMOS=1,6:0,4:1) | 50 | 0,364 | 98 | 458 |

Pentru a stabili efectul solvenților organici asupra lipazelor imobilizate, a fost calculată activitatea relativă ca raportul activității de transesterificare a biocatalizatorului după incubare pentru diferite intervale de timp într-un solvent organic și activitatea de transesterificare fără incubare în solventul organic respectiv.

Șapte solvenți organici cu polarități diferite au fost selectați pentru acest studiu, în funcție de posibilitatea utilizării acestora ca și mediu de reacție pentru reacții catalizate de lipaze.

Pentru biocatalizatorii obținuți cu lipaza Amano AK prin entrapare în sol-gel (SGE-1, Figura 2.16), cele mai mari valori ale activității relative au fost obținute după șapte zile de expunere în acetonitril iar cea mai mică valoare a fost obținută în toluen.

În cazul preparatelor enzimactice obținute cu lipază Amano AK prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (SGE-A) cele mai mici valori ale activității relative au fost obținute în acetoneitril, iar cele mai mari în terț-butanol.

Activitatea relativă nu poate fi corelată cu polaritatea solvenților folosiți în studiul de stabilitate. În general solvenții polari protici au tendința de a desolvata apa din jurul centrului activ al enzimei, reducându-i activitatea catalitică. De asemenea, în anumite cazuri solvenții organici pot interacționa cu matricea prin formarea legăturilor de hidrogen și interacțiuni dipolare, care atenuază activitatea lipazelor [204]. Stabilitatea pe termen lung în solvenții organici trebuie însă considerată un caz diferit, deoarece nu cauzează degradarea ireversibilă a enzimei iar cantitatea de apă necesară poate fi furnizată de alte componente ale sistemului de reacție.

Trebuie menționat că preparatele imobilizate cu Amano AK au avut activități relative mai mari de 1 în urma incubării în solvenți organici (de până la 1.4 în acetoneitril pentru preparatele obținute prin metoda SGE-1), demonstrând prin urmare chiar efect de activare. Explicația posibilă este că în urma entrapării în matrice de sol-gel cantitatea de apă rămasă în matrice după procesul de uscare poate varia. Dacă solvenții organici elimină apa în exces, activitatea poate crește.

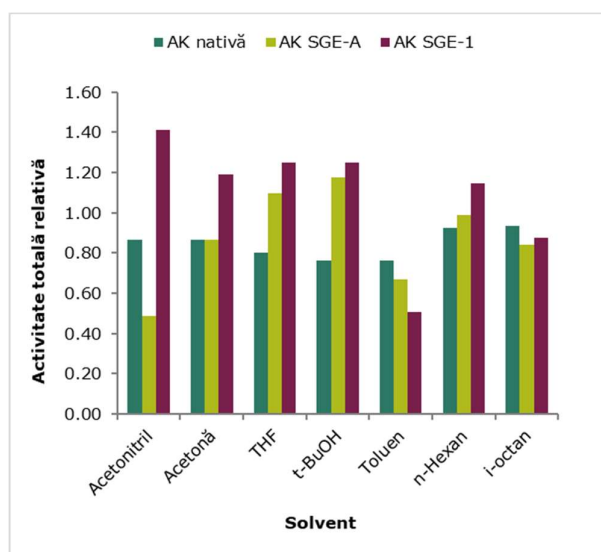


Figura 2.16. Influența solvenților organici (incubare 7 zile la 25°C) asupra activității totale relative a lipazei Amano AK native și imobilizate prin metoda sol-gel (SGE-1), respectiv sol-gel combinată cu adsorbție (SGE-A), testate în reacția de acilare a 2-hexanolului cu acetat de vinil în *n*-hexan la 40°C, după 24 h de reacție.

Spre deosebire de preparatele obținute din lipază Amano AK, pentru cele din Amano PS rezultatele obținute pentru activitatea de transesterificare au fost mai bune dacă s-a folosit imobilizarea prin metoda combinată (SGE-A), comparativ cu metoda de entrapare în sol-gel (SGE-1, Figura 2.17). Pentru ambele metode de imobilizare cel mai bun rezultat a fost obținut prin incubare în tetrahidrofuran, unde s-a înregistrat o creștere a activității cu 20-40%.

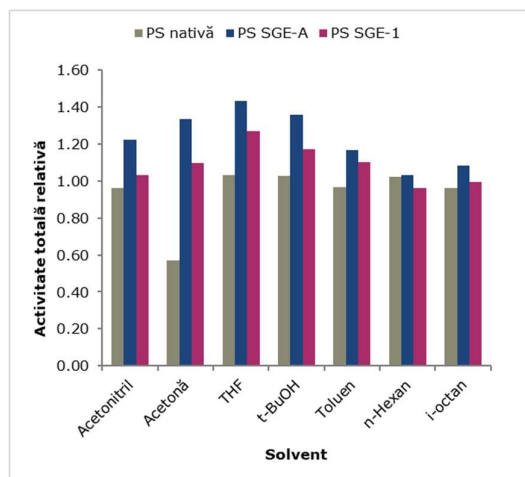


Figura 2.17. Influența solvenților organici (incubare 7 zile la 25° C) asupra activității totale relative a lipazei native și immobilizate Amano PS immobilizate prin sol-gel (SGE-1) și sol-gel combinată cu adsorbție (SGE-A), evaluate în reacția de acilare a 2-hexanolului cu acetat de vinil în *n*-hexan la 40°C, după 24 h de reacție.

În cazul preparatelor obținute cu lipază Cal B (Figura 2.18), preincubate în solvenți organici, valorile activității relative au scăzut comparativ cu activitățile inițiale (dar nu sub 90%), indiferent de natura solvenților testați.

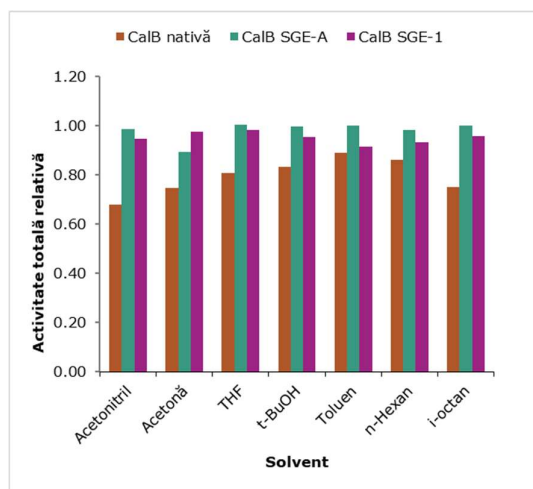


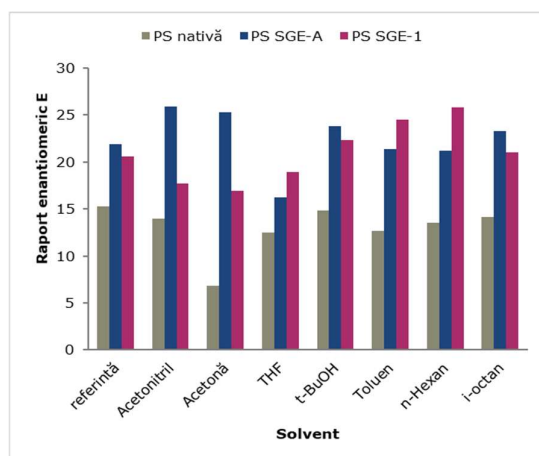
Figura 2.18. Influența solvenților (incubare 7 zile la 25° C) asupra activității totale relative a lipazei native și immobilizate Cal B immobilizate prin sol-gel (SGE-1) și sol-gel combinată cu adsorbție (SGE-A), evaluate în reacția de acilare a 2-hexanolului cu acetat de vinil în *n*-hexan la 40°C, după 24 h de reacție.

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

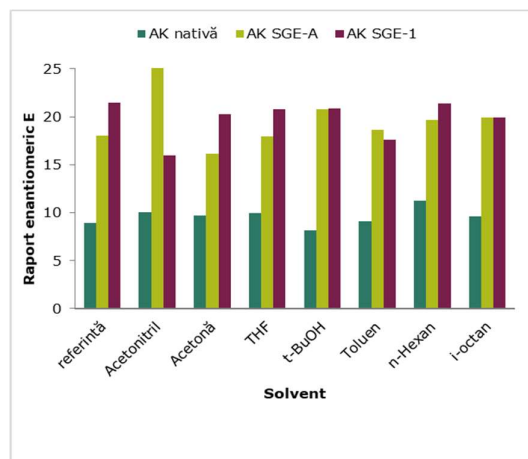
Enantioselectivitatea este un alt parametru important pentru aplicațiile practice ale biocatalizei. În solvenți organici enantioselectivitatea este influențată de conținutul de apă, de temperatură și de natura solventului [205]. Enantioselectivitatea reacțiilor studiate a fost exprimată folosind raportul enantiomeric (E) considerat ca fiind cel mai bun parametru pentru a caracteriza rezoluția cinetică, deoarece se bazează pe excesul enantiomeric ca o funcție extinsă a conversiei [206].

Preparatele enzimatiche obținute au avut valori ridicate și constante ale raportului enantiomeric în toți solvenții testați, comparativ cu enzima nativă. Valorile E obținute au fost de două ori mai mari pentru preparatele cu Amano AK și Amano PS sau chiar de 5 ori mai mari pentru preparatele cu Cal B, comparativ cu enzima nativă (Figurile 2.19a-c).

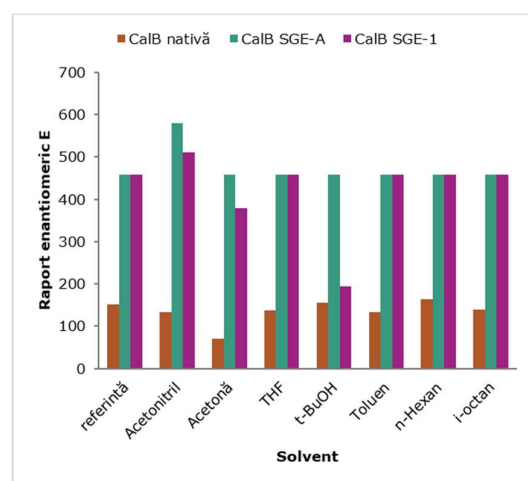
Pentru toate lipazele imobilizate prin metoda sol-gel combinată cu adsorbție (SGE-A) cele mai ridicate valori ale raportului enantiomeric (E) au fost obținute după incubarea în acetoneitril, un solvent polar aprotic ($\log P$ 0,25) în timp ce pentru preparatele imobilizate prin metoda sol-gel cele mai bune valori au fost obținute într-un solvent nepolar, *n*-hexan ($\log P$ 4,0), excepție făcând preparatele cu Cal B unde cele mai mari valori ale lui E au fost obținute în acetoneitril. Aceste rezultate sunt corelate cu rezultatele raportate de Herbst și colab., care au demonstrat că excesul enantiomeric poate scădea cu scăderea hidrofilicității [205]. Acest efect se poate datora extracției moleculelor de apă de la suprafața enzimelor. Enzima devine mai rigidă, discriminarea între cei doi enantiomeri este mai bună, ducând la creșterea enantioselectivității. În contrast cu cele prezentate mai sus, unele studii arată o creștere a excesului enantiomeric cu scăderea hidrofilicității solvenților [205].



a)



b)



c)

Figura 2.19. Influența solvenților (incubare 7 zile la 25° C) asupra enantioselectivității lipazei native și immobilizate (a) Amano PS, (b) Amano AK și (c) Cal B immobilizate prin sol-gel (SGE-1) și sol-gel combinată cu adsorbție (SGE-A), testate în reacția de acilare a 2-hexanolului cu acetat de vinil în *n*-hexan la 40°C, după 24 h de reacție.

Studiile din acest subcapitol arată că inclusiv contactul dintre enzimă și solvent poate determina creșterea enantioselectivității, rezultând probabil o conformație sterică a enzimei care favorizează reacția catalizată. Cele prezentate mai sus explică faptul că enantioselectivitatea poate fi îmbunătățită prin incubare într-un anumit solvent, chiar dacă acel solvent nu este potrivit ca mediu pentru reacția ce urmează să fie efectuată.

2.3.6.1. Efectul solvenților organici asupra morfologiei biocatalizatorilor imobilizați prin metoda sol-gel

Pentru a examina efectul solvenților testați asupra morfologiei matricilor sol-gel ale preparatelor imobilizate, au fost realizate imagini SEM înainte și după incubarea acestora în solvenții organici. Informațiile obținute despre morfologia matricii sol-gel pot fi corelate cu eficiența catalitică în reacția de acilare. În Figura 2.20 și Figura 2.21 sunt prezentate imaginile SEM la diferite rezoluții a preparatelor înainte de incubare și după incubare timp de șapte zile în THF. Preparatele au fost obținute prin metoda SGE-1, folosind un sistem ternar de silani precursori PhTMOs, VTMOs și TMOS, la un raport molar 1,6:0,4:1.

Imaginile SEM ale preparatelor obținute prin metoda SGE-1 înainte de incubare (Figura 2.20a și 2.20b) au arătat particule de diferite dimensiuni și o morfologie sub formă de blocuri cu înveliș extern fin. În secțiune transversală (Figura 2.20b) particulele sunt formate din granule sferice fine și neregulate aglomerate, prezentând și un anumit grad de porozitate.

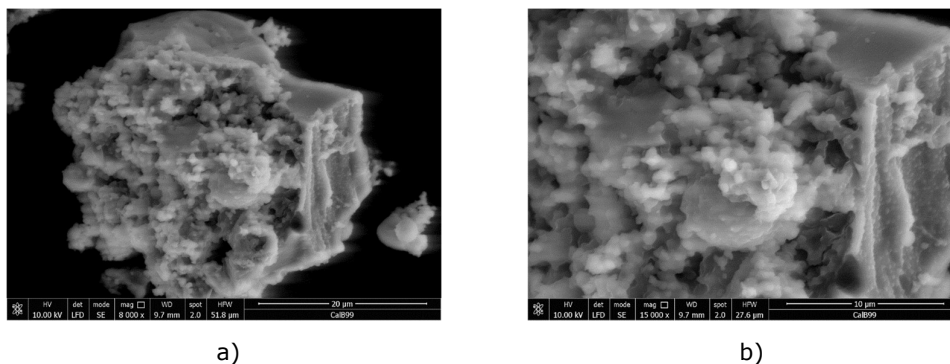


Figura 2.20. Micrografii SEM a lipazei din *Candida antarctica* B imobilizată prin entrapare în sol-gel, înainte de incubarea în solvenți organici, realizate la două rezoluții: 8000 x (a) și 15000 x (b)

În cazul preparatelor analizate după incubare (Figura 2.21) în imaginile SEM se observă particule neregulate de diferite dimensiuni. În comparație cu imaginile SEM ale biocatalizatorilor obținute înaintea incubării în THF se poate observa o deteriorare a suprafeței externe a biocatalizatorilor, ceea ce poate fi pus pe seama expunerii în THF. Granulele sferice nu sunt prezente, dar la rezoluție mai mare (Figura 2.21b) se pot observa granule mici și neregulate care sunt aglomerate într-un material poros. Conform imaginilor SEM, se pare că expunerea la solvent a distrus morfologia inițială a matricii anorganice. Cu toate acestea, după incubarea în solvenții organici preparatele au prezentat doar o modificare nesemnificativă a activității de transesterificare și a enantioselectivității în reacția de acilare a 2-hexanolului. Prin urmare, degradarea suprafeței biocatalizatorului imobilizat nu afectează decât în mică măsură activitatea enzimei entrapate.

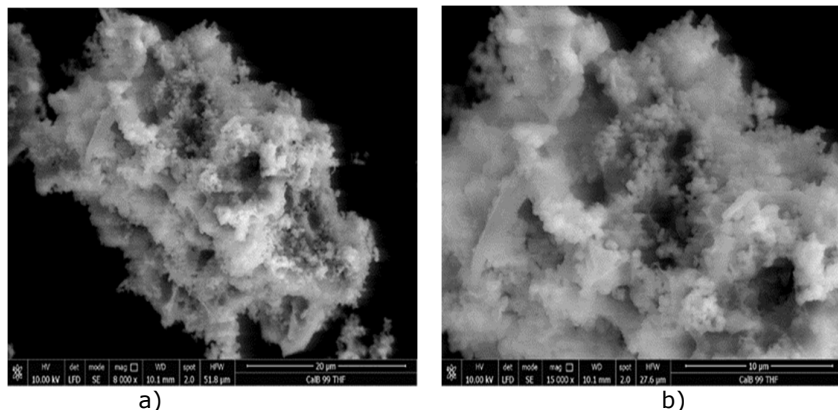


Figura 2.21. Micrografii SEM a lipazei din *Candida antarctica* B imobilizate prin entrapare în sol-gel, după incubarea în THF timp de 7 zile, realizate la două rezoluții: 8000 x (a) și 15000 x (b)

2.3.7. Influența imobilizării prin tehnici de sol-gel asupra termostabilității lipazelor

Datorită importanței utilizării unor enzime cât mai termostabile în diferite aplicații, stabilitatea la temperatură fiind o proprietate importantă la nivel industrial, s-a studiat influența temperaturii asupra activității catalitice și enantioselectivității lipazelor native și imobilizate prin tehnica sol-gel. Lipazele din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK), *Burkholderia cepacia* (Amano PS) și *Candida antarctica* B (Cal B) au fost imobilizate prin entrapare în sol-gel (SGE-1) și entrapare combinată cu adsorbție pe Celite 545 (SGE-A), folosind sisteme ternare de silani precursori fenil-trimetoxisilan/viniltrimetoxisilan/tetrametoxisilan (PhTMOS:VTMOS:TMOS) la un raport molar 1,6:0,4:1, iar lichidul ionic tetrafluoroborat de 1-octil-3-metilimidazoliu (OmimBF₄) a fost folosit și în aceste cazuri ca aditiv [195].

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

Rezultatele sunt prezentate în Tabelele 2.23, 2.24 și 2.25 și Figurile 2.22, 2.23 și 2.24.

Tabelul 2.23. Influența preincubării la diferite temperaturi asupra activității lipazei din *Pseudomonas fluorescens* (Amano Ak), native și immobilizate prin tehnica sol-gel

| A_{trans} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]/substrat/biocatalizator | | | | | | | | | |
|--|------------------|-------|-------|-------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|
| [°C] | 2-hexanol | | | 2-heptanol | | | 2-octanol | | |
| | nativă | SGE-A | SGE-1 | nativă | SGE-A | SGE-1 | nativă | SGE-A | SGE-1 |
| 40 | 1,340 | 0,149 | 0,130 | 1,344 | 0,187 | 0,212 | 1,920 | 0,284 | 0,327 |
| 50 | 1,190 | 0,164 | 0,111 | 1,348 | 0,172 | 0,202 | 1,699 | 0,281 | 0,329 |
| 60 | 1,058 | 0,150 | 0,105 | 1,329 | 0,171 | 0,199 | 1,870 | 0,285 | 0,342 |
| 70 | 1,455 | 0,151 | 0,118 | 0,974 | 0,198 | 0,218 | 1,858 | 0,324 | 0,322 |

Tabelul 2.24. Influența preincubării la diferite temperaturi asupra activității lipazei din *Burkholderia cepacia* (Amano PS), native și immobilizate prin tehnica sol-gel

| A_{trans} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]/substrat/biocatalizator | | | | | | | | | |
|--|------------------|-------|-------|-------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|
| [°C] | 2-hexanol | | | 2-heptanol | | | 2-octanol | | |
| | nativă | SGE-A | SGE-1 | nativă | SGE-A | SGE-1 | nativă | SGE-A | SGE-1 |
| 40 | 1,761 | 0,191 | 0,301 | 0,444 | 0,207 | 0,342 | 0,678 | 0,333 | 0,467 |
| 50 | 1,753 | 0,208 | 0,296 | 0,462 | 0,151 | 0,338 | 0,721 | 0,335 | 0,498 |
| 60 | 1,710 | 0,195 | 0,300 | 0,430 | 0,209 | 0,322 | 0,825 | 0,325 | 0,467 |
| 70 | 1,854 | 0,203 | 0,280 | 0,418 | 0,206 | 0,358 | 0,732 | 0,332 | 0,455 |

Tabelul 2.25. Influența preincubării la diferite temperaturi asupra activității lipazei din *Candida antarctica* B (Cal B), native și immobilizate prin tehnica sol-gel

| A_{trans} [$\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]/substrat/biocatalizator | | | | | | | | | |
|--|------------------|-------|-------|-------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|
| [°C] | 2-hexanol | | | 2-heptanol | | | 2-octanol | | |
| | nativă | SGE-A | SGE-1 | nativă | SGE-A | SGE-1 | nativă | SGE-A | SGE-1 |
| 40 | 0,762 | 0,358 | 0,357 | 0,587 | 0,341 | 0,355 | 0,612 | 0,390 | 0,391 |
| 50 | 0,895 | 0,346 | 0,355 | 0,590 | 0,373 | 0,366 | 0,667 | 0,408 | 0,394 |
| 60 | 0,836 | 0,354 | 0,336 | 0,486 | 0,362 | 0,379 | 0,668 | 0,391 | 0,397 |
| 70 | 0,801 | 0,345 | 0,359 | 0,515 | 0,390 | 0,365 | 0,632 | 0,308 | 0,380 |

Așa cum era de așteptat, după imobilizare valorile activităților au fost mai mici comparativ cu enzima nativă, iar în ce privește termostabilitatea atât enzima nativă cât și cele imobilizate au arătat o stabilitate termică remarcabilă în intervalul de temperatură studiat.

Micile variații ale valorii activității se pot datora distribuției diferite a enzimei în matricea de sol-gel. Ca valoare absolută, preparatele enzimatic obținute cu lipaza Cal B au avut cele mai mari valori ale activității (în toate cazurile valorile de activitate fiind mai mari de $0.33 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$), cu excepția substratului 2-octanol la care cele mai bune rezultate s-au obținut folosind biocatalizatori cu Amano PS (SGE-1).

Enantioselectivitatea este un alt parametru important pentru aplicațiile practice ale biocatalizatorilor enzimatici. Valorile raportului enantiomeric E au fost mai mari pentru preparatele enzimatic comparativ cu lipazele native, fără a depinde semnificativ de tehnica de imobilizare utilizată (Figurile 2.22, 2.23 și 2.24).

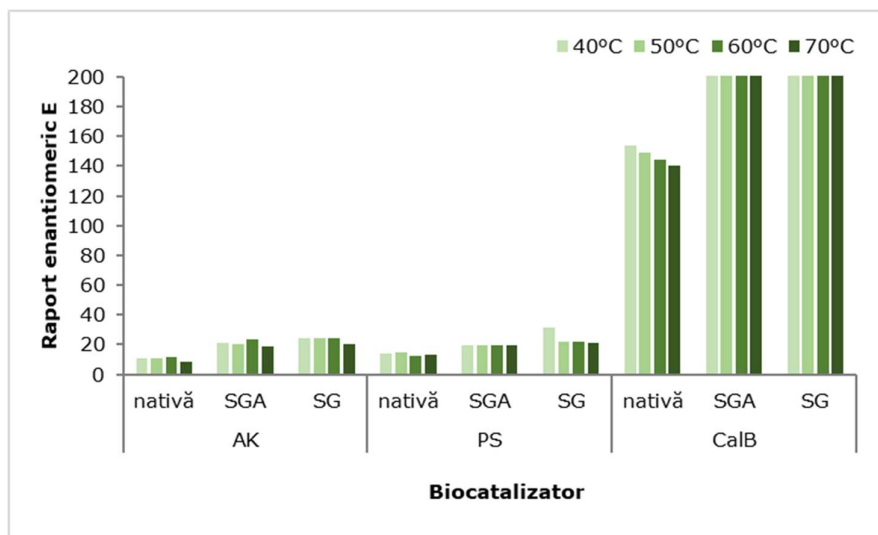


Figura 2.22. Influența temperaturii asupra enantioselectivității lipazelor native și imobilizate prin entrapare în sol-gel (SGE-1) și entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (SGE-A), în reacția de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului cu acetat de vinil, în *n*-hexan la 40°C. Biocatalizatorii au fost preincubați 24 de ore în *n*-hexan, la temperaturi cuprinse între 40 și 70°C.

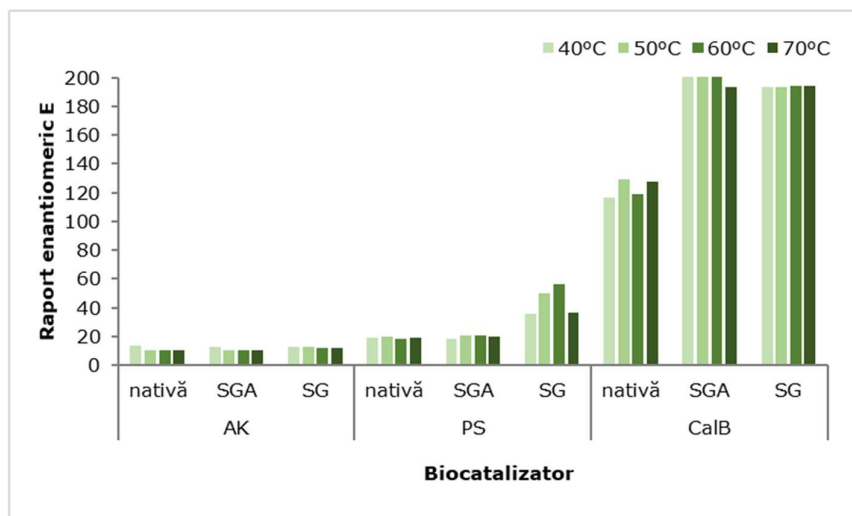


Figura 2.23. Influența temperaturii asupra enantioselectivității lipazelor native și immobilizate prin entrapare în sol-gel (SGE-1) și entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (SGE-A), în reacția de acilare enantioselectivă a 2-heptanolului cu acetat de vinil, în *n*-hexan la 40°C. Biocatalizatorii au fost preincubați 24 de ore în *n*-hexan, la temperaturi cuprinse între 40 și 70°C.

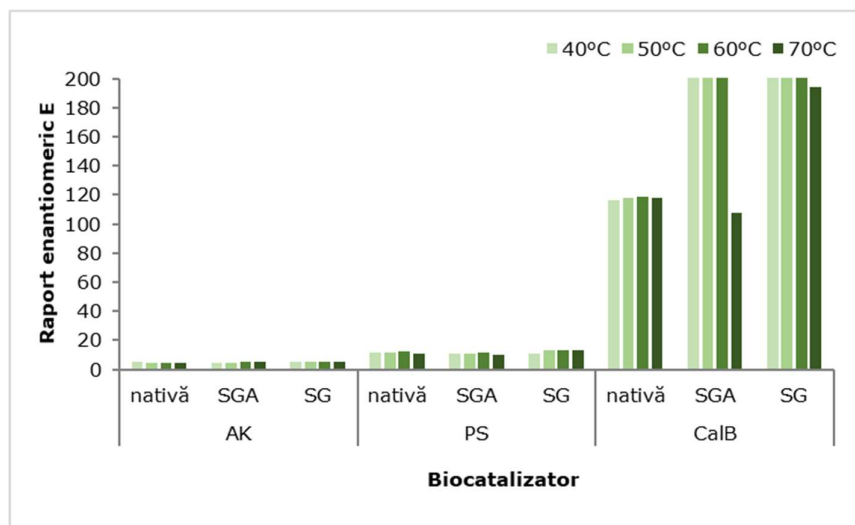


Figura 2.24. Influența temperaturii asupra enantioselectivității lipazelor native și immobilizate prin entrapare în sol-gel (SGE-1) și entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (SGE-A), în reacția de acilare enantioselectivă a 2-octanolului cu acetat de vinil, în *n*-hexan la 40°C. Biocatalizatorii au fost preincubați 24 de ore în *n*-hexan, la temperaturi cuprinse între 40 și 70°C.

Cele mai mari valori ale raportului raportului enantiomeric au fost obținute pentru biocatalizatorii cu Cal B ($E > 180$) pentru toate substraturile testate, pe tot intervalul de temperatură.

În ceea ce privește tehnica de imobilizare, pentru ambele metode (sol-gel simplu și sol-gel combinat cu adsorbție) s-au obținut valori similare ale activității și enantioselectivității, exceptând preparatele obținute cu Amano PS imobilizate unde prin entraparea în sol-gel au rezultat valori mai mari.

Folosind ca substrat 2-octanol s-au obținut valori mai mari ale activității și enantioselectivității comparativ cu celelalte două substraturi, pentru toate preparatele studiate indicând o creștere a specificității de substrat pentru structurile cu lanțuri hidrocarbonate mai lungi.

2.3.7.1. Studiul stabilității termice a lipazei imobilizate din *Candida antarctica* B la 80°C

Deoarece preparatele enzimatic obținute cu lipază din *Candida antarctica* B (Cal B) au prezentat cele mai bune rezultate ale stabilității termice pentru domeniul de temperatură investigat, s-a continuat studiul precedent prin preincubarea acestor preparate la o temperatură mai ridicată (80°C) în izooctan, timp de până la 120 h.

Stabilitatea termică s-a determinat prin măsurarea activităților preparatelor preincubate la intervale de 24 h, folosind ca reacție model acilarea 2-hexanolului cu acetat de vinil, la temperatura de 40°C în *n*-hexan. Referința a fost și în acest caz enzima nativă. Efectul temperaturii asupra proprietăților catalitice este reprezentat în Figurile 2.25 și 2.26.

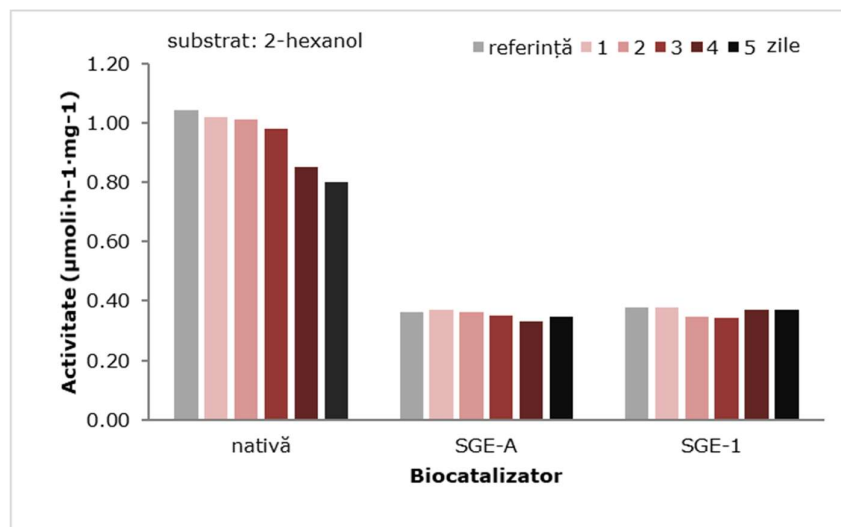


Figura 2.25. Influența preincubării la temperatura de 80°C în izooctan timp de 5 zile asupra activității catalitice a enzimei *Candida antarctica* B (Cal B) native și imobilizate prin entrapare în sol-gel (SGE-1) și prin metoda combinată (SGE-A), în reacția de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului la 40°C.

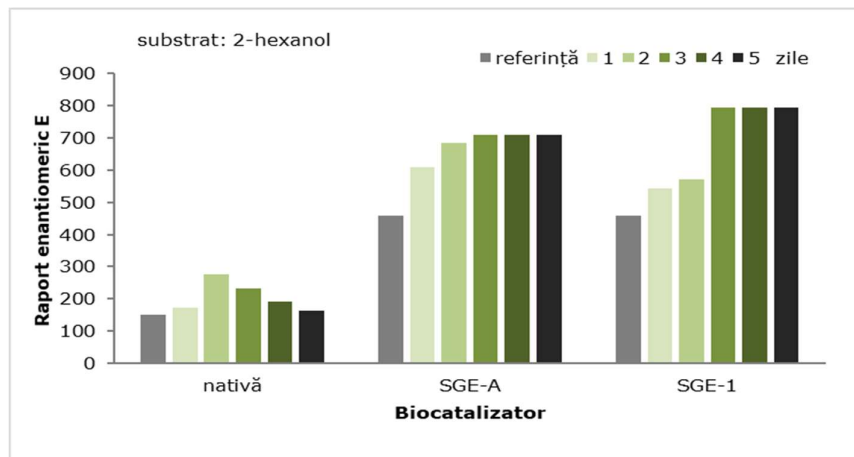


Figura 2.26. Influența preincubării la temperatura de 80°C în izooctan timp de 5 zile asupra enantioselectivității enzimei *Candida antarctica* B (Cal B) native și imobilizate prin entrapare în sol-gel (SGE-1) și prin metoda combinată (SGE-A), în reacția de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului la 40°.

Chiar și atunci când biocatalizatorii au fost incubăți timp de 5 zile la 80°C pentru preparatele obținute cu lipaza imobilizată Cal B valorile activității catalitice au rămas neschimbate, în timp ce activitatea lipazei native a avut un declin pronunțat, scăzând la mai puțin de 25% din activitatea inițială (Figura 2.25). În cazul enantioselectivității, valorile obținute pentru biocatalizatorii imobilizați au rămas practic neschimbate și foarte ridicate pe toată perioada de incubare (creșterile la valori $E > 200$ nu mai pot fi luate drept semnificative) (Figura 2.26).

2.3.8. Studiul stabilității operaționale a biocatalizatorilor în sistem discontinuu

Din cauza costului lor relativ ridicat și a cerințelor specifice proceselor de producție, utilizarea enzimelor la nivel industrial este încă limitată. Din acest motiv, posibilitatea utilizării enzimelor imobilizate în cicluri repetate de reacție este un foarte important avantaj al acestora [204]. În general, o enzimă poate fi reutilizată până când activitatea sa scade la mai puțin de 25 % din valoarea inițială [150].

Stabilitatea lipazelor Amano AK, Amano PS și Cal B imobilizate prin entrapare în sol-gel și entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție, folosind un sistem ternar de silani precursori PhTMO:VTMO:TMOS la un raport molar 1,6:0,4:1, a fost testată prin reutilizare în reacția de acilare a 2-hexanolului cu acetat de vinil în *n*-hexan, la 40°C [199, 207]. Rezultatele sunt prezentate în Figurile 2.27, 2.28 și 2.29.

Biocatalizatorii obținuți cu Amano AK au avut o stabilitate mai ridicată în comparație cu enzima nativă, care a arătat o scădere vizibilă după primele 5 cicluri de reutilizare. Comparând cele două variante de imobilizare, se observă că cele mai ridicate valori ale activității relative de transesterificare s-au obținut pentru preparatul obținut prin metoda de entrapare în sol-gel (Figura 2.27).

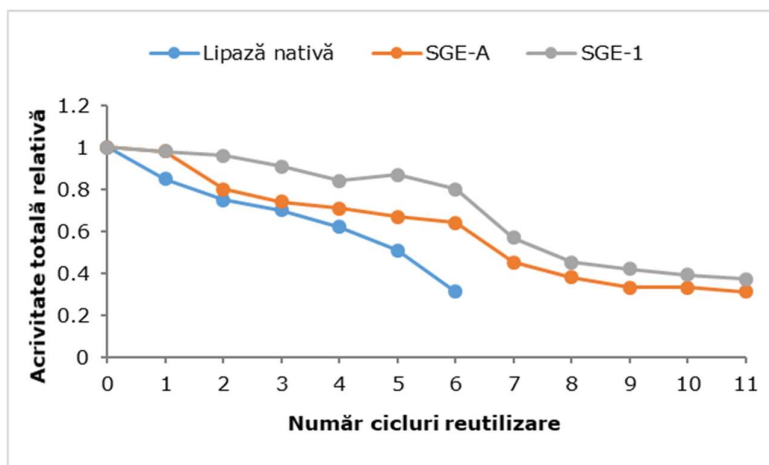


Figura 2.27. Influența reutilizării enzimei native și imobilizate din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) asupra activității relative în acilarea 2-hexanolului la 40°C în *n*-hexan (lipază nativă, SGE-A–entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție și SGE-1–entrapare în sol-gel)

În cazul lipazei Amano PS imobilizate prin metoda sol-gel, reutilizarea a avut drept rezultat o reducere însemnată a activității, astfel că activitatea a scăzut după numai două reutilizări la mai puțin de 50% din valoarea inițială, iar după 7 cicluri la mai puțin de 20%. În cazul enzimei native stabilitatea operațională a fost mult mai bună. Aceasta și-a menținut activitatea aproape neschimbată până la ciclul 5 de reutilizare, după care a scăzut până la 50% din valoarea inițială (Figura 2.28).

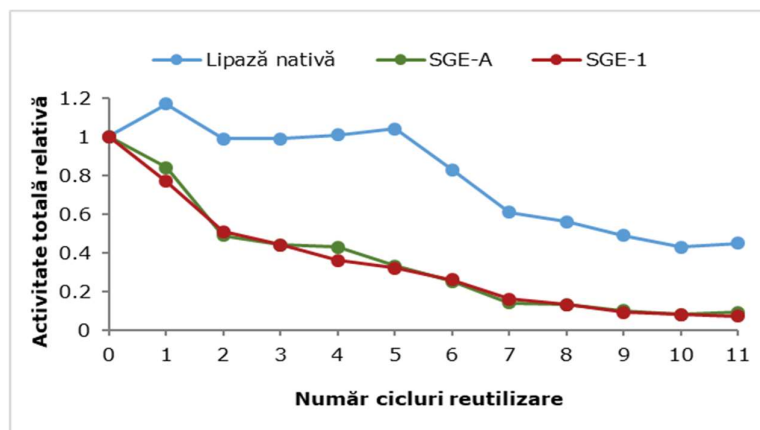


Figura 2.28. Influența reutilizării enzimei native și imobilizate din *Burkholderia cepacia* (Amano PS) asupra activității relative în acilarea 2-hexanolului la 40°C în *n*-hexan (lipază nativă, SGE-A–entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție și SGE-1 entrapare în sol-gel)

Activitatea relativă a lipazei native Cal B după 6 cicluri de reutilizare a scăzut semnificativ, până la 27% din valoarea inițială. Preparatele imobilizate și-au dovedit superioritatea, după 14 cicluri de reacție peste 80% din activitate fiind regăsită. Între cele două tipuri de preparate nu se observă diferențe semnificative, dar ținând cont de faptul că preparatul obținut prin entrapare în sol-gel cu adsorbție are un conținut de lipază mai scăzut se poate considera că acesta are eficiență mai ridicată, la aceeași stabilitate operațională (Figura 2.29).

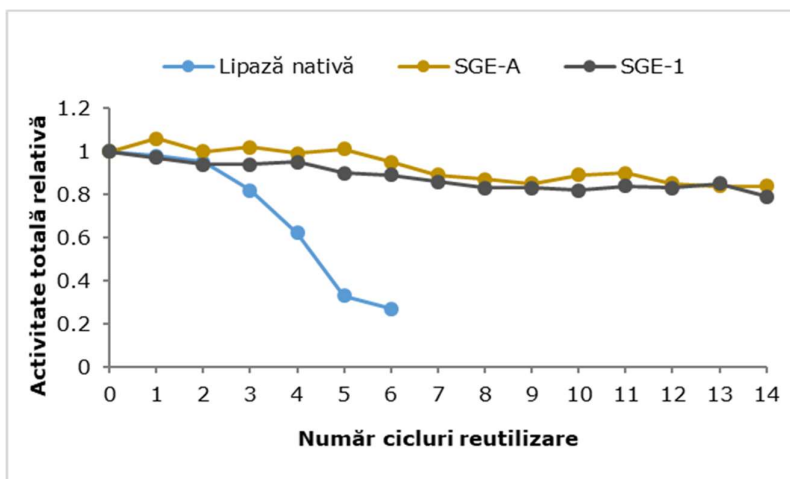


Figura 2.29. Influența reutilizării enzimei native și imobilizate din *Candida antarctica* B asupra activității relative în acilarea 2-hexanolului la 40°C în *n*-hexan (lipază nativă, SGE-A-entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție și SGE-1-entrapare în sol-gel)

2.3.9. Concluzii

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

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

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

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

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

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

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

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

Stabilitatea lipazelor după imobilizare a fost excelentă în toți solvenții organici testați, astfel acești biocatalizatori pot fi utilizați în medii de diferite polarități, în funcție de cerințele sistemului de reacție.

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

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

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

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

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

2.4. Rezoluția cinetică enzimatică a unor substraturi racemice în sistem continuu

În plus față de imobilizare, ingineria de proces poate oferi mijloace suplimentare de îmbunătățire a eficacității biotransformărilor, reducând impactul costurilor de catalizator asupra produsului. Una dintre modalitățile cele mai eficiente de a interveni în ingineria procesului în sensul creșterii productivității și duratei de funcționare a biocatalizatorului este utilizarea unui regim de exploatare continuu [208]. Reactoarele utilizate sunt de mai multe tipuri, dar în cele mai multe cazuri se preferă configurația de tip coloană cu strat fix de catalizator (PBR), în care biocatalizatorul imobilizat este încărcat în reactor, iar soluția de substrat este pompată cu un debit stabil.

Pe lângă faptul că este caracterizată o acțiune catalitică mai rapidă și mai mare comparativ cu reactoarele în sistem discontinuu, cât și de o stabilitate operațională îndelungată, această configurație reduce costul procesului [209, 210].

S-a utilizat protocolul de imobilizare care a fost optimizat anterior în laboratorul nostru și a fost testat în reacții în sistem discontinuu, iar ulterior și în reactoare de tip continuu cu strat fix (PBR).

Pentru a optimiza parametrii care au efect asupra rezoluției cinetice în sistem continuu, au fost alese două substraturi model, 2-octanol (*rac-1*) și 1-feniletanol (*rac-2*), doi alcooli secundari (unul alifatic și unul aromatic). Schema generală este prezentată în Figura 2.30.

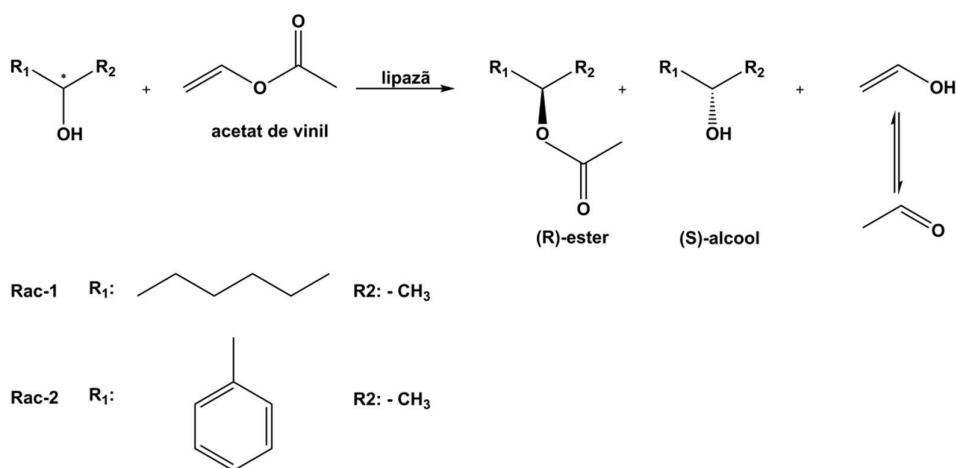


Figura 2.30. Rezoluția cinetică enzimatică a 2-octanolului (*rac-1*) și a 1-feniletanolului (*rac-2*) catalizată de lipaze. Enantioselectivitatea lipazei utilizate față de enantiomerul-(*R*) al substraturilor studiate este în concordanță cu datele din literatură [211, 212]

2.4.1. Optimizarea rezoluției cinetice enzimatică în sistem continuu a 2-octanolului și a 1-feniletanolului folosind programul experimental factorial

Selecția lipazei imobilizate prin sol-gel s-a bazat pe studiile din subcapitolul 2.2, atât în ceea ce privește optimizarea matricei sol-gel cât și caracterizarea detaliată a stabilității termice și reutilizarea biocatalizatorilor imobilizați în sistem discontinuu.

Astfel, lipaza din Cal B entrapată în matricea obținută din silanii precursori PhTMOS:VTMOS:TMOS la un raport molar 1,6:0,4:1, a demonstrat o activitate de $1,32 \text{ mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ și un exces enantiomeric $>95\%$ pentru rezoluția cinetică a *rac-1*, cât și o stabilitate termică excelentă în *n*-hexan la temperaturi de până la 70°C [195,192]. Aceeași lipază imobilizată a fost utilizată și pentru substratul aromatic *rac-2*.

2.4.2. Rezoluția cinetică a 2-octanolului în sistem continuu (Program experimental factorial 1)

Reacția de acilare a *rac*-1 cu acetat de vinil a fost investigată în *n*-hexan la 40°C, în sistem continuu, folosind un reactor cu strat fix (PBR) în care s-a introdus lipază Cal B imobilizată în sol-gel. Optimizarea parametrilor ce influențează reacția de acilare s-a realizat printr-un program experimental factorial, utilizând metoda Box-Behnken. Programele experimentale factoriale sunt instrumente utile în ceea ce privește optimizarea reacțiilor datorită eficacității mărite, numărului mai scăzut de experimente și oferă mai multe informații valoroase comparativ cu metodele tradiționale pentru stabilirea parametrilor optimi rând pe rând [213].

Tabel 2.26. Valorile variabilelor independente și valorile determinate experimental ale variabilelor de răspuns pentru rezoluția cinetică a 2-octanolului, *rac*-1 (Program experimental factorial 1).

| Nr. crt. | Debit [mL min ⁻¹] | Concentrația substratului [M] | Temperatură [°C] | e.e _p [%] | E | Productivitate [μmol min ⁻¹ g ⁻¹] |
|----------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|----------------------|-----|--|
| 1 | 0,100 | 0,050 | 50 | 54,0 | 17 | 2,910 |
| 2 | 0,500 | 0,050 | 50 | 80,0 | 23 | 11,360 |
| 3 | 0,100 | 0,500 | 50 | 84,0 | 56 | 24,120 |
| 4 | 0,500 | 0,500 | 50 | 98,0 | 268 | 103,470 |
| 5 | 0,100 | 0,275 | 40 | 96,0 | 176 | 11,950 |
| 6 | 0,500 | 0,275 | 40 | 98,0 | 232 | 54,060 |
| 7 | 0,100 | 0,275 | 60 | 48,0 | 6 | 16,720 |
| 8 | 0,500 | 0,275 | 60 | 48,0 | 8 | 78,270 |
| 9 | 0,100 | 0,275 | 50 | 54,0 | 4 | 3,010 |
| 10 | 0,500 | 0,275 | 50 | 94,0 | 121 | 61,170 |
| 11 | 0,100 | 0,275 | 50 | 86,0 | 55 | 21,530 |
| 12 | 0,500 | 0,275 | 50 | 96,0 | 148 | 59,550 |
| 13 | 0,300 | 0,050 | 40 | 84,0 | 30 | 86,000 |
| 14 | 0,300 | 0,500 | 40 | 98,0 | 204 | 55,160 |
| 15 | 0,300 | 0,050 | 60 | 94,0 | 115 | 8,070 |
| 16 | 0,300 | 0,500 | 60 | 94,0 | 103 | 65,260 |
| 17 | 0,300 | 0,050 | 50 | 66,0 | 24 | 8,040 |
| 18 | 0,300 | 0,500 | 50 | 96,0 | 164 | 65,920 |
| 19 | 0,300 | 0,050 | 50 | 72,0 | 16 | 7,150 |
| 20 | 0,300 | 0,500 | 50 | 96,0 | 145 | 64,510 |
| 21 | 0,300 | 0,275 | 40 | 96,0 | 101 | 30,150 |
| 22 | 0,300 | 0,275 | 60 | 84,0 | 42 | 41,160 |
| 23 | 0,300 | 0,275 | 40 | 96,0 | 155 | 35,480 |
| 24 | 0,300 | 0,275 | 60 | 90,0 | 81 | 38,050 |
| 25 | 0,300 | 0,275 | 50 | 92,0 | 92 | 37,300 |
| 26 | 0,300 | 0,275 | 50 | 92,0 | 92 | 37,300 |
| 27 | 0,300 | 0,275 | 50 | 92,0 | 92 | 37,300 |

Au fost selectate patru variabile independente (debit, temperatură, concentrația substratului și raportul molar (substrat/acetat de vinil), iar limitele

maxime și minime au fost stabilite pe baza rezultatelor obținute în studiile anterioare în sistem discontinuu. Pentru fiecare variabilă au fost selectate trei nivele diferite (minim, mediu și maxim). Primul set de 27 de experimente este prezentat în Tabelul 2.26. Variabilele de răspuns selectate au fost: excesul enantiomeric e.e.p. [%], raportul enantiomeric E și productivitatea [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$].

Rezultatele experimentale prezentate în Tabelul 2.26 au fost supuse unei analize statistice folosind tehnica ANOVA, analiza efectelor și analiza suprafețelor de răspuns. Printre modelele predefinite disponibile în pachetul Unscrambler®, cea mai mare valoare de corelare multiplă 0,918 a fost obținută pentru modelul patrat.

Rezultatele analizei statistice (valoarea-p, testul-t și limitele de încredere pentru fiecare efect) arată că atunci când productivitatea a fost selectată ca și variabilă de răspuns valorile p au fost mai mici de 0,05 pentru debit și concentrația de substrat, demonstrând că modelul este important din punct de vedere statistic și că variabilele sunt corelate (Tabelul 2.27).

Tabel 2.27. Analiza statistică generată folosind tehnica ANOVA pentru productivitate, date calculate pentru *rac*-1 (Program experimental factorial 1)

| | SS | DF | MS | F | p |
|-------------------------------|-----------|----|-----------|-----------|--------|
| Sumar | | | | | |
| Model | 1,644E+04 | 14 | 1,174E+03 | 4,574 | 0,0060 |
| Eroare | 3,081E+03 | 12 | 256,709 | | |
| Total ajustat | 1,952E+04 | 26 | 750,770 | | |
| Variabile | | | | | |
| Termen constant | 477,098 | 1 | 477,098 | 1,859 | 0,1978 |
| Debit (A) | 6,895E+03 | 1 | 6,895E+03 | 26,858 | 0,0002 |
| Concentrația substratului (B) | 5,415E+03 | 1 | 5,415E+03 | 21,094 | 0,0006 |
| Temperatură (C) | 53,217 | 1 | 53,217 | 0,207 | 0,6570 |
| Raport molar (D) | 23,576 | 1 | 23,576 | 9,184E-02 | 0,7670 |
| AB | 1,257E+03 | 1 | 1,257E+03 | 4,895 | 0,0471 |
| AC | 94,478 | 1 | 94,478 | 0,368 | 0,5554 |
| AD | 101,405 | 1 | 101,405 | 0,365 | 0,5415 |
| BC | 1,937E+03 | 1 | 1,937E+03 | 7,547 | 0,0177 |
| BD | 6,761E-02 | 1 | 6,761E-02 | 2,634E-04 | 0,9873 |
| CD | 17,808 | 1 | 17,808 | 6,937E-02 | 0,7967 |
| AA | 29,360 | 1 | 29,360 | 0,114 | 0,7411 |
| BB | 102,550 | 1 | 102,550 | 0,399 | 0,5392 |
| CC | 237,985 | 1 | 237,985 | 0,927 | 0,3546 |
| DD | 80,965 | 1 | 80,965 | 0,315 | 0,5847 |
| Verificare model | | | | | |
| Main vs Mean | 1,239E+04 | 4 | 3,097E+03 | 12,063 | 0,0004 |
| 2 Vars Int vs Main | 3,408E+03 | 6 | 567,964 | 2,212 | 0,1139 |
| Quadratic vs 2 Vars Int | 645,282 | 4 | 161,320 | 0,628 | 0,6514 |
| 3 Vars Int vs 2 Vars Int | 0,000 | 0 | 0,000 | 0,000 | 0,0000 |
| Cubic vs Quadratic | 0,000 | 0 | 0,000 | 0,000 | 0,0000 |
| Eroare | 3,081E+03 | 12 | 256,709 | | |
| Grad de neconcordanță | | | | | |
| Grad de neconcordanță | 3,081E+03 | 10 | 308,051 | m | 0,0000 |
| Eroare pură | 0,000 | 2 | 0,000 | | |
| Eroare totală | 3,081E+03 | 12 | 256,709 | | |

SS–suma de pătrate; DF–numărul gradelor de libertate; MS–media sumelor de pătrate; F–valoarea statistici F; p–probabilitatea critică bilaterală a testului t

2.4.3. Analiza efectelor (Program experimental factorial 1)

Fiecare variabilă independentă selectată (enantioselectivitatea E și productivitatea) a fost analizată din punct de vedere al importanței. Rezultatele analizei efectelor din Tabelul 2.28 indică o corelare directă a debitului și a concentrației de substrat cu E și productivitatea. În ceea ce privește temperatura s-a observat o corelație inversă cu E, în timp ce semnificația generală a raportului molar al reactivilor a fost nesemnificativă. Anumite combinații ale acestor variabile pot avea un efect favorabil important asupra productivității, dar nu pot avea un efect pozitiv asupra enantioselectivității.

Tabel 2.28. Analiza efectelor asupra variabilelor de răspuns pentru rezoluția cinetică a *rac*-1 (Program experimental factorial 1).

| Variabile | E | Productivitate [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$] |
|-----------------------------------|------|--|
| (A) Debit [mL/min] | + | +++ |
| (B) Concentrația substratului [M] | +++ | +++ |
| (C) Temperatura [°C] | - | N.S. |
| (D) Raport molar al reactivilor | N.S. | N.S. |
| AB | N.S. | N.S. |
| AC | N.S. | N.S. |
| AD | N.S. | N.S. |
| BC | N.S. | + |
| BD | N.S. | N.S. |
| CD | N.S. | N.S. |

2.4.4. Analiza suprafețelor de răspuns (Program experimental factorial 1)

Pentru a determina influența debitului și a concentrației de substrat asupra productivității, raportului enantiomeric E și excesului enantiomeric al produsului e.e._p, a fost reprezentată grafic regresia suprafeței. Analiza suprafețelor de răspuns indică o creștere continuă, atât pentru productivitate cât și pentru raportul enantiomeric, pentru tot intervalul de debit și concentrația de substrat aleasă pentru acest experiment (Figura 2.31 și Figura 2.32). Aceste rezultate sugerează că valorile optime pot fi obținute la valori mai mari ale debitului și ale concentrației de substrat.

$$r_{\text{flow}} = -0.72 - 1.5398 \cdot x + 23.5198 \cdot y + 21.7839 \cdot x^2 + 393.8889 \cdot x \cdot y - 35.3559 \cdot y^2$$

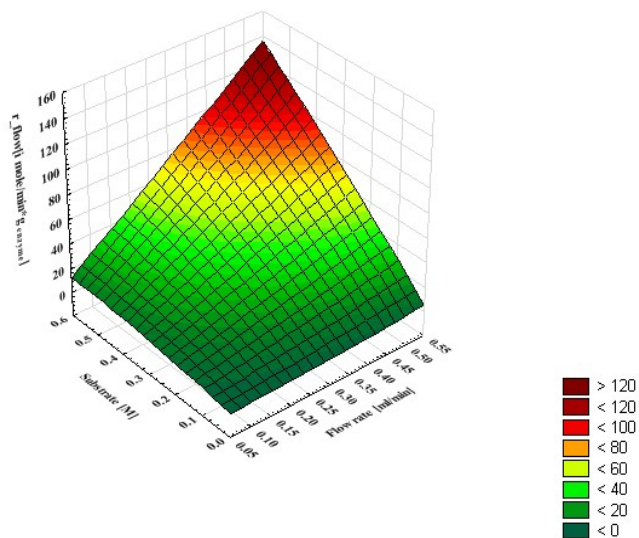


Figura 2.31. Reprezentarea grafică a productivității în funcție de concentrația substratului și a debitului în cazul rezoluției cinetice a *rac*-1 (Program experimental factorial 1).

$$E = 52.8774 - 61.2847 \cdot x - 105.9053 \cdot y - 86.9792 \cdot x^2 + 1144.4444 \cdot x \cdot y + 49.7942 \cdot y^2$$

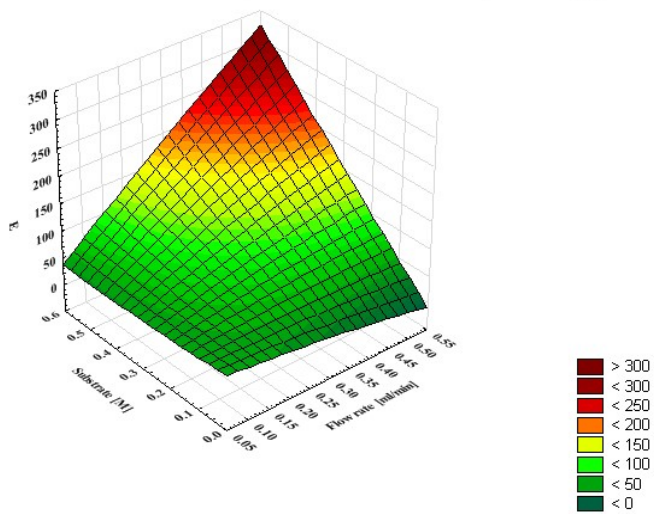


Figura 2.32. Reprezentarea grafică a enantioselectivității în funcție de concentrația substratului și a debitului în cazul rezoluției cinetice a *rac*-1 (Program experimental factorial 1).

2.4.5. Rezoluția cinetică a 2-octanolului în sistem continuu (Program experimental factorial 2)

Pornindu-se de la rezultatele primului program experimental factorial, pentru cel de-al doilea program selecția a fost realizată la valori mai mari ale debitului și concentrației de substrat (în intervalul 0,5-1,25 mL·min⁻¹, respectiv 0,5-1,25 M). Deoarece în experimentele anterioare raportul enantiomeric E, cel mai important parametru în rezoluția cinetică enzimatică, a fost primul afectat de creșterea temperaturii, valorile temperaturii au fost alese în același interval, 40-60°C.

Variabilele de răspuns au fost și în acest caz raportul enantiomeric E și productivitatea. Pentru toate experimentele, valorile excesului enantiomeric al produsului e.e.p. au fost mai mari de 88%. Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 2.29.

Tabel 2.29. Cel de-al doilea program experimental factorial cu cele trei variabile independente și valorile determinate ale variabilelor de răspuns, pentru rezoluția cinetică a *rac*-1.

| Nr.crt | Debit [mL min ⁻¹] | Concentrația substratului [M] | Temperatura [°C] | E | Productivitatea [μmol min ⁻¹ g ⁻¹] |
|--------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------|-----|--|
| 1 | 0,500 | 0,500 | 50 | 104 | 94,690 |
| 2 | 1,250 | 0,500 | 50 | 34 | 152,970 |
| 3 | 0,500 | 1,250 | 50 | 35 | 161,200 |
| 4 | 1,250 | 1,250 | 50 | 45 | 268,430 |
| 5 | 0,500 | 0,875 | 40 | 34 | 108,230 |
| 6 | 1,250 | 0,875 | 40 | 18 | 156,190 |
| 7 | 0,500 | 0,875 | 60 | 208 | 163,200 |
| 8 | 1,250 | 0,875 | 60 | 53 | 340,170 |
| 9 | 0,875 | 0,500 | 40 | 32 | 99,470 |
| 10 | 0,875 | 1,250 | 40 | 23 | 157,370 |
| 11 | 0,875 | 0,500 | 60 | 57 | 147,230 |
| 12 | 0,875 | 1,250 | 60 | 32 | 245,590 |
| 13 | 0,875 | 0,875 | 50 | 32 | 159,910 |
| 14 | 0,875 | 0,875 | 50 | 32 | 159,910 |
| 15 | 0,875 | 0,875 | 50 | 32 | 159,910 |

Rezultatele experimentale obținute au fost supuse analizei statistice folosind tehnica Anova, analiza efectelor și analiza suprafețelor de răspuns. Valoarea celui mai mare coeficient de regresie a fost 0,969 și a fost obținut când a fost ales modelul predefinit patratic. Erorile totale, valorile p și rezultatele de la t-test sunt prezentate în Tabelul 2.30. Valorile p pentru termenii debit și concentrația substratului au fost mai mici de 0,05.

Tabel 2.30. Analiza statistică generată de programul ANOVA pentru productivitatea calculată la transformarea substratului *rac-1* (Program experimental factorial 2).

| | SS | DF | MS | F | p |
|-------------------------------|-----------|----|-----------|--------|--------|
| Sumar | | | | | |
| Model | 5,848E+04 | 9 | 6,497E+03 | 17,545 | 0,0028 |
| Eroare | 1,852E+03 | 5 | 370,323 | | |
| Total ajustat | 6,033E+04 | 14 | 4,309E+03 | | |
| Variabile | | | | | |
| Termen constant | 5,306E+03 | 1 | 5,306E+03 | 14,328 | 0,0128 |
| Debit (A) | 1,903E+04 | 1 | 1,903E+04 | 51,385 | 0,0008 |
| Concentrația substratului (B) | 1,428E+04 | 1 | 1,428E+04 | 38,553 | 0,0016 |
| Temperatură (C) | 1,757E+04 | 1 | 1,757E+04 | 47,449 | 0,0010 |
| AB | 605,652 | 1 | 605,652 | 1,635 | 0,2571 |
| AC | 4,161E+03 | 1 | 4,161E+03 | 11,236 | 0,0203 |
| BC | 409,253 | 1 | 409,253 | 1,105 | 0,3413 |
| AA | 1,405E+03 | 1 | 1,405E+03 | 3,794 | 0,1090 |
| BB | 371,172 | 1 | 371,172 | 1,002 | 0,3627 |
| CC | 579,811 | 1 | 579,811 | 1,566 | 0,2662 |
| Verificarea modelului | | | | | |
| Principal | 5,088E+04 | 3 | 1,696E+04 | | |
| Int | 5,176E+03 | 3 | 1,725E+03 | 4,659 | 0,0654 |
| Int + Squ | 2,423E+03 | 3 | 807,670 | 2,181 | 0,2086 |
| Squ | 0,000 | 0 | 0,000 | 0,000 | 0,0000 |
| Eroare | 0,000 | 0 | 0,000 | | |
| Grad de neconcordanță | | | | | |
| Grad de neconcordanță | 1,852E+03 | 3 | 317,204 | m | 0,0000 |
| Eroare pură | 0,000 | 2 | 0,000 | | |
| Eroare totală | 1,852E+03 | 5 | 370,323 | | |

SS–suma de pătrate; DF–numărul gradelor de libertate; MS–media sumelor de pătrate; F–valoarea statistică F; p–probabilitatea critică bilaterală a testului t.

2.4.6. Analiza efectelor (Program experimental factorial 2)

Analiza efectelor indică faptul că debitul și concentrația substratului au cel mai semnificativ efect și sunt corelate direct cu creșterea productivității (Tabelul 2.31). De asemenea, temperatura are un efect semnificativ asupra enantioselectivității și productivității. Concentrația de substrat arată o corelație indirectă cu conversia, excesul enantiomeric și raportul enantiomeric E, dar într-un mod diferit comparativ cu primul program experimental factorial, indicând faptul că concentrația substratului a atins nivelul optim.

Tabel 2.31. Analiza efectelor asupra variabilelor de răspuns.

| Variabile | E | Productivitatea [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$] |
|---------------------------------|------|--|
| Debit [mL/min] | - | ++ |
| Concentrația de substrat [M] | - | ++ |
| Temperatura [°C] | N.S. | ++ |

Corectitudinea predicției este demonstrată în Figura 2.33a, unde valorile calculate ale productivității sunt reprezentate grafic în funcție de rezultatele practice

obținute. Potrivirea acceptată a fost demonstrată de probabilitatea normală a reziduurilor, ceea ce arată că rezultatele sunt distribuite normal (Figura 2.33b).

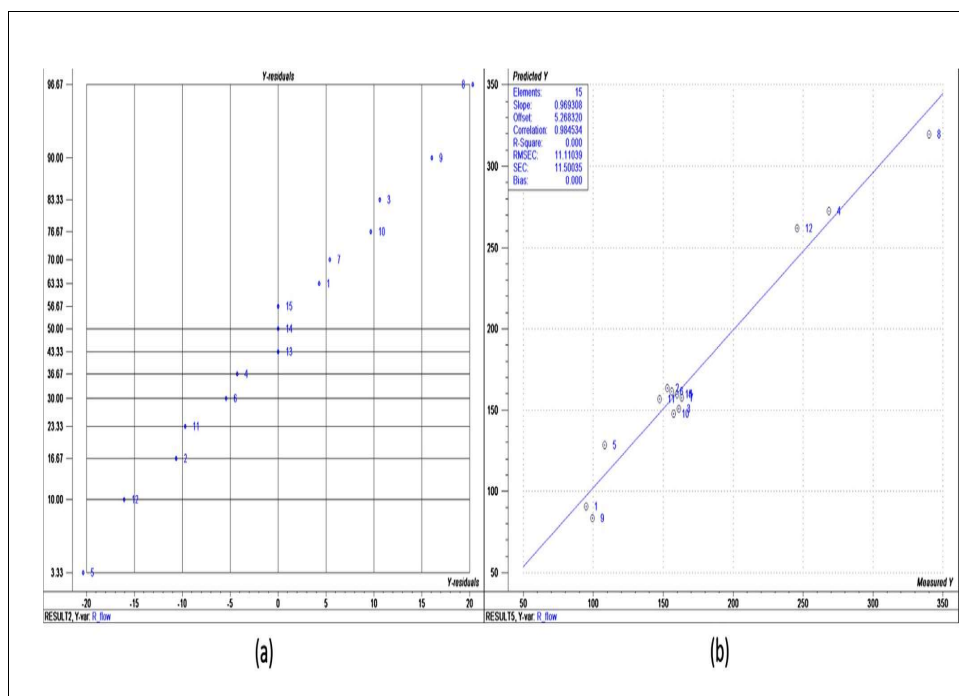
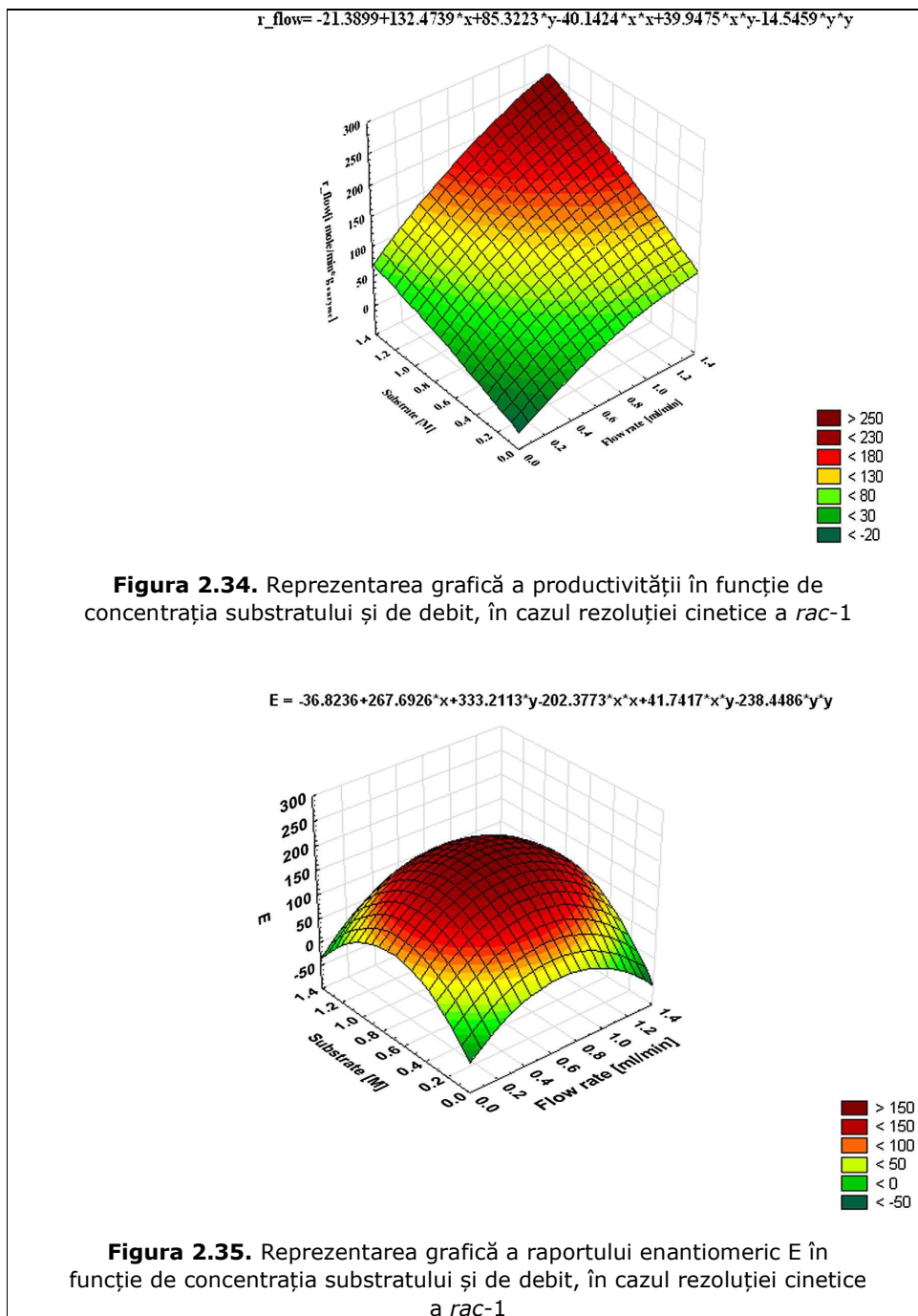


Figura 2.33. Reprezentarea grafică a reziduurilor (a) și comparația dintre valorile productivității prezise și cele obținute practic a reziduurilor (b).

2.4.7. Analiza suprafețelor de răspuns

Pentru a elucida și a înțelege mai bine interacțiunea și efectele variabilelor studiate (concentrația substratului, debitul și temperatura) asupra variabilelor de răspuns, toate datele de la ambele experimente au fost combinate, generând grafice ale suprafeței de răspuns. Diagrama productivității ca și funcție a concentrației de substrat și a debitului indică tendința de creștere continuă a stabilității și performanței biocatalizatorului la concentrații mai mari de 1,25 M (Figura 2.34). Spre deosebire de productivitate, dependența raportului enantiomeric E ca și o funcție a aceluiași parametri a permis stabilirea valorilor optime ale concentrației de substrat și debitului pentru a obține cele mai mari valori ale enantioselectivității (Figura 2.35).



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

Pentru validarea rezultatelor modelului experimental, reacția de acilare a *rac*-1 în sistem continuu a fost realizată folosind parametrii optimi rezultați din această modelare. Rezultatele prezentate în Figura 2.36 arată că timp de 144 de ore de reacție valorile productivității s-au menținut constante la aproximativ 145 μmol·min⁻¹·g⁻¹, iar raportul enantiomeric a fost mai mare de 300, demonstrând stabilitatea operațională excelentă în sistem continuu a biocatalizatorului imobilizat și validitatea modelului experimental.

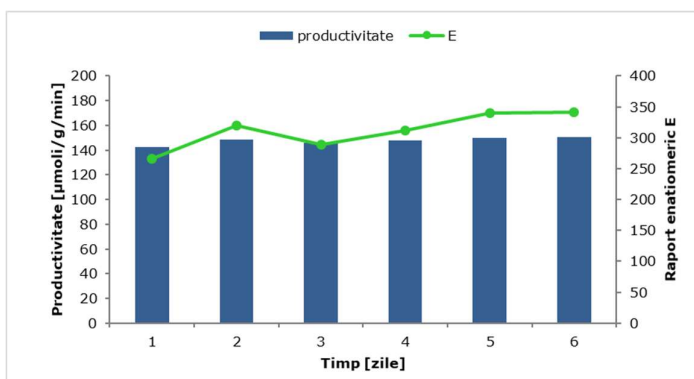


Figura 2.36. Diagrama productivității și enantioselectivității (E) lipazei Cal B imobilizate în sol-gel, la utilizare îndelungată în sistem continuu într-un reactor cu strat fix de biocatalizator, pentru rezoluția cinetică a *rac*-1 în condiții de reacție optimizate.

2.4.8. Rezoluția cinetică enzimatică a 1-feniletanolului (*rac*-2) în sistem continuu

A fost studiată rezoluția cinetică în sistem continuu a substratului *rac*-2, folosind un reactor cu strat fix conținând aceeași lipază Cal B imobilizată prin entrapare în sol-gel (metoda SGE-1) care a fost utilizată și în studiile de rezoluție cinetică ale substratului *rac*-1. Optimizarea condițiilor de reacție s-a realizat prin programul experimental factorial Box-Behnken. Studiile au fost efectuate în intervalul de temperatură 40-60°C, debitul a fost ales în intervalul 0,3-1,25 mL/min, iar concentrația de substrat a fost stabilită între 0,05M-1,25M. Rezultatele, prezentate în Tabelul 2.32, au fost supuse analizei ANOVA și RSM. Valoarea de corelare a coeficientului de regresie de 0,996 obținută prin potrivirea rezultatelor productivității cu modelul patric indică o predicție bună a modelului comparativ cu datele experimentale. Valorile foarte scăzute ale lui p (Tabelul 2.33), obținute pentru toate cele trei variabile independente selectate și pentru efectul lor pătratic, împreună cu lipsa de potrivire, indică faptul că acești parametri sunt semnificativi și influențează procesul.

Tabel 2.32. Programul experimental factorial cu valorile variabilelor independente și valorile determinate experimental pentru variabilele de răspuns, pentru substratul 1-feniletanol, *rac*-2.

| Nr.crt | Debit [mL min ⁻¹] | Concentrația substratului [M] | Temperatura [°C] | e.e.p. [%] | E | Productivitate [μmol·min ⁻¹ ·g ⁻¹] |
|--------|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------|---------------|-----|--|
| 1 | 0,900 | 0,050 | 40 | 98,0 | 200 | 18,400 |
| 2 | 0,900 | 1,250 | 40 | 98,0 | 109 | 51,900 |
| 3 | 0,900 | 0,050 | 60 | 98,0 | 191 | 21,200 |
| 4 | 0,900 | 1,250 | 60 | 98,0 | 114 | 92,200 |
| 5 | 0,300 | 0,050 | 50 | 98,0 | 224 | 6,800 |
| 6 | 0,300 | 1,250 | 50 | 98,0 | 136 | 61,100 |
| 7 | 1,500 | 0,050 | 50 | 98,0 | 167 | 29,800 |
| 8 | 1,500 | 1,250 | 50 | 98,0 | 107 | 80,400 |
| 9 | 0,300 | 0,650 | 40 | 98,0 | 143 | 35,900 |
| 10 | 0,300 | 0,650 | 60 | 98,0 | 290 | 63,400 |
| 11 | 1,500 | 0,650 | 40 | 98,0 | 108 | 50,500 |
| 12 | 1,500 | 0,650 | 60 | 98,0 | 118 | 85,200 |
| 13 | 0,900 | 0,650 | 50 | 98,0 | 119 | 58,100 |
| 14 | 0,900 | 0,650 | 50 | 98,0 | 119 | 58,200 |
| 15 | 0,900 | 0,650 | 50 | 98,0 | 119 | 58,100 |

Tabel 2.33. Analiza statistică generată de ANOVA pentru productivitate ($R^2=0,996$) la substratul *rac*-2.

| | SS | DF | MS | F | p |
|----------------------------------|-----------|----|-----------|-----------|--------|
| Sumar | | | | | |
| Model | 1,412E+04 | 9 | 1,569E+03 | 156,989 | 0,0000 |
| Eroare | 49,979 | 5 | 9,996 | | |
| Total ajustat | 1,417E+04 | 14 | 1,012E+03 | | |
| Variabile | | | | | |
| Termen constant | 2,478E+03 | 1 | 2,478E+03 | 247,902 | 0,0000 |
| Debit [mL/min] (A) | 774,211 | 1 | 774,211 | 77,453 | 0,0003 |
| Concentrația substratului [M](B) | 5,481E+03 | 1 | 5,481E+03 | 548,333 | 0,0000 |
| Temperatură [°C] (C) | 1,386E+03 | 1 | 1,386E+03 | 138,658 | 0,0001 |
| AB | 3,423 | 1 | 3,423 | 0,342 | 0,5839 |
| AC | 12,960 | 1 | 12,960 | 1,297 | 0,3065 |
| BC | 351,563 | 1 | 351,563 | 35,171 | 0,0019 |
| AA | 1,535E+03 | 1 | 1,535E+03 | 153,597 | 0,0001 |
| BB | 4,074E+03 | 1 | 4,074E+03 | 407,559 | 0,0000 |
| CC | 1,332E+03 | 1 | 1,332E+03 | 133,231 | 0,0001 |
| Verificarea modelului | | | | | |
| Main vs Mean | 7,641E+03 | 3 | 2,547E+03 | 254,815 | 0,0000 |
| 2 Vars Int vs Main | 367,945 | 3 | 122,648 | 12,270 | 0,0096 |
| Quadratic vs 2 Vars Int | 6,114E+03 | 3 | 2,038E+03 | 203,880 | 0,0000 |
| 3 Vars Int vs 2 Vars Int | 0,000 | 0 | 0,000 | 0,000 | 0,0000 |
| Cubic vs Quadratic | 0,000 | 0 | 0,000 | 0,000 | 0,0000 |
| Eroare | 49,979 | 5 | 9,996 | | |
| Grad de neconcordanță | | | | | |
| Grad de neconcordanță | 49,972 | 3 | 16,657 | 4,997E+03 | 0,0002 |
| Eroare pură | 6,666E-03 | 2 | 3,333E-03 | | |
| Eroare totală | 49,979 | 5 | 9,996 | | |

SS–suma de pătrate; DF–numărul gradelor de libertate; MS–media sumelor de pătrate; F–valoarea statisticii F; p–probabilitatea critică bilaterală a testului t.

Suprafața de răspuns și graficele de contur au fost generate mai întâi prin utilizarea ecuațiilor polinomiale de ordinul doi pentru parametrii de interacțiune productivitate și E. Figura 2.37 prezintă graficul conturului pentru productivitate, ca funcție a parametrilor de interacțiune a debitului (axa X) și concentrația de substrat (axa Y).

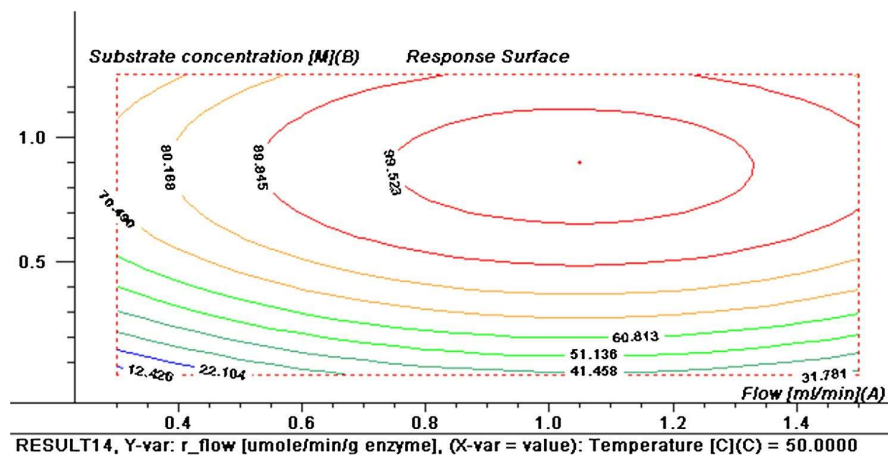


Figura 2.37. Graficul suprafeței de răspuns pentru reacția de acilare a *rac*-2, catalizată de lipaza immobilizată Cal B, în sistem continuu.

$$E = 324.5746 - 256.6244 \cdot x - 130.2157 \cdot y + 105.5189 \cdot x^2 + 24.5614 \cdot x \cdot y + 34.8825 \cdot y^2$$

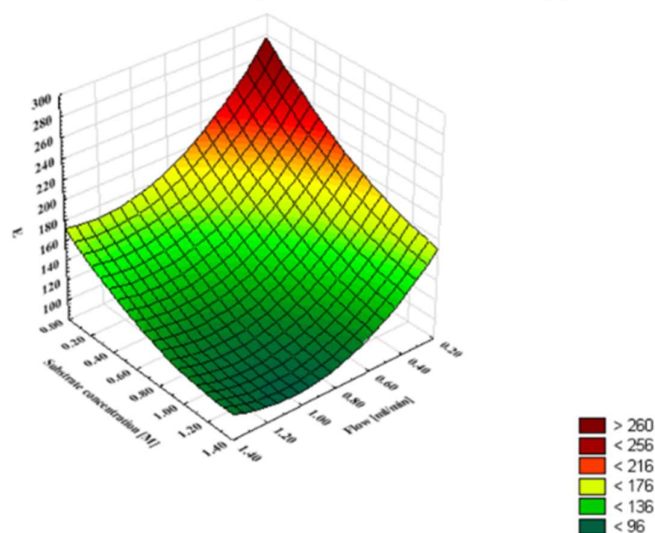


Figura 2.38. Reprezentarea grafică a influenței concentrației și debitului soluției de substrat asupra raportului enantiomeric E, pentru programul experimental factorial în cazul rezoluției cinetice a *rac*-2.

Valoarea maximă a productivității a fost $104,3 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ și această valoare poate fi atinsă în condițiile optime de concentrație de substrat de $0,9 \text{ M}$, debit de $1,05 \text{ mL/min}$ și temperatură de 40°C . Aceleași rezultate indică și faptul că valoarea maximă a productivității este corelată cu o valoare mai mică a raportului enantiomeric E (de 98%). Graficul suprafeței de răspuns pentru E ca funcție a debitului și a concentrației de substrat (Figura 2.38) indică o scădere a raportului enantiomeric E dacă valorile parametrilor respectivi cresc peste o anumită limită. Pentru a atinge valoarea dorită a enantioselectivității ($E > 200$), debitul și concentrația de substrat nu trebuie să depășească $0,45 \text{ mL/min}$, respectiv $0,2 \text{ M}$. În aceste condiții, se poate atinge o valoare rezonabilă a productivității, de $40,4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

Bazat pe cele mai mari valori ale lui E și e.e.p. obținute prin metodologia suprafeței de răspuns (RSM), parametri optimi de reacție au fost stabiliți la o concentrație de substrat de $0,2 \text{ M}$ a *rac*-2, raportul molar acetat de vinil: substrat de $1,5:1$, temperatura de reacție 50°C și debitul soluției de substrat $0,45 \text{ mL/min}$.

Validarea rezultatelor obținute cu ajutorul modelului experimental s-a efectuat și de această dată prin realizarea reacției de acilare a substratului *rac*-2 în sistem continuu, în condițiile optime rezultate prin modelare și menționate mai sus. Rezultatele sunt prezentate în Figura 2.39, care arată că timp de 144 de ore de reacție în sistem continuu s-au obținut valori constante ale productivității de aproximativ $25 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ și valori ale raportului enantiomeric mai mari de 288, demonstrând excelența stabilitate operațională a biocatalizatorului imobilizat și validitatea modelului.

Rezultatele obținute în acest studiu au fost comparate cu rezultate publicate anterior pentru acilarea enantioselectivă în sistem continuu pentru aceleași substraturi, *rac*-1 și *rac*-2, folosind aceeași lipază Cal B, imobilizată prin metode diferite (Tabelul 2.34).

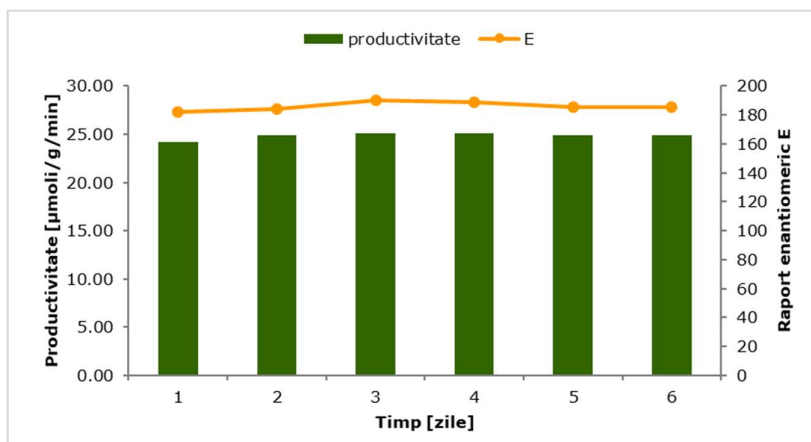


Figura 2.39. Diagrama productivității și enantioselectivității (E) lipazei Cal B imobilizate în sol-gel, la utilizare îndelungată în sistem continuu într-un reactor cu strat fix de biocatalizator, pentru rezoluția cinetică a *rac*-2 în condiții de reacție optimizate

Datele din Tabelul 2.34 indică o valoare a productivității de 15 ori mai mare în cazul substratului *rac-1*, în raport cu un alt biocatalizator imobilizat în sol-gel raportat în literatură, în timp ce pentru *rac-2* biocatalizatorul nostru a fost de 5 ori mai eficient comparativ cu preparatul obținut tot prin imobilizare în sol-gel și comparabil cu performanța enzimei adsorbite.

Tabel 2.34. Compararea productivității și a enantioselectivității pentru rezoluția cinetică a *rac-1* și *rac-2* în sistem continuu, catalizată de lipaza Cal B

| Suport imobilizare/metodă | Substrat | Productivitate [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$] | E | Referința |
|---|--------------|---|------|------------------|
| Rășină acrilică | <i>rac-2</i> | 10,2 | »200 | [151] |
| Suport de silice/ adsorbție | <i>rac-2</i> | <50 | »200 | [144] |
| Matrice sol-gel (TEOS:PhTEOS:DMDEOS, raport molar 4:1:1) | <i>rac-1</i> | <10 | >200 | [148] |
| Matrice sol-gel (PhTMOs:VTMOs:TMOS, raport molar 1,6:0,4:1) | <i>rac-1</i> | 145 | >200 | Acestl studiu |
| | <i>rac-2</i> | 40 | >200 | |

2.4.9. Concluzii

Prin folosirea programului experimental factorial, parametrii care influențează rezoluția cinetică în sistem continuu au fost optimizați pentru doi alcooli secundari, 2-octanol și 1-feniletanol.

Prin metodologia suprafeței de răspuns (RSM), bazat pe cele mai mari valori ale lui E și e.p., au fost stabiliți parametrii optimi de proces pentru rezoluția cinetică enzimatică și aceste valori optime au fost verificate experimental.

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

2.5. Imobilizarea unor enzime oxidative prin legare covalentă și aplicații biotehnologice

2.5.1. Imobilizarea lacazei și evaluarea utilizării lacazei pentru obținere de acid glucaric

Lacaza (benzendiol: oxigen oxidoreductaza, EC 1.10.3.2) este o enzimă care catalizează oxidarea compușilor fenolici și non-fenolici, fiind utilizată în diverse aplicații industriale, care au fost prezentate în subcapitolul 1.3.1.2

Un dezavantaj al utilizării enzimelor native este instabilitatea lor în condiții de proces. Imobilizarea enzimelor este preferată pentru a crește stabilitatea și a facilita separarea de amestecul de reacție, cât și reutilizarea preparatului [214].

În contextul actualelor tendințe ale biocatalizei, prezentate în Capitolul 1, s-a realizat stabilizarea lacazei din *Trametes versicolor* cu scopul utilizării acesteia în reacția de oxidare a glucozei la acid aldaric. Așa cum a rezultat din studiul de literatură, au fost investigate o serie de tehnici pentru imobilizarea lacazei: adsorbție, entrapare, legare covalentă. La selectarea tehnicii potrivite trebuie ținut cont de faptul că nu există o metodă universală de imobilizare a enzimelor. Suportul ales trebuie să fie insolubil și compatibil cu enzima și ar trebui să mențină stabilitatea enzimei în condițiile de proces [215].

2.5.1.1. Stabilizarea lacazei din *Trametes versicolor* prin legare covalentă

Lacaza din *Trametes versicolor* a fost imobilizată prin legare covalentă utilizând suporturi disponibile comercial, funcționalizate cu grupări adecvate pentru legare covalentă, care au fost furnizate de compania Purolite. Două dintre aceste suporturi conțin grupări funcționale epoxidice (denumite de producător epoxi/metacrilat și epoxi/butil-metacrilat), iar unul conține grupări amino (amino C2 metacrilat), aceste grupări reactive fiind grefate pe un schelet de polimetacrilat.

Determinarea încărcării optime a suportului cu lacază

Pentru fiecare suport s-a determinat cantitatea optimă de enzimă, pentru a obține un biocatalizator solid cât mai eficient. În acest sens, imobilizarea s-a realizat pe fiecare suport la 4 concentrații diferite de enzimă: 0,45 mg, 1 mg, 2,5 mg și 5 mg proteină/100mg suport. În urma acestui studiu au rezultat 12 preparate enzimatică cu lacază imobilizată. Determinarea proprietăților catalitice ale acestora s-a realizat pentru reacția de oxidare a substratului model 2,6-dimetoxifenol (Figura 2.40), iar activitățile enzimatică calculate pentru preparatele rezultate sunt prezentate în Tabelele 2.35 -2.37.

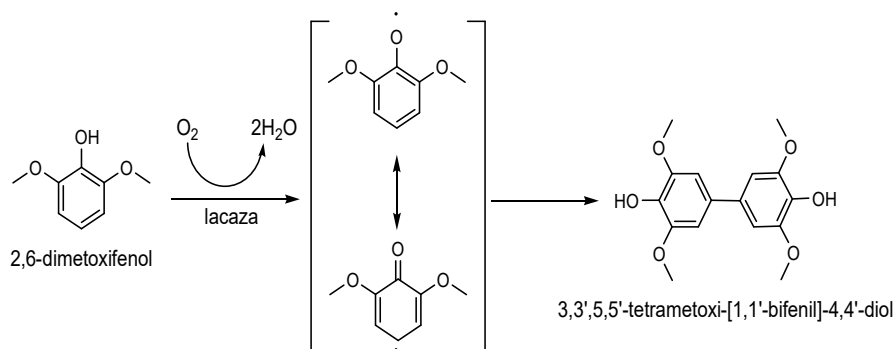


Figura 2.40. Reacția de oxidare a substratului model 2,6-dimetoxifenol cu lacază din *Trametes versicolor*

Tabel 2.35. Oxidarea 2,6-dimetoxifenolului cu lacază imobilizată prin legare covalentă, utilizând un suport cu grupări epoxidice/metacrilat (300-600 Å).

| Biocatalizator [mg prot /100mg suport] | Cantitate biocatalizator [g] | Activitate [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$] | Randament imobilizare [%] |
|--|------------------------------------|---|---------------------------------|
| 0,45 | 0,0123 | 266,9 | 100,0 |
| 1,0 | 0,0125 | 260,2 | 100,0 |
| 2,5 | 0,0124 | 288,3 | 100,0 |
| 5,0 | 0,0125 | 448,4 | 94,3 |

Tabel 2.36. Oxidarea 2,6-dimetoxifenolului cu lacază imobilizată prin legare covalentă, utilizând un suport cu grupări epoxidice/butil-metacrilat (400-600 Å).

| Biocatalizator [mg prot /100mg suport] | Cantitate biocatalizator [g] | Activitate [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$] | Randament imobilizare [%] |
|--|------------------------------------|---|---------------------------------|
| 0,45 | 0,0125 | 245,6 | 100,0 |
| 1,0 | 0,0123 | 354,5 | 100,0 |
| 2,5 | 0,0120 | 446,7 | 100,0 |
| 5,0 | 0,0122 | 665,5 | 100,0 |

Tabel 2.37. Oxidarea 2,6-dimetoxifenolului cu lacază imobilizată prin legare covalentă, utilizând un suport cu grupări amino C2 metacrilat (600-1200 Å).

| Biocatalizator [mg prot /100mg suport] | Cantitate biocatalizator [g] | Activitate [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$] | Randament imobilizare [%] |
|--|------------------------------------|---|---------------------------------|
| 0,45 | 0,0121 | 350,7 | 100,0 |
| 1,0 | 0,0123 | 282,8 | 92,5 |
| 2,5 | 0,0122 | 338,4 | 86,2 |
| 5,0 | 0,0122 | 382,9 | 87,7 |

Din Tabelele 2.35 și 2.36 se observă că în cazul suporturilor cu grupări epoxidice activitatea biocatalizatorului a crescut odată cu creșterea cantității de proteină enzimatică supusă imobilizării, valorile activităților obținute fiind între 250 și 660 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ preparat. Aceste rezultate confirmă faptul că în condițiile în care cantitatea de enzimă introdusă la imobilizare este mai mare, aceasta se va reflecta și în creșterea cantității de enzimă care se va lega de suport. Totuși, creșterea activității nu este proporțională cu creșterea cantității de enzimă supuse imobilizării ci este mult mai mică. La imobilizarea lacazei prin legare covalentă pe suport cu grupări epoxidice/metacrilat și epoxidice/butil-metacrilat se observă doar o dublare a activității la valoarea maximă de încărcare cu proteină (la o încărcare cu proteină de 11 ori mai mare), comparativ cu încărcarea minimă, deoarece imobilizarea este influențată decisiv și de alte fenomene. Chiar în condițiile în care există grupări active libere prin care se poate realiza legarea pe suport, probabil că poziționarea acestora nu este corespunzătoare, mai ales dacă se găsesc în interiorul porilor sau dacă există deja molecule de enzimă care s-au legat în vecinătatea acestora. Acest lucru este demonstrat de faptul că activitățile obținute în cazul suporturilor polimerice funcționalizate cu grupări butil/epoxi au fost mai mari decât în cazul celor funcționalizate doar cu grupări epoxi, cu excepția celei obținute la cea mai mică încărcare cu proteină. Aceste rezultate indică faptul că introducerea unei grupări de

tip „spacer” (distanțator) are efect favorabil asupra activității, fiind favorizat accesul substratului în situsul activ al enzimei.

În cazul suportului funcționalizat cu grupări amino (Tabelul 2.37) s-au obținut valori mai mici ale activității biocatalizatorilor imobilizați, între 280-380 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ preparat și s-a constatat că o creștere a cantității de proteină nu influențează semnificativ activitatea biocatalizatorilor obținuți. Considerând ca măsură a eficienței de legare covalentă activitatea rezultată după imobilizarea unei unități de masă de lacază (exprimată ca proteină), cel mai eficient preparat obținut ar fi fost cel pe suportul cu grupări funcționale aminice, la o încărcare de 0,45 mg proteină/100 mg suport, rezultând o activitate de 779 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ suport pentru 1 mg proteină supusă imobilizării. În realitate însă cea mai importantă caracteristică este activitatea efectivă a enzimei imobilizate, iar din acest punct de vedere preparatul obținut pe suportul cu grupări butil/epoxi a fost cel mai bun, chiar dacă raportul activitate/cantitate de enzimă a fost considerabil mai mic (133,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ suport pentru 1 mg proteină supusă imobilizării). Din acest motiv, lacaza imobilizată pe suportul cu grupări butil/epoxi a fost utilizat pentru studiile următoare.

Randamentele de imobilizare prin legare covalentă au fost foarte bune. În cazul suporturilor cu grupări epoxi nu s-a detectat proteină în soluțiile rămase după imobilizare, ceea ce înseamnă că toată proteina s-a legat de suport, chiar dacă nu în formă activă. Prin legare covalentă utilizând suportul amino C2 metacrilat s-a observat o scădere a randamentului de imobilizare odată cu creșterea încărcării de enzimă pe suport.

2.5.1.2. Studiul imobilizării lacazei din *Trametes versicolor* prin adsorbție pe suporturi polimerice

Lacaza din *Trametes versicolor* a fost imobilizată prin adsorbție utilizând trei suporturi funcționalizate cu grupări diferite:

- **Octadecil metacrilat**, la care adsorbția se poate realiza prin interacțiuni nepolare între regiunile hidrofobe ale enzimei și grupările alchil C18;
- **Divinilbenzen/metacrilat**, care conține în structura sa grupări fenilen, dar și grupări alchil legate de lanțul polimeric;
- **Stiren macroporos**, care conține grupări fenil, prin urmare poate interacționa și cu grupările mai polare ale enzimei.

Pentru fiecare suport au fost studiate 4 concentrații de proteină 0,45 mg, 1 mg, 2,5 mg și 5 mg proteină/100mg suport, fiind astfel obținute 12 preparate enzimatică cu lacază imobilizată. Testarea proprietăților catalitice ale acestora s-a realizat în reacția de oxidare a substratului model 2,6-dimetoxifenolul, iar activitățile enzimatică calculate sunt prezentate în Tabelele 2.38-2.40.

Tabel 2.38. Oxidarea 2,6-dimetoxifenolului cu lacază imobilizată prin adsorbție utilizând suport cu grupări octadecil metacrilat (500-700 Å).

| Biocatalizator [mg prot /100mg suport] | Cantitate biocatalizator [g] | Activitate [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$] | Randament imobilizare [%] |
|--|------------------------------------|---|---------------------------------|
| 0,45 | 0,0122 | 139,5 | 100,0 |
| 1,0 | 0,0123 | 180,9 | 100,0 |
| 2,5 | 0,0121 | 188,2 | 99,6 |
| 5,0 | 0,0122 | 292,3 | 97,6 |

Tabel 2.39. Oxidarea 2,6-dimetoxifenolului cu lacază imobilizată prin adsorbție utilizând suport de tip DVB/metacrilat (220-340 Å).

| Biocatalizator [mg prot /100mg suport] | Cantitate biocatalizator [g] | Activitate [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$] | Randament imobilizare [%] |
|--|------------------------------------|---|---------------------------------|
| 0,45 | 0,0124 | 343,4 | 93,1 |
| 1,0 | 0,0124 | 227,0 | 87,9 |
| 2,5 | 0,0126 | 474,7 | 81,5 |
| 5,0 | 0,0126 | 650,9 | 89,1 |

Tabel 2.40. Oxidarea 2,6-dimetoxifenolului cu lacază imobilizată prin adsorbție utilizând suport de tip stiren macroporos (900-1100 Å).

| Biocatalizator [mg prot /100mg suport] | Cantitate biocatalizator [g] | Activitate [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$] | Randament imobilizare [%] |
|--|------------------------------------|---|---------------------------------|
| 0,45 | 0,0125 | 203,2 | 100,0 |
| 1,0 | 0,0122 | 222,8 | 100,0 |
| 2,5 | 0,0123 | 228,4 | 100,0 |
| 5,0 | 0,0123 | 270,5 | 95,9 |

Din Tabelele 2.38–2.40 se observă o tendință generală o creștere a activității biocatalizatorului odată cu creșterea cantității de enzimă.

Și în cazul imobilizării prin adsorbție se observă doar cel mult o dublare a activității la atingerea valorii maxime a încărcării cu proteină (la o încărcare cu proteină de 11 ori mai mare), comparativ cu încărcarea minimă.

Dintre suporturile utilizate, copolimerul divinilbenzen-metacrilat a fost cel mai eficient, rezultând valorile cele mai ridicate ale activității enzimaticice după adsorbție. Acest lucru se datorează structurii acestui suport, care prezintă atât grupări hidrofobe cât și polarizabile, prin urmare poate interacționa cu o gamă mai extinsă de grupări funcționale din structura enzimei. Morfologia suportului poate juca de asemenea un rol important în cazul legării enzimei prin adsorbție. În cazul suportului de tip polistiren macroporos valorile activităților au fost apropiate, indiferent de cantitatea de enzimă. Prin urmare, chiar dacă dimensiunile porilor au fost mari, prezența unei densități ridicate de grupări fenil nu a favorizat adsorbția.

Și în cazul imobilizării prin adsorbție s-au obținut valori ridicate ale randamentului de imobilizare. Ca și în cazul metodei de imobilizare prin legare covalentă, se observă o ușoară scădere a randamentului de imobilizare odată cu creșterea încărcării cu enzimă.

2.5.1.3. Efectul raportului enzimă/suport asupra activității catalitice a lacazei imobilizate

Pentru a compara cele două metode de imobilizare, s-au reprezentat activitățile lacazei imobilizate în funcție de raportul enzimă/suport, exprimat ca mg proteină/100 mg suport. Figura 2.41(a-d) prezintă valorile activităților la aceeași încărcare cu enzimă, pentru toate suporturile folosite.

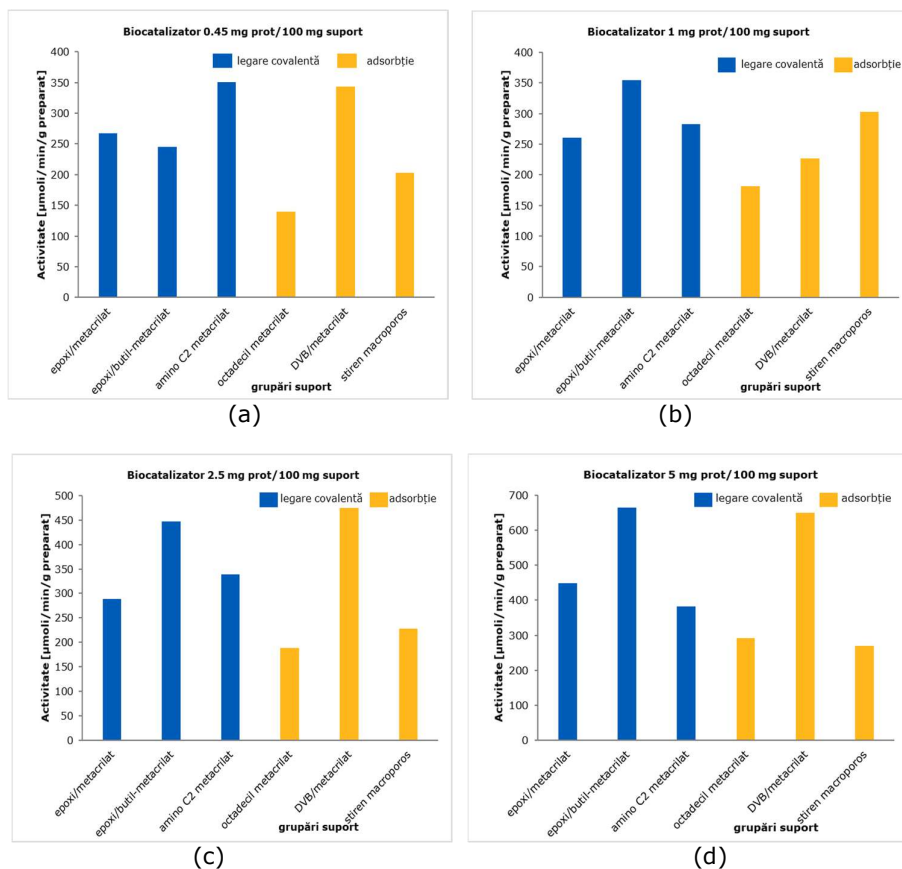


Figura 2.41. Efectul raportului enzimă/suport asupra activității biocatalizatorilor obținuți prin imobilizarea lacazei prin legare covalentă și adsorbție: (a) 0,45 mg proteină, (b) 1,0 mg proteină, (c) 2,5 mg proteină și (d) 5 mg proteină, raportate în toate cazurile la 100 mg suport.

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

Așa cum se poate observa din Figura 2.41, preparatele enzimice obținute prin legare covalentă au avut valori ale activităților cuprinse în intervalul 245-665 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ preparat, care au fost în general mai mari comparativ cu biocatalizatorii obținuți prin adsorbție. Totuși, dintre aceștia cei pe suport divinilbenzen/metacrilat, au prezentat de asemenea activități mari, comparabile sau chiar mai ridicate decât cele obținute prin legare covalentă.

2.5.1.4. Studiul profilului de pH al lacazei native și imobilizate prin legare covalentă pe suportul cu grupări epoxi/butil

Efectul concentrației ionilor de hidrogen asupra activității enzimei este similar cu cel al compușilor activatori sau inhibitori. Se pot aplica aceleași metode cinetice și teorii pentru ambele sisteme [216].

Intervalul de pH pentru care a fost studiat efectul acestuia asupra activității lacazei native și imobilizate a fost 1,8-7. Testarea activității catalitice în intervalul de pH 1,8-7 s-a realizat pentru reacția de oxidare a substratului model 2,6-dimetoxifenol, la temperatura camerei (Tabelul A1 și Tabelul A2, Anexe).

În cazul enzimei native, cea mai mare valoare a activității a fost determinată la pH 3,5. Din Figura 2.42 se mai poate observa că la pH 1,8 enzima nativă încă își păstrează 80% din activitatea maximă, în timp ce la o valoare mai mare de 5 a pH-ului activitatea scade la mai puțin de 50% din valoarea maximă. Aceasta indică o stabilitate mult mai pronunțată a lacazei native în domeniul acid de pH.

În cazul enzimei imobilizate prin legare covalentă pe suport cu grupări epoxi/butil (Figura 2.42), valoarea maximă a activității pH-ului s-a deplasat la valoarea pH 4. După imobilizare se observă că la un pH mai mic de 3 și mai mare de 5 activitatea biocatalizatorului scade pronunțat. Modificarea pH-ului optim în urma imobilizării poate oferi indicații despre tipul grupărilor implicate în realizarea imobilizării. Modificările mecanismului de reacție al unei enzime odată cu modificarea pH-ului pot furniza informații valoroase despre rolul grupurilor ionizante în reacția catalizată [216].

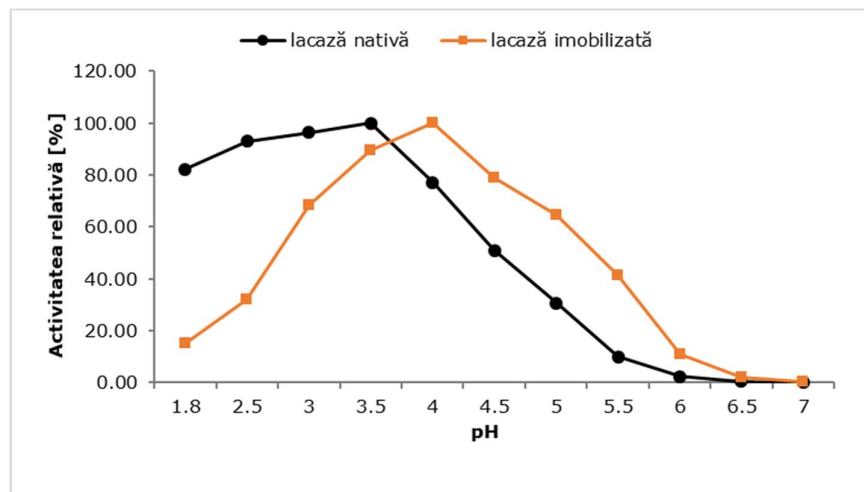


Figura 2.42. Influența pH-ului asupra activității relative (raportată la valoarea cea mai mare de activitate) a lacazei native și imobilizate prin legare covalentă pe suport cu grupări epoxi/butil, în reacția de oxidare a 2,6-dimetoxifenolului.

2.5.1.5. Studiul influenței conținutului de apă al lacazei imobilizate prin legare covalentă pe un suport cu grupări epoxi/butil asupra activității

Deoarece după spălarea preparatului enzimatic cantitatea de apă ramasă nu poate fi controlată și poate influența determinarea activității preparatelor obținute, s-a studiat efectul eliminării controlate a apei din preparatul enzimatic asupra activității. Uscarea preparatului a avut loc în etuvă la temperatura de 25°C, timp de 48 h. Testarea proprietăților catalitice a preparatului enzimatic s-a realizat pentru reacția de oxidare a substratului model, 2,6-dimetoxifenol.

În comparație cu preparatul inițial, în Figura 2.43 se poate observa că după 24 de ore de uscare la 25°C activitatea preparatului enzimatic scade cu 55% iar după 48 de ore scade cu 80%, în timp ce preparatul care nu a fost supus uscării își pastrează activitatea pe tot intervalul de timp studiat. Această scădere a activității se poate datora eliminării unei cantități prea mari de apă din preparatul enzimatic, ceea ce duce la modificarea conformației active a enzimei. Se știe că proprietățile chimice și fizice pe care le prezintă enzimele depind în mare măsură de rolul direct sau indirect al apei în toate interacțiunile necovalente care ajută la menținerea enzimei active din punct de vedere conformational [217]. Prin urmare, cantitatea de apă care rămâne în preparat după filtrare este necesară pentru menținerea conformației active a enzimei și îndepărtarea sa prin uscare nu este recomandată.

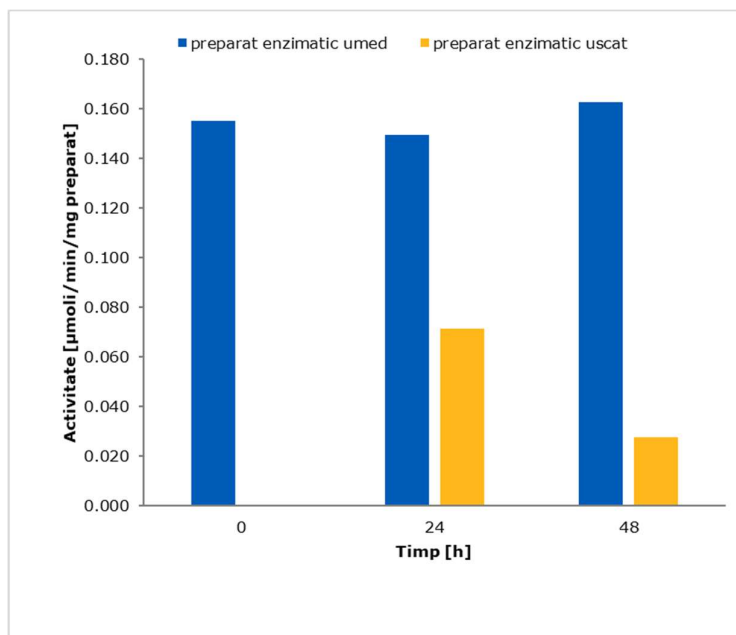


Figura 2.43. Variația în timp a activității lacazei imobilizate prin legare covalentă pe suport epoxi/butil, fără uscare (albastru) sau după uscare la temperatura de 25°C (galben)

2.5.1.6. Stabilitatea termică a lacazei native și a preparatului enzimatic obținut prin legare covalentă pe suport cu grupări epoxi/butil

Proprietățile catalitice îmbunătățite, cum ar fi termostabilitatea și termotoleranța, pot facilita aplicații noi și eficiente. O stabilitate termică ridicată este extrem de importantă pentru utilizarea biocatalizatorului în procese industriale. În plus, enzimele termostabile posedă de obicei o rezistență mai mare la expunere la substanțe chimice, alcalinitate ridicată sau aciditate extremă [218,219].

S-a studiat influența temperaturii asupra activității enzimei native și imobilizate după menținerea timp de 30 de minute la diferite valori de temperatură, în intervalul 25-50°C. După preincubare la temperatura stabilită, enzima nativă sau preparatul enzimatic imobilizat au fost aduse la temperatura de 25°C, iar determinarea activității enzimatic inițiale și a celei reziduale s-au realizat pentru reacția de oxidare a substratului model 2,6-dimetoxifenol.

După preincubare la temperatura de 25°C, activitatea lacazei native a scăzut cu 12% comparativ cu activitatea inițială. În intervalul 30-50°C activitatea a avut o tendință de scădere odată cu creșterea temperaturii, dar totuși la 50°C a fost regăsită peste 65% din activitatea inițială.

În intervalul 30-50°C, biocatalizatorul imobilizat și-a menținut activitatea, fiind observată chiar o creștere semnificativă în raport cu activitatea după preincubare la 25°C (Figura 2.44). În același timp, enzima nativă și-a pierdut aproximativ 30% din activitatea inițială în acest interval de temperatură. Preparatul enzimatic imobilizat prezintă o stabilitate superioară lacazei native, probabil datorită reducerii sau împiedicării apariției unor modificări conformaționale odată cu creșterea temperaturii [220].

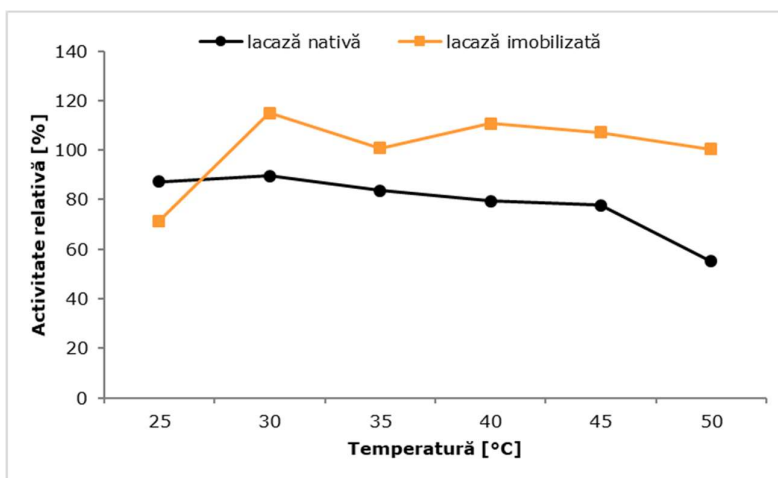


Figura 2.44. Termostabilitatea enzimei native și a preparatului enzimatic obținut prin legare covalentă pe suport epoxi/butil, determinată după preincubare timp de 30 de minute, la diferite temperaturi în intervalul 25-50°C

2.5.1.7. Oxidarea glucozei la acid glucaric

Ca o aplicație biocatalitică pentru lacază, s-a studiat oxidarea glucozei la acidul aldalic corespunzător, utilizând o cascadă enzimatică în două etape (Figura 2.45). Prima etapă a constat în oxidarea glucozei în prezența glucoxidazei (GOX Tip II din *Aspergillus niger*, EC 1.1.3.4) la acid gluconic, în prezența catalazei (EC 1.11.1.6) din ficat de bovină. În a doua etapă s-a realizat transformarea acidului gluconic la acid glucaric în cataliză enzimatică, utilizând sistemul TEMPO / lacază.

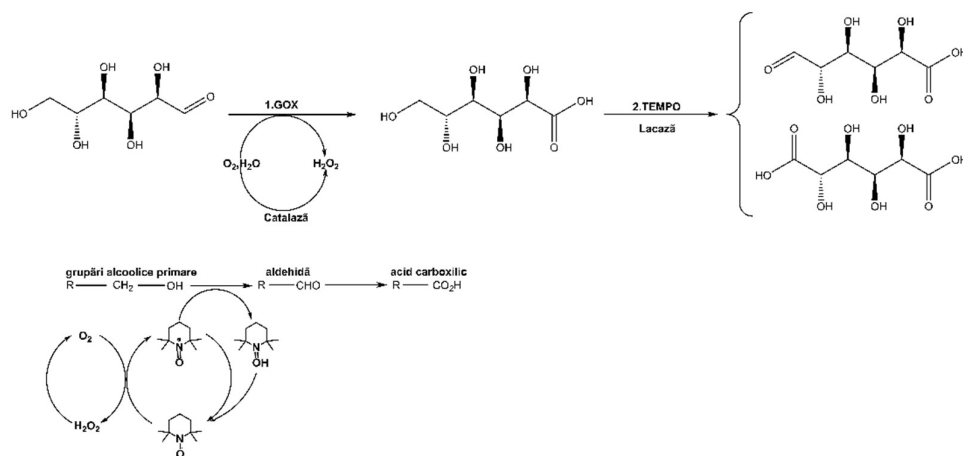


Figura 2.45. Schema de reacție pentru transformarea biocatalitică a glucozei la acid glucaric (1) oxidarea glucozei la acid gluconic folosind GOX/catalază și (2) oxidarea acidul gluconic la acidul glucuronic și acidul glucaric folosind sistemul TEMPO / lacază.

Detaliile mecanismului oxidărilor aerobe care utilizează lacază și un mediator sunt încă neelucidate. În general, se crede că acest mecanism implică o oxidare a electronilor mediatorului cu ajutorul formei oxidative (cuprică) a lacazei, urmată de reacția mediatorului oxidat cu substratul, sau prin transfer de electroni [221].

În prima etapă, oxidarea grupării aldehidice din poziția C-1 la acidul aldonic, conversia glucozei în acid gluconic a fost de 100% după 2 ore de reacție, la un raport optim dintre enzimă și substrat.

Conținutul de grupări aldehidice în probele luate la ore diferite, au fost determinate spectrofotometric, prin metoda descrisă de Jaušovec și colab. [222], introducând 0,2 ml amestec de reacție în tuburi de microcentrifugă de 2 ml, urmată de adăugarea a 0,4 ml de KOH (0,3 M) și 0,4 ml de clorură de 2,3,5-trifenil-tetrazoliu (TTC) (0,01 M), după care s-a agitat timp de 6 minute la 80°C într-un termomixer Eppendorf. Proba cu volum total de de 1 ml a fost amestecată cu 9 ml MeOH pentru a dizolva cristalele rosii de TTC (trifeniltetrazoliu formazan) formate, iar valorile absorbanțelor s-au citit la 482 nm [222].

Determinarea acidului gluconic s-a făcut prin HPLC cu detecție UV la 210 nm, folosind pentru analiza cantitativă o curbă de calibrare cu gluconat de Na.

Datorită selectivității oxidării, conversia acidului aldaric poate fi determinată pe baza consumului de NaOH, care este direct proporțional cu concentrația de acid aldaric format în mediul de reacție.

În cea de-a doua etapă, oxidarea acidului gluconic cu TEMPO și lacază, conversia acidului gluconic la acid glucuronic fost de 14% și la acid glucaric de 6%, după 24 de ore.

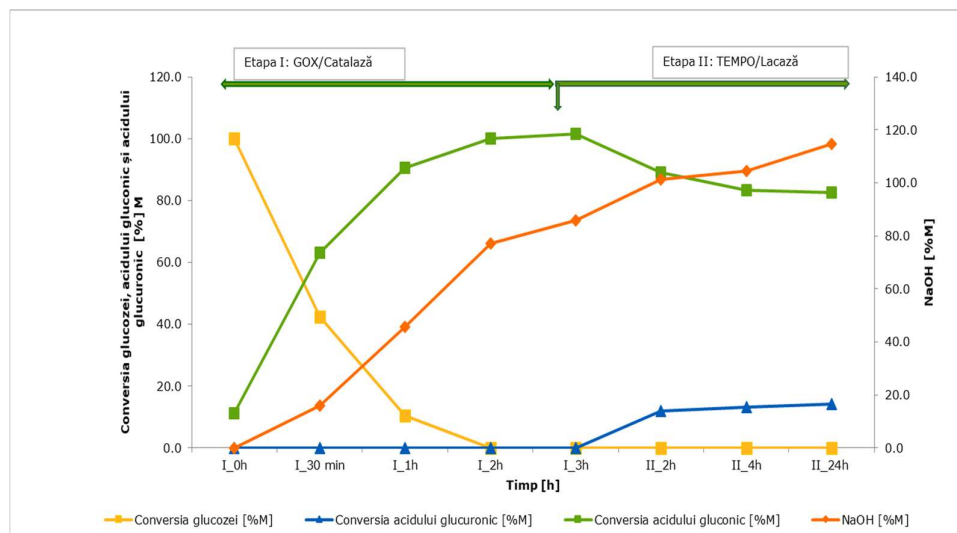


Figura 2.46. Conversia glucozei la acid gluconic (galben), formarea acidului gluconic /conversia acidului gluconic la acid glucuronic pe baza analizei HPLC (verde), consumul de NaOH utilizat pentru titrarea acizilor gluconic și glucaric prin mentinerea pH-ului la valoarea 5 (portocaliu) și formarea grupelor aldehidice corespunzătoare acidului glucuronic (albastru)

Din cromatogramele LC-MS (Figurile 2.47, 2.48) se poate observa că la timpul 0 al reacției amestecul de reacție conține doar glucoză și acid gluconic, în timp ce acidul glucaric nu este detectat, comparativ cu cromatograma de la 24 de ore unde se poate observa prezența acidului glucaric la timpul de retenție de 7,44 minute. Amestecul de reacție este foarte complex, datorită prezenței mai multor compuși cu structuri asemănătoare a căror separare și cuantificare este dificilă. Aceste experimente preliminare au demonstrat viabilitatea concepției utilizării sistemului bienzimatic în cascadă pentru sinteza biocatalitică a acidului glucaric, urmând ca experimentele să fie continuate pentru a stabili condițiile optime ale procesului.

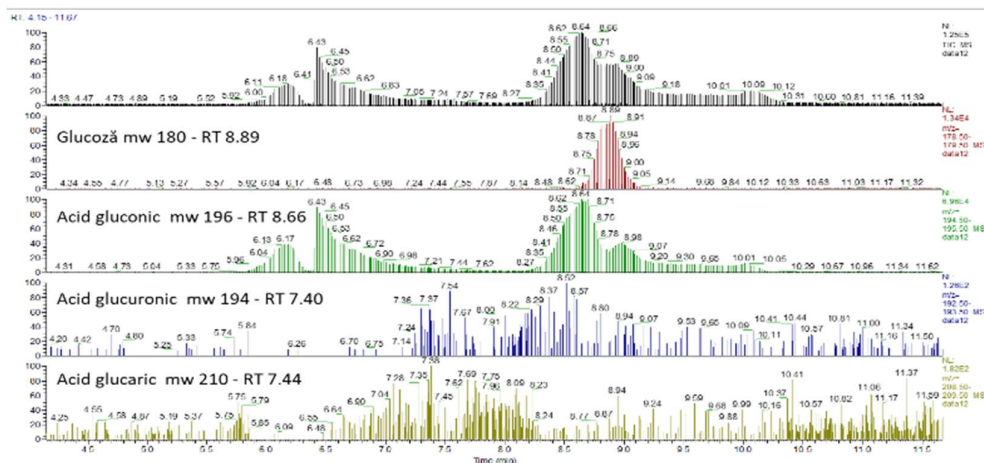


Figura 2.47. Cromatograme LC-MS pentru prima etapă din reacția de oxidare a glucozei la acid glucaric la timpul 0.

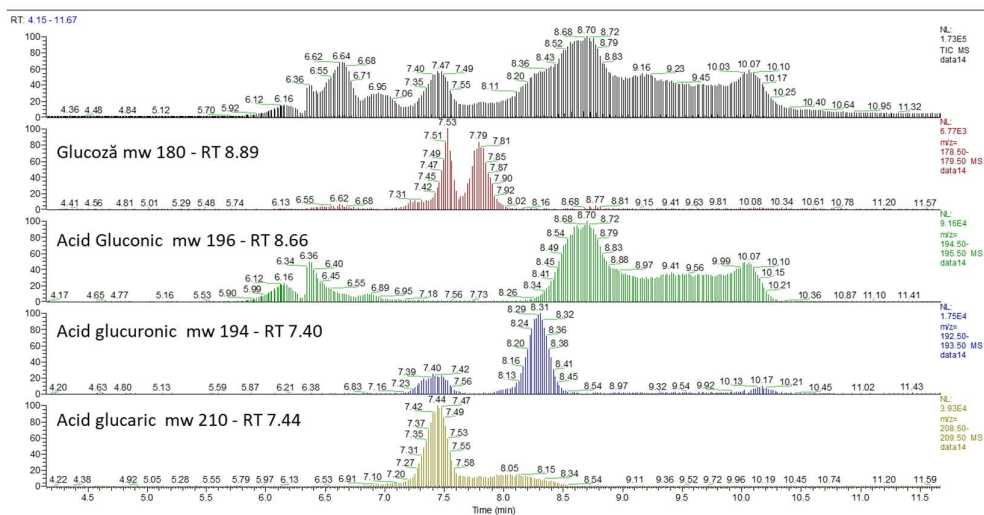


Figura 2.48. Cromatograme LC-MS pentru a doua etapă din reacția de oxidare a glucozei la acid glucaric, după 24h de reacție.

2.5.1.8. Concluzii

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

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

Cele mai mari valori ale activității enzimatice, 665 $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{g}$ preparat, s-au obținut în cazul legării covalente pe suportul cu grupări active epoxi/butil.

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

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

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

Lacaza s-a dovedit a fi un biocatalizator potrivit pentru sinteza acidului glucaric din glucoză într-un sistem bienzimatic în cascadă având ca intermediar acidul gluconic.

2.5.2. Utilizarea peroxidazei imobilizate pentru eliminarea unor coloranți din apă

În cadrul studiilor efectuate pentru obținerea unor noi biocatalizatori imobilizați din clasa oxidoreductazelor, s-a realizat imobilizarea și a unei alte enzime cu aplicații în diverse domenii, peroxidaza. Deși există mai multe studii privind imobilizarea peroxidazei din hrean, utilizarea suporturilor comerciale pe bază de polimetacrilat, cu grupări epoxidice active, nu a fost încă raportată. Comparativ cu multe alte materiale suport, aceste suporturi prezintă câteva avantaje importante cum ar fi: reproductibilitate, disponibilitate la scară largă și prețuri adecvate.

Scopul prezentului studiu a fost dezvoltarea unei metode de imobilizare covalentă a peroxidazei din hrean pe suporturi funcționalizate cu grupări epoxidice și utilizarea biocatalizatorilor rezultați pentru degradarea coloranților azoici industriali.

Efectele temperaturii și ale pH-ului asupra activității enzimei, precum și a stabilității operaționale au fost evaluate atât pentru peroxidaza nativă, cât și pentru cea imobilizată, folosind un substrat model. Influența concentrației de peroxid de hidrogen a fost de asemenea studiată. Rezultatele pot oferi noi oportunități pentru aplicarea enzimelor imobilizate în domeniul protecției mediului, prin degradarea eficientă oxidativă a coloranților reziduali.

2.5.2.1. Selectivitatea peroxidazei pentru coloranții azoici comerciali

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

Rezultatele obținute după 24 h de reacție, prezentate în Figura 2.49, indică faptul că la pH 3,5 conversiile au fost mai mici comparativ cu cele de la pH 6,0, cu excepția colorantului Neutral Gray. Astfel, la pH 6, cele mai mari valori ale conversiilor (până la 80%) au fost obținute pentru coloranții Amido Black 10 (AB10) și Acid Orange 7 (AO 7).

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

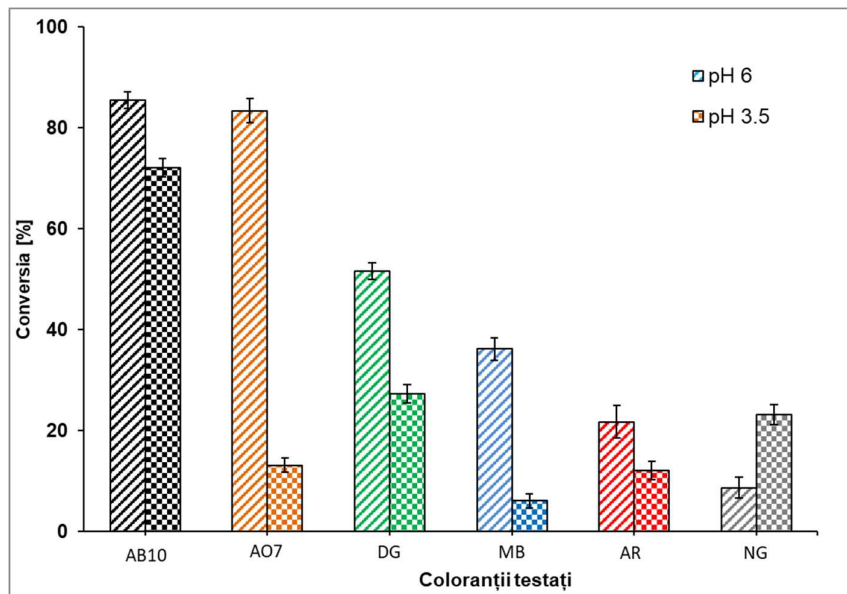


Figura 2.49. Evaluare comparativă a selectivității peroxidazei din hrean pentru degradarea a șase coloranți diferiți (AB 10 - Amido Black 10, AO7 - Acid Orange 7, DG - Direct green; MB - Methylene blue; AR - Acid red; NG - Neutral grey)

2.5.2.2. Efectul concentrației de apă oxigenată

Studii recente au arătat că în cazul reacțiilor oxidative de degradare a coloranților catalizate de peroxidază există un raport molar optim apă oxigenată/substrat. În aceste reacții apa oxigenată are rol de co-substrat.

Astfel, determinarea concentrației optime de apă oxigenată favorizează degradarea colorantului. La concentrații mai mici sau mai mari de apă oxigenată, valoarea conversiilor colorantului este afectată [171].

Cu toate acestea, s-a observat că adăugarea unui exces de apă oxigenată după ce conversia a atins o valoare optimă a favorizat procesul de degradare a coloranților. O posibilă explicație pentru acest fenomen ar putea fi faptul că adăugarea unui exces de H_2O_2 la începutul procesului duce la formarea unei cantități mai mari de produși intermediari care inhibă activitatea peroxidazei, sau chiar excesul de H_2O_2 poate inhiba activitatea enzimei [171].

Pentru determinarea efectului apei oxigenate au fost studiate trei concentrații. Rezultatele prezentate în Figura 2.50 arată că la concentrații mai mari de 1,43 mM nu au existat modificări ale activității, prin urmare, în studiile ulterioare, concentrația de H_2O_2 a fost stabilită la 1,43 mM.

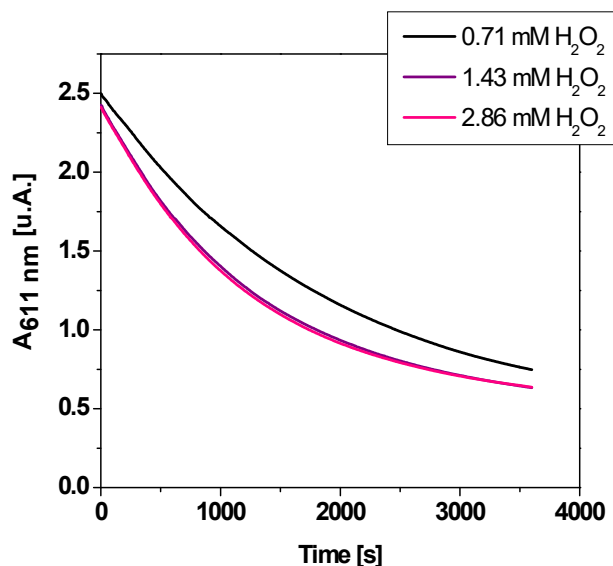


Figura 2.50. Efectul cantității de H₂O₂ asupra scăderii în timp a absorbăței la 611 nm, folosind ca substrat colorantul AB10

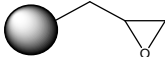
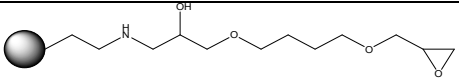
2.5.2.3. Imobilizarea peroxidazei folosind suporturile ReliZyme™

Interesul practic asupra peroxidazelor, ilustrat de numărul din ce în ce mai mare de publicații din ultimii ani, demonstrează că cercetarea pentru stabilizarea acestei enzime încă prezintă importanță științifică.

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

Au fost selectate două suporturi comerciale ReliZyme™, cu grupări epoxidice active și cu lungime și structură diferită a linker-ului. Imobilizarea s-a efectuat într-o singură etapă, prin amestecarea soluției de enzimă cu suportul timp de 24 ore. Activitatea peroxidazei imobilizate a fost determinată prin utilizarea ABTS ca substrat model, așa cum este descris în partea experimentală. Rezultatele prezentate în Tabelul 2.41 indică valori ridicate de încărcare cu proteine (> 90%), pentru ambele tipuri de suport. Activitatea specifică și reproductibilitatea au fost mai mari atunci când a fost utilizat suportul epoxi-amino HFA 403. Probabil, linker-ul mai lung (a se vedea structurile prezentate în Tabelul 2.41) permite o mai bună legare covalentă a enzimei de grupele epoxidice ale suportului. Cu toate acestea, luând în considerare eficiențele ridicate de imobilizare, studiile de caracterizare au fost efectuate pentru ambii biocatalizatori și rezultatele au fost comparate cu enzima nativă.

Tabelul 2.41. Încărcarea cu enzimă și activitatea regăsită a peroxidazei imobilizate pe suporturile epoxi-ReliZyme™

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

2.5.2.4. Caracterizarea comparativă a peroxidazei native și imobilizate

2.5.2.4.1. Effectul pH-ului asupra activității

pH-ul este unul dintre cei mai importanți parametri care influențează activitatea enzimelor, deoarece la valori extreme ale pH-ului activitatea poate fi inhibată [223]. De obicei, enzimele native prezintă activitate enzimatică într-un interval de pH relativ restrâns, iar acest neajuns poate fi depășit prin imobilizare [223, 224,225]. Imobilizarea poate genera o schimbare conformațională a enzimei, de aceea pH-ul optim pentru enzima nativă și imobilizată este de obicei diferit [223].

Reacțiile au fost efectuate la 25°C, în prezență de 1,43 mM H₂O₂, la 300 rpm timp de 30 de minute. Comparativ cu enzima nativă care a avut pH-ul optim 5, stabilitatea biocatalizatorului imobilizat a fost îmbunătățită pe întregul interval de pH testat Figura 2.51.

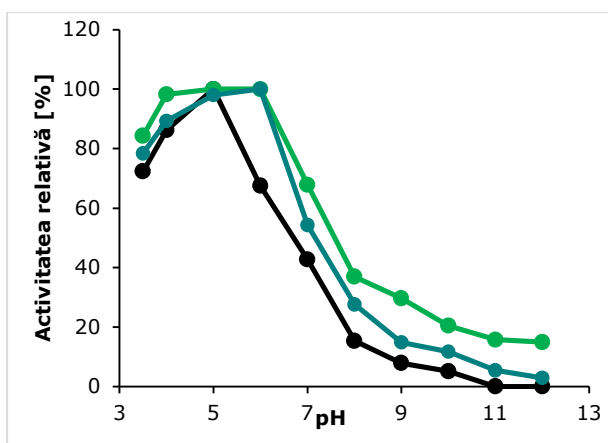


Figura 2.51. Effectul pH-ului asupra degradării colorantului Amido Black 10 de enzima nativă (culoare neagră) și peroxidaza imobilizată pe suporturile HFA 403 (culoare verde) și EP 403 (culoare turcoaz). Condiții de reacție: 25°C, 30 min, 1,43 mM H₂O₂, 300 rpm.

Cea mai mare activitate a fost obținută pentru biocatalizatorul peroxidază immobilizată pe suporturile HFA, în intervalul de pH 4-7.

O îmbunătățire a stabilității pH-ului peroxidazei după immobilizare a fost observată și de Bilal și colab., când alginatul de calciu a fost utilizat ca suport și glutaraldehida ca linker [226], precum și de Mohameda și colab. pe suport de lână activată [227].

2.5.2.4.2. Efectul temperaturii asupra stabilității peroxidazei immobilizate

Stabilitatea enzimelor scade odată cu creșterea temperaturii, enzima devenind inactivă la temperaturi ridicate, datorită modificării ireversibile a structurii terțiare. Mai multe studii au concluzionat că inactivarea termică poate fi limitată prin immobilizarea enzimelor [223], acest efect fiind demonstrat și de rezultatele prezentate anterior în această teză pentru lipazele immobilizate.

Pentru a evalua efectul temperaturii asupra activității enzimaticе, enzimele nativă și immobilizate au fost incubate timp de 1 h la 25°C, 35°C, 45°C și 55°C, în soluție tampon de pH 5,0, apoi au fost răcite la 25°C când s-a adăugat substratul. S-a folosit soluție de Amido Black (AB 10) ca substrat, iar testul s-a efectuat în prezență de 1,43 mM H₂O₂, timp de 30 minute la 300 rpm.

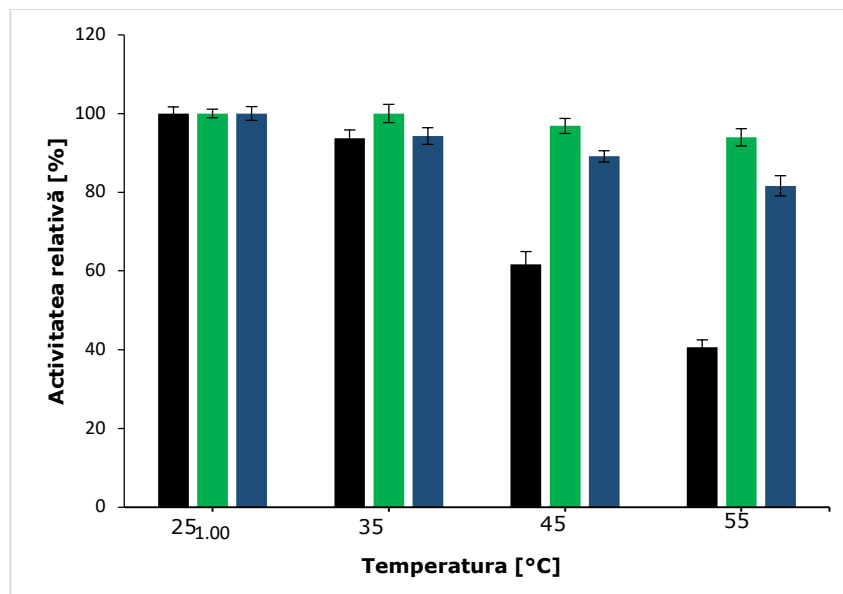


Figura 2.52. Stabilitatea termică a peroxidazei din hrean nativă (culoare neagră) și immobilizată (pe HFA 403, culoare verde; pe EP 403, culoare turcoaz). Degradarea colorantului Amido Black 10 s-a efectuat la 25°C, 30 min, 300 rpm, în prezență de 1,43 mM H₂O₂

Rezultatele din Figura 2.52 indică o pierdere de activitate de până la 60% pentru peroxidaza nativă odată cu creșterea temperaturii în intervalul studiat, în timp ce enzima imobilizată atât pe HFA 403 cât și pe EP 403 a demonstrat o termostabilitate excelentă. Dintre cele două preparate, peroxidaza imobilizată pe HFA 403 a prezentat o stabilitate termică superioară. Comparativ cu ~ 84% valoarea activității recuperate pentru decolorarea colorantului Acid Black după incubare la 55°C, raportată de Sun și colab., pentru peroxidaza imobilizată pe nanofire de ZnO / SiO₂ macroporos și etilenglicol diglicidil eter ca reticulant [188], valoarea de 93,8% obținută în acest studiu indică o stabilitate mai bună. Această îmbunătățire a stabilității termice prin imobilizare ar putea fi atribuită atașării multiple a peroxidazei de suportul reticulat, care poate îmbunătăți rigidizarea proteinei și o poate proteja împotriva denaturării [188].

2.5.2.4.3. Stabilitatea operațională a enzimei imobilizate

Creșterea stabilității operaționale a enzimelor, pentru a putea fi reutilizate în mai multe cicluri de reacție, este unul dintre obiectivele principale ale imobilizării. Cu condiția ca enzima imobilizată să nu își piardă activitatea chiar și după o perioadă operațională prelungită, ea poate fi folosită atât în procese continue, cât și discontinue, iar costurile devin mai mici [225]. Degradarea Amido Black 10 de peroxidaza imobilizată pe suporturi epoxidice-activate HFA-403 a fost studiată în cicluri repetate de reacție în sistem discontinuu, considerând activitatea primei reacții ca referință. După zece utilizări, activitatea relativă a rămas aproximativ 80% (Figura 2.53), o valoare excelentă pentru o enzimă care catalizează reacții în mediu apos.

Comparativ cu datele din literatura de specialitate referitoare la reutilizarea peroxidazei imobilizate prin diferite metode, prezentate comparativ în Tabelul 2.42, stabilitatea operațională a preparatului obținut în acest studiu a fost mai mare, ceea ce indică eficiența suportului de imobilizare selectat.

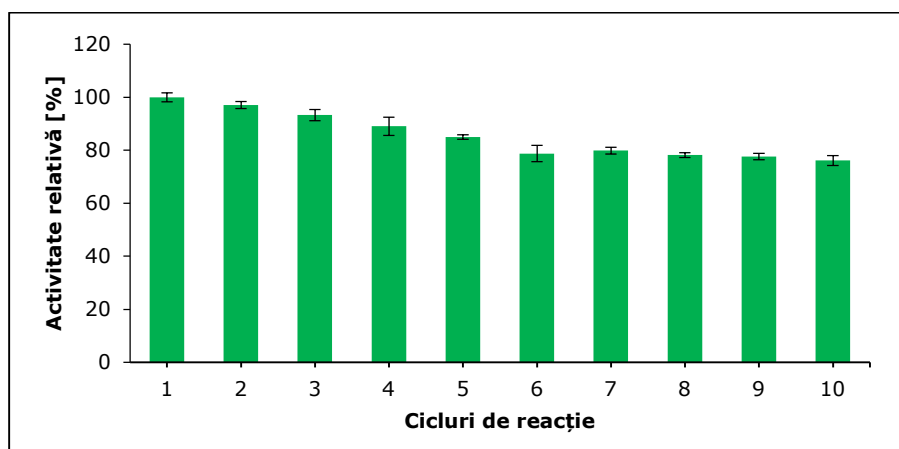


Figura 2.53. Stabilitatea peroxidazei imobilizate pe suport cu grupări epoxi HFA 403, în cicluri repetate a reacției de degradare a Amido Black 10 la 35°C, 30 min, 1,43 mM H₂O₂, 300 rpm.

Tabelul 2.42. Evaluarea comparativă a mai multor peroxidaze din hrean imobilizate, pe baza activităților regăsite după mai multe cicluri de reacție

| Metoda de Imobilizare | Suport | Agent de legare | Cicluri de reacție | Activitatea regăsită [%] | Ref. |
|-----------------------|-------------------|-----------------|--------------------|--------------------------|--------------|
| Încapsulare | chitosan | - | 6 | 64,9 | [228] |
| Legare covalentă | alginat de calciu | GA* | 7 | 40,0 | [226] |
| Legare covalentă | lână activată | | 7 | 50,0 | [227] |
| Legare covalentă | chitosan | hidrazină | 6 | 65,8 | [228] |
| Legare covalentă | gumă cashew | GA | 9 | 50,0 | [229] |
| Legare covalentă | nano-compozite | epoxi | 12 | 71,1 | [188] |
| Legare covalentă | ReliZyme™ HFA 403 | - | 10 | 76,1 | Acest studiu |

*glutaraldehidă

CONCLUZII

Peroxidaza din hrean a fost imobilizată cu succes prin legarea covalentă, pe două suporturi comerciale de tip ReliZyme™ care conțin grupări epoxidice active. Imobilizarea pe suportul HFA 403 s-a dovedit a fi mai avantajoasă, probabil datorită diferenței de lungime a linker-ilor celor două suporturi, permițând o legare mai avantajoasă.

Prin imobilizare, atât stabilitatea cât și activitatea enzimei au fost îmbunătățite pe un interval mai larg de pH, în special în intervalul de pH 5-6, valoarea uzuală a pH-ului apelor contaminate cu coloranți. În domeniul de pH bazic, activitatea enzimatică a scăzut semnificativ, dar chiar și la pH 11, enzima imobilizată era încă activă spre deosebire de enzima nativă care a fost complet inactivată.

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

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

3. Partea experimentală

3.1. Materiale

Pentru obținerea preparatelor enzimatiche imobilizate s-au utilizat: tetrametoxisilan TMOS 99% (Fluka), viniltrimetoxisilan VTMOs 97% (Merck), feniltrimetoxisilan PhTMOs 99% (Merck), octiltrimetoxisilan OcTMOs 99% (Merck), metiltrimetoxisilan MeTMOs (Merck) alcool izopropilic 99,7% (Merck), tampon TRIS-HCl tris-(hidroximetil)-aminoetan de pH=8,0, *n*-hexan 98% (Merck), Celite 545 (Merck). Lichidul ionic tetrafluorborat de 1-octil-3-metilimidazoliu OmimBF₄ a fost achiziționat de la Merck, florura de sodiu (Fluka), etanol (Sigma-Aldrich), izotiocianat de fluoresceina (FITC) (Sigma-Aldrich), glutaraldehidă 50%, reactiv Bradford, N,N-dimetilformamidă (Sigma Aldrich), Sephadex A-25 (Sigma Aldrich). Suporturile folosite la imobilizarea lacazei au fost oferite de compania Purolite (Anglia).

Enzimele utilizate au fost lipaza din *Pseudomonas fluorescens* Amano AK, *Burkholderia cepacia* Amano PS (Sigma-Aldrich) și *Candida antarctica* B (Cal B) (C-Lecta, Leipzig, Germania), *Candida antarctica* A (Cal A) (ChiralVision, Leiden, The Netherlands), lacaza din *Trametes versicolour*, glucozoxidaza Tip II din *Aspergillus niger*, catalaza din ficat de bovină (Sigma- Aldrich), peroxidaza din hrean folosită în procesul de imobilizare și ca enzimă nativă de referință a fost de asemenea cumpărată de la Merck.

În reacțiile de transesterificare s-au utilizat următorii reactivi: 2-hexanol (Fluka), 2-heptanol și 2-octanol (Merck), 1-feniletanol (Fluka) acetat de vinil (Merck), *n*-hexan 98% (Merck), decan >99% (Aldrich), dodecan 99% (Merck), acetonitril, toluen, acetona, tetrahidrofuran, terț-butanol, izooctan (Merck). Agitator orbital MIR S-100 Sanyo E&E (Japonia) și incubator POL EKO-CLN 115 STD.

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

În reacțiile de oxidare catalizate de lacază s-au folosit: 2,6-dimetoxifenol (99% Sigma Aldrich), acid acetic glacial, acetat de sodiu anhidru, acid acetic, fosfat de sodiu achiziționate de la Chimopar Bucuresti, clorura de 2,3,5-trifenil-tetrazoliu (TTC), TEMPO, glucoză, sarea de sodiu a acidului D-gluconic, sarea de sodiu a acidului D-gluconic and sarea de potasiu a acidului gluclaric (Sigma-Aldrich), NaOH (Sigma Aldrich).

Coloranții Amido Black 10 B (AB10), Orange Acid (AO7), Red Acid (AR), Green Direct (DG), Blue Methylene (MB), Neutral Gray (NG) au fost achiziționați de la Merck (Germania) și Loba-Feinchemie (Austria).

Fosfații mono-, di și trisodic (utilizat pentru prepararea soluțiilor tampon), apa oxigenată 35%, acid citric, acid boric, 2,2'-azino-di (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonat) (ABTS) au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germania).

Ambele suporturi comerciale utilizate pentru imobilizarea covalentă a peroxidazei au fost produse ale Resindion Srl (Italia), o filială a Mitsubishi Chemical: ReliZyme™ HFA 403 și ReliZyme™ EP 403 (suportul de polimetacrilat cu grupări active oxirani, care diferă în funcție de lungimea și structura spacerului cu grupări epoxidice minim 30 μmol/g umed, diametrul mediu al porilor 40÷60 nm).

Aparatura utilizată a inclus: termomixer confort Eppendorf (Germania), agitator orbital MIR-S100 (Sanyo, Japonia), spectrofotometru Agilent Technologies

Cary 60 UV-VIS (SUA), cromatograf de lichide HPLC JASCO (Japonia), spectrofotometru FT-IR Bruker Vertex 70 (Bruker Daltonik, Germania), LC-MS, analizor termogravimetric TG 209 F1 Libra (Netzsch, Germania), microscop Leica True Confocal Scanner (Leica TCS SPE, Republica Cehă), microscop electronic cu scanare Inspect S +EDAX Genesis XM 2i system (FEI Company, Olanda), microscop de forță atomică Nanosurf® EasyScan 2 Advanced Research AFM (SUA).

3.2. Metode

3.2.1. Imobilizare prin entrapare în sol-gel (Metoda SGE-1)

S-a preparat o soluție de lipază (120 mg/mL tampon TRIS-HCl de pH=8,0), s-a lăsat la agitare (600 rpm) timp de 30 minute, după care soluția rezultată a fost centrifugată la 15°C și 5000 rpm timp de 10 min, iar supernatantul a fost folosit pentru imobilizare.

Într-o fiolă de sticlă de 4 mL s-au introdus 1 mL supernatant de lipază, 200 μ L lichid ionic [OmimBF₄], 100 μ L soluție fluorură de sodiu 1 M și 200 μ L alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menținut 30 minute pe agitatorul magnetic pentru omogenizare, după care s-au introdus precursorii silanici (6 mmoli) în diferite rapoarte molare, cu menținerea agitării până la gelificare. Gelul obținut a fost păstrat la temperatura camerei timp de 24 de ore, pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost spălat cu 7 mL alcool izopropilic, 5 mL apă distilată, 5 mL alcool izopropilic și 5 mL *n*-hexan, după care s-a filtrat pe frită. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei timp de 24 de ore și la etuva de vid încă de 24 ore. Cantitățile de preparate care au fost obținute sunt prezentate în Tabelele 3.1-3.3.

Tabel 3.1. Rezultate obținute la imobilizarea enzimei Amano AK prin entrapare în sol-gel.

| Cod | Cantitatea de enzimă introdusă la imobilizare [mg] | Silani precursori | Aditiv | Cantitatea de preparat obținut [mg] |
|--------|--|--------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| AK 1_1 | 111,8 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | OminBF ₄ | 850,6 |
| AK 2_1 | 111,8 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | OminBF ₄ | 598,4 |
| AK 3_1 | 111,8 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | OminBF ₄ | 511,4 |

Tabel 3.2. Rezultate obținute la imobilizarea enzimei Amano PS prin entrapare în sol-gel.

| Cod | Cantitatea de enzimă introdusă la imobilizare [mg] | Silani precursori | Aditiv | Cantitatea de preparat obținut [mg] |
|--------|--|--------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| PS 1_1 | 21,6 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | OminBF ₄ | 564,2 |
| PS 2_1 | 21,6 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | OminBF ₄ | 602,2 |
| PS 3_1 | 21,6 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | OminBF ₄ | 502,7 |

Tabel 3.3. Rezultate obținute la imobilizarea enzimei Cal A prin entrapare în sol-gel.

| Cod | Cantitatea de enzimă introdusă la imobilizare [mg] | Silani precursori | Aditiv | Cantitatea de preparat obținut [mg] |
|----------|--|---------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| Cal A1_1 | 120,0 | OcTMOS:TMOS 1:1 | OminBF ₄ | 700,3 |
| Cal A2_1 | 120,0 | PHTMOS:TMOS 1:1 | OminBF ₄ | 711,2 |
| Cal A3_1 | 120,0 | VTMOS:TMOS 1:1 | OminBF ₄ | 619,2 |
| Cal A4_1 | 120,0 | PhTMOS:MeTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | OminBF ₄ | 654,7 |
| Cal A5_1 | 120,0 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | OminBF ₄ | 676,3 |

3.2.2. Imobilizare prin entrapare în sol-gel cu sol prepolimer (Metoda SGE-2)

Într-o fiolă de sticlă de 4 mL s-au introdus 1 mL supernatant de lipază Cal A așa cum este descris în metoda (**SGE-1**), 200 μL lichid ionic [OminBF₄]. Amestecul obținut a fost agitat magnetic timp de 30 min. Într-o a doua fiolă de 4 mL s-au adăugat silanii precursori (6 mmoli în total) și 0,5 mL etanol, amestecându-se timp de 30 min la temperatura camerei. Ulterior cele două soluții au fost reunite și agitate magnetic până când a avut loc gelifierea. Gelul obținut a fost păstrat la temperatura camerei timp de 24 de ore pentru o polimerizare completă. După uscare gelul a fost spălat și uscat așa cum este descris în metoda (**SGE-1**). Cantitățile obținute din fiecare preparat sunt prezentate în Tabelul 3.4.

Tabel 3.4. Rezultate obținute la imobilizarea enzimei Cal A prin entrapare în sol-gel (metoda prepolimer) **SGE-2**.

| Cod | Cantitatea de enzima introdusă la imobilizare [mg] | Silani precursori | Aditiv | Cantitatea de preparat obținut [mg] |
|----------|--|---------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| Cal A1_2 | 120,0 | OcTMOS:TMOS 1:1 | OminBF ₄ | 273,2 |
| Cal A2_2 | 120,0 | PHTMOS:TMOS 1:1 | OminBF ₄ | 96,9 |
| Cal A3_2 | 120,0 | VTMOS:TMOS 1:1 | OminBF ₄ | 185,7 |
| Cal A4_2 | 120,0 | PhTMOS:MeTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | OminBF ₄ | 270,8 |
| Cal A5_2 | 120,0 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | OminBF ₄ | 280,0 |

3.2.3. Imobilizare prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite 545 (Metoda SGE-A)

S-a preparat o soluție de lipază (120 mg/mL tampon TRIS-HCl de pH=8,0), s-a lăsat la agitare (600 rpm) timp de 30 minute, după care s-a centrifugat la 15°C și 5000 rpm timp de 10 min, iar supernatantul a fost folosit pentru imobilizare.

Tabel 3.5. Rezultate obținute la imobilizarea enzimei Amano AK prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (SGE-A)

| Cod | Cantitatea de enzimă introdusă la imobilizare [mg] | Silani precursori | Aditiv | Cantitatea de preparat obținut [mg] |
|---------|--|--------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| AK 4_A | 112,4 | VTMOS:TMOS 1:1 | OminBF ₄ | 437,7 |
| AK 5_A | 112,4 | VTMOS:TMOS 2:1 | OminBF ₄ | 463,8 |
| AK 6_A | 112,4 | VTMOS:TMOS 3:1 | OminBF ₄ | 466,1 |
| AK 7_A | 112,4 | VTMOS:TMOS 4:1 | OminBF ₄ | 476,9 |
| AK 8_A | 112,4 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | OminBF ₄ | 1035,4 |
| AK 9_A | 112,4 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | OminBF ₄ | 1108,7 |
| AK 10_A | 112,4 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | OminBF ₄ | 974,4 |

Tabel 3.6. Rezultate obținute la imobilizarea enzimei Amano PS prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție (SGE-A)

| Cod | Cantitatea de enzimă introdusă la imobilizare [mg] | Silani precursori | Aditiv | Cantitatea de preparat obținut [mg] |
|---------|--|--------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| PS 4_A | 26,0 | VTMOS:TMOS 1:1 | OminBF ₄ | 295,0 |
| PS 5_A | 26,0 | VTMOS:TMOS 2:1 | OminBF ₄ | 440,5 |
| PS 6_A | 26,0 | VTMOS:TMOS 3:1 | OminBF ₄ | 458,7 |
| PS 7_A | 26,0 | VTMOS:TMOS 4:1 | OminBF ₄ | 468,7 |
| PS 8_A | 26,0 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 1:1:1 | OminBF ₄ | 1043,0 |
| PS 9_A | 26,0 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 1,6:0,4:1 | OminBF ₄ | 1080,3 |
| PS 10_A | 26,0 | PhTMOS:VTMOS:TMOS 0,4:1,6:1 | OminBF ₄ | 865,9 |

Într-o fiolă de sticlă de 4 mL s-au introdus 1 mL supernatant de lipază, 200 μ L lichid ionic [OminBF₄], 100 μ L soluție florură de sodiu 1 M și 200 μ L alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menținut 30 minute pe agitatorul magnetic pentru

omogenizare, după care s-au introdus precursorii silanici (6 mmoli în total) cu menținerea agitării până la gelifiere, moment în care s-au adăugat 0,5 g Celite 545. Gelul obținut a fost păstrat la temperatura camerei timp de 24 de ore, pentru o polimerizare completă. Gelul întărit a fost spălat cu 7 mL alcool izopropilic, 5 mL apă distilată, 5 mL alcool izopropilic și 5 mL *n*-hexan, după care s-a filtrat pe frită. Produsul obținut s-a uscat la temperatura camerei 24 de ore și la etuva de vid timp de 24 ore. Cantitățile de preparate obținute sunt prezentate în tabelele 3.5 și 3.6.

3.2.4. Imobilizare covalentă a lacazei pe diferite suporturi

3.2.4.1. Imobilizare prin legare covalentă folosind suporturi funcționalizate cu grupări epoxi și epoxi/butil

Pentru aceste imobilizări au fost utilizate protocoalele de imobilizare furnizate de compania Purolite, care a oferit și suporturile respective. Imobilizarea lacazei prin legare covalentă pe suporturi cu grupări epoxi a fost realizată astfel: s-a spălat suportul cu o soluție tampon acetat pH=5,0 care s-a folosit la imobilizare (raport suport: soluție tampon de 1:1 [w/v]), procesul de spălare s-a repetat de 3 ori și s-a filtrat pe o frită de sticlă.

S-a preparat o soluție de enzimă în tampon acetat de pH 5,0 la un raport suport:soluție tampon de 1:4 [w/v] și s-a adăugat suportul echilibrat. Amestecul s-a incubat la 25°C și 250 rpm timp de 22 h. S-a oprit agitarea și s-a lasat în repaus pentru încă 24 h când s-a realizat spălarea preparatului obținut. Spălarea a constat în: filtrarea fazei lichide și colectarea acesteia pentru determinarea ulterioară a conținutului de proteine și spălarea preparatului enzimatic obținut. Procesul de spălare s-a repetat de 3 ori. S-a făcut o spălare adițională (pentru o desorbție completă a proteinelor nelegate covalent) cu o soluție tampon acetat de pH 5,0 + NaCl 0,5M. Preparatul s-a păstrat în frigider la 2-8°C.

S-au folosit 2 tipuri de suporturi și s-au obținut 8 preparate enzimatice (Tabelul 3.7 și Tabelul 3.8).

Tabel 3.7. Rezultate obținute la imobilizarea lacazei din *Trametes versicolour* prin legare covalentă folosind suporturi cu grupări epoxi metacrilat.

| Cod | Cantitatea de enzimă introdusă la imobilizare [mg] | Suport solid ECR 8204F epoxi metacrilat [mg] | Cantitatea de preparat obținut [mg] |
|-------------------------------|--|--|-------------------------------------|
| 0,5 mg proteină/100 mg suport | 14,7 | 103,6 | 106,0 |
| 1 mg proteină/ 50 mg suport | 29,6 | 100,4 | 98,0 |
| 2,5 mg proteină/ 50 mg suport | 75,3 | 100,0 | 102,0 |
| 5 mg proteină/ 50 mg suport | 74,9 | 50,4 | 57,6 |

Tabel 3.8. Rezultate obținute la imobilizarea lacazei din *Trametes versicolour* prin legare covalentă folosind suporturi cu grupări epoxi/butil metacrilat.

| Cod | Cantitatea de enzimă introdusă la imobilizare [mg] | Suport solid ECR 8285 epoxi butil-metacrilat [mg] | Cantitatea de preparat obținut [mg] |
|-------------------------------|--|---|-------------------------------------|
| 0,5 mg proteină/100 mg suport | 14,4 | 102,3 | 99,3 |
| 1 mg proteină/ 50 mg suport | 14,8 | 50,6 | 47,0 |
| 2,5 mg proteină/ 50 mg suport | 37,5 | 50,7 | 49,8 |
| 5 mg proteină/ 50 mg suport | 74,8 | 50,6 | 55,2 |

3.2.4.2. Imobilizare prin legare covalentă folosind suporturi funcționalizate cu grupări amino

S-a utilizat de asemenea protocolul de imobilizare al companiei Purolite. Imobilizarea lacazei prin legare covalentă pe suporturi cu grupări amino a fost realizată astfel: s-a spălat suportul cu o soluție tampon acetat pH=5,0 care s-a folosit la imobilizare (raport suport: soluție tampon de 1:1 [w/v]), procesul de spălare s-a repetat de 3 ori și s-a filtrat pe frită de sticlă. Suportul spălat s-a activat folosind tampon acetat pH=5,0 ce conține 2% glutaraldehidă, la un raport suport:tampon acetat cu 2% glutaraldehidă de 1/4 [w/v]. Amestecul obținut s-a lăsat la agitare timp de 1 h la 25 ° C.

S-a preparat o soluție de enzimă în tampon acetat de pH 5,0 la un raport suport : soluție tampon de 1:4 [w/v] și s-a adăugat suportul echilibrat. Amestecul s-a incubat la 25°C și 250 rpm timp de 22 h. S-a oprit agitatea și s-a lăsat în repaus pentru încă 24 h când s-a realizat spălarea preparatului obținut. Spălarea a constat în: filtrarea fazei lichide și colectarea acesteia pentru determinarea ulterioară a conținutului de proteine și spălarea preparatului enzimatic obținut. Procesul de spălare s-a repetat de 3 ori. S-a făcut o spălare adițională (pentru o desorbție completă a proteinelor nelegate covalent) cu o soluție tampon acetat de pH 5,0 + NaCl 0,5M, preparatul se păstrează în frigider la 2-8°C.

Prin această metodă s-au obținut 4 preparate enzimaticice (Tabelul 3.9).

Tabel 3.9. Rezultate obținute la imobilizarea lacazei din *Trametes versicolour* prin legare covalentă folosind suporturi cu grupări amino C2 metacrilat.

| Cod | Cantitatea de enzima introdusă la imobilizare [mg] | Suport solid ECR 8309F amino C2 metacrilat [mg] | Cantitatea de preparat obținut [mg] |
|-------------------------------|--|---|-------------------------------------|
| 0,5 mg proteină/100 mg suport | 14,7 | 100,6 | 94,7 |
| 1 mg proteină/ 50 mg suport | 15,2 | 50,3 | 47,1 |
| 2,5 mg proteină/ 50 mg suport | 37,7 | 50,9 | 50,1 |
| 5 mg proteină/ 50 mg suport | 74,4 | 50,6 | 62,6 |

3.2.5. Imobilizarea lacazei prin adsorbție pe diferite suporturi

Protocolul de imobilizare a fost furnizat și pentru aceste suporturi de compania Purolite. Imobilizarea lacazei prin adsorbție a fost realizată astfel: s-a spălat suportul folosit la imobilizare cu o soluție tampon acetat pH=5,0 care s-a folosit la imobilizare (raport suport: soluție tampon de 1:1 [w/v]), procesul de spălare s-a repetat de 3 ori și s-a filtrat pe frită de sticlă.

S-a preparat o soluție de enzimă în tampon acetat de pH 5,0 la un raport suport : soluție tampon de 1:4 [w/v] și s-a adăugat suportul echilibrat. Amestecul s-a incubat la 25°C și 250 rpm timp de 22 h. S-a oprit agitarea și s-a lăsat în repaus pentru încă 24 h după care s-a realizat spălarea preparatului obținut. Spălarea a constat în: filtrarea fazei lichide și colectarea acesteia pentru determinarea ulterioară a conținutului de proteine și spălarea preparatului enzimatic obținut. Procesul de spălare s-a repetat de 3 ori, după care preparatele enzimatic obținute s-au păstrat în frigider la 2-8°C.

Prin această metodă s-au obținut 12 preparate enzimatic (s-au folosit 3 suporturi), cantitățile de preparate imobilizate obținute fiind prezentate în Tabelele 3.10-3.12.

Tabel 3.10. Rezultate obținute la imobilizarea lacazei din *Trametes versicolour* prin adsorbție folosind suporturi cu grupări octadecil metacrilat.

| Cod | Cantitatea de enzimă introdusă la imobilizare [mg] | Suport solid ECR 8806F adsorbție [mg] | Cantitatea de preparat obținut [mg] |
|-------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 0,5 mg proteină/100 mg suport | 14,5 | 103,0 | 94,5 |
| 1 mg proteină/ 50 mg suport | 14,9 | 50,8 | 46,8 |
| 2,5 mg proteină/ 50 mg suport | 37,5 | 51,4 | 57,8 |
| 5 mg proteină/ 50 mg suport | 74,3 | 50,7 | 65,1 |

Tabel 3.11. Rezultate obținute la imobilizarea lacazei din *Trametes versicolour* prin adsorbție folosind suporturi cu grupări DVB/metacrilat.

| Cod | Cantitatea de enzimă introdusă la imobilizare [mg] | Suport solid ECR 1030 M adsorbție [mg] | Cantitatea de preparat obținut [mg] |
|-------------------------------|--|--|-------------------------------------|
| 0,5 mg proteină/100 mg suport | 14,8 | 100,6 | 93,1 |
| 1 mg proteină/ 50 mg suport | 14,8 | 50,6 | 47,4 |
| 2,5 mg proteină/ 50 mg suport | 37,3 | 50,2 | 50,3 |
| 5 mg proteină/ 50 mg suport | 74,1 | 50,7 | 53,7 |

Tabel 3.12. Rezultate obținute la imobilizarea lacazei din *Trametes versicolour* prin adsorbție folosind suporturi cu grupări stiren macroporos.

| Cod | Cantitatea de enzimă introdusă la imobilizare [mg] | Suport solid ECR 1090 M adsorbție [mg] | Cantitatea de preparat obținut [mg] |
|-------------------------------|--|--|-------------------------------------|
| 0,5 mg proteină/100 mg suport | 14,7 | 100,7 | 109,0 |
| 1 mg proteină/ 50 mg suport | 15,0 | 50,4 | 60,0 |
| 2,5 mg proteină/ 50 mg suport | 37,5 | 50,5 | 58,0 |
| 5 mg proteină/ 50 mg suport | 74,7 | 50,4 | 72,0 |

3.2.6. Imobilizarea prin legare covalentă pe suporturi epoxidice a peroxidazei din hrean

S-au adăugat 900 μ L soluție de peroxidază (1,5 mg/mL) în 50 mM tampon fosfat de pH 6,5 la 100 mg suport cu grupari epoxi activat. Amestecul a fost incubat timp de 24 de ore la 1000 rpm și 25°C. Peroxidaza imobilizată a fost separată prin filtrare. La sfârșitul imobilizării, preparatul enzimatic a fost spălat de 3 ori cu 20 mM tampon fosfat, pH 6,5 și păstrat la 4°C până la utilizarea ulterioară.

3.2.6. Determinarea conținutului de proteină utilizând metoda Bradford

Principiul metodei

Determinarea proteinelor într-o soluție (domeniul 0,1-1 mg/mL, folosind BSA-albumină serică de bovină ca standard) se bazează pe formarea unui complex în urma reacției proteinei din soluție cu reactivul de culoare Coomassie Brilliant Blue G-250. Maximul de absorbție al complexului proteină-Brilliant Blue G este la 595 nm.

Reactivi și soluții

1. Reactiv Bradford: se amestecă 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 cu 50 mL EtOH 95%, 100 mL H₃PO₄ 85% și se aduce la semn la 1 L în balon cotaț cu apă distilată.
2. Soluție etalon de albumină serică de bovină (BSA) în apă distilată (1 mg/mL).

Mod de lucru pentru realizarea curbei de etalonare prin Metoda Bradford

Se iau cote parte din soluția stoc de BSA (1 mg/mL) și se completează cu apă distilată la un volum final de 0,2 mL. Se iau câte 25 μ L din aceste soluții și se introduc în cuvele corespunzătoare, adăugându-se apoi 750 μ L reactiv Bradford. Probele astfel obținute sunt menținute la temperatura camerei timp de 15 minute, apoi se citește extincția la 595 nm față de un martor obținut în aceleași condiții, dar cu înlocuirea

soluției de BSA cu apă distilată. Pentru siguranța determinării, probele au fost realizate în duplicat. S-au trasat curbele de etalonare și s-au determinat parametrii care au fost folosiți la calcularea cantităților de proteină din probele necunoscute (Tabelul 3.13).

Tabel 3.13. Parametrii a și b ai dreptei de etalonare folosite în studiile de determinare a cantității de proteine.

| Nr.crt. | Standard | a | b |
|---------|---|--------|--------|
| 1. | Soluție etalon de albumină serică de bovină (BSA) | 0,9048 | 0,0415 |
| 2. | Soluție etalon de albumină serică de bovină (BSA) | 1,0529 | 0,0597 |

1 - parametri utilizați pentru determinarea cantităților de proteină în urma imobilizării pentru preparatelor cu lipază,
2 - parametri utilizați pentru determinarea cantităților de proteină în urma imobilizării pentru preparatelor cu lacaze.

3.2.7. Determinarea activității lacazei native și a lacazelor imobilizate în reacția de oxidare a 2,6-dimetoxifenolului.

3.2.7.1. Determinarea activității lacazei native

Într-o cuvă s-au pipetat 0,25 mL 2,6-DMP (4mM), 0,75 mL soluție tampon pH 5,0 și 0,1 mL soluție lacază (1mg/mL), după care s-a citit absorbanta la 469 nm și s-a determinat activitatea. Reacțiile s-au efectuat în duplicat, iar citirea s-a făcut față de blanc (blanc = 0,85 mL soluție tampon pH 5,0 și 0,25 mL 2,6 DMP, 4 mM).

3.2.7.2. Determinarea activității lacazei imobilizate

Într-un Eppendorf de 2 mL s-au cântărit aproximativ 12 mg preparat enzimatic, peste preparat s-au pipetat 0,5 mL soluție tampon pH 5,0 și 0,5 mL 2,6 DMP (4 mM), amestecul de reacție a fost incubat timp de 4 min la 25°C, după care amestecul de reacție s-a filtrat și s-a citit absorbanta la 469 nm, reacțiile s-au făcut în duplicat iar citirea s-a făcut față de blanc (blanc = 0,5 mL soluție tampon pH 5,0 și 0,5 mL 2,6 DMP, 4 mM).

$$A_{enzimatică} = \frac{A \cdot 1000}{27,5 \cdot \text{timp} \cdot m_{enzimă}} \left[\frac{\mu\text{moli}_{\text{produs}}}{\text{min} \cdot \text{g}} \right]$$

unde:

A = absorbanta

27,5 = coeficientul molar de extincție al 2,6-dimetoxifenolului [mM]

timp = timpul de reacție [min]

$m_{enzimă}$ = cantitate de biocatalizator utilizat în reacție [g]

3.2.8. Efectul pH-ului asupra lacazei native și immobilizate prin legare covalentă

Intervalul de pH pentru care a fost studiat efectul acestuia asupra activității lacazei native și immobilizate a fost 1,8-7. Testarea activității catalitice în intervalul de pH 1,8-7 s-a realizat pentru reacția de oxidare a substratului model 2,6-dimetoxifenol, la temperatura camerei, atât pentru enzima nativă cât și pentru cea immobilizată. Condițiile de reacție sunt descrise în subcapitolul 3.2.7.

3.2.9. Efectul uscării asupra preparatului enzimatic obținut prin legare covalentă

Uscarea preparatului a avut loc la temperatura de 25°C în etuvă timp de 24 și 48 de h.

Testarea proprietăților catalitice a preparatului enzimatic după uscare s-a realizat pentru reacția de oxidare a substratului model 2,6-dimetoxifenol. Condițiile de reacție sunt descrise în subcapitolul 3.2.7.2.

3.2.10. Efectul temperaturii asupra enzimei native și a preparatului enzimatic obținut prin legare covalentă

Enzimei nativă și cea immobilizată au fost preincubate timp de 30 de minute la diferite temperaturi, în intervalul 25-50°C, după care fost aduse la temperatura camerei. Determinarea activității enzimatice inițiale și a celei reziduale de după preincubare s-au realizat pentru reacția de oxidare a substratului model 2,6-dimetoxifenol. Condițiile de reacție sunt descrise în subcapitolul 3.2.7.

3.2.11. Reacții de rezoluție cinetică enzimatică ai alcoolilor secundari

Într-o fiolă de sticlă de 4 mL s-au introdus 0,5 mmoli alcool secundar (2-hexanol, 2-heptanol sau 2-octanol), 1,5 mmoli acetat de vinil, 1 mL solvent organic (n-hexan) și 15 μL *n*-decan sau *n*-dodecan (standard intern pentru analiza gaz-cromatografică). La momentul zero al reacției s-a introdus 25 mg preparat enzimatic obținut prin entrapare în sol-gel. Fiola de sticlă conținând amestecul de reacție a fost plasată într-o incintă termostată la 40°C și supusă agitării la 250 rpm.

Reacția a fost urmărită în timp, prin prelevare de probe la 24 de ore de reacție. Pe baza analizelor efectuate, prin metoda standardului intern s-au calculat conversia alcoolului, masa de ester formată, activitatea de transesterificare a preparatului immobilizat și randamentul de regăsire a activității enzimatice după 24 de ore de reacție.

Pentru a determina activitatea de transesterificare a enzimei libere s-a efectuat o sinteză în aceleași condiții, în care s-au utilizat 5 mg lipază nativă.

- *conversia alcoolului* la momentul *t* al reacției:

$$\text{conversia \%} = \frac{m_{\text{alc},0} - m_{\text{alc},t}}{m_{\text{alc},0}} \cdot 100$$

unde $m_{\text{alc},0}$ este cantitatea de alcool de alcool introdusă în reacție [mg]
 $m_{\text{alc},t}$ este cantitatea de alcool de alcool rămasă nereacționată după timpul t [mg]

- *activitatea de transesterificare:*

$$A_{\text{transesterificare}} = \frac{\mu\text{mol}_{\text{ester format}}}{24 \cdot m}$$

unde

24 - timpul de reacție

m - cantitatea de enzimă introdusă ca și catalizator [mg]

- *randamentul de regăsire a activității enzimaticice totale la 24 de ore:*

$$\eta_{\text{regăsire a activității}} \% = \frac{A_{\text{enz.imob}} \cdot m_1}{A_{\text{enz.imob}} \cdot m_2} \cdot 100$$

unde

m_1 = cantitatea enzimei obținută după imobilizare [mg]

m_2 = cantitatea enzimei supusă imobilizării [mg]

$A_{\text{enz.imob.}}$ = activitatea de transesterificare a enzimei imobilizate

$A_{\text{enz.liberă}}$ = activitatea de transesterificare a enzimei libere.

Pe baza datelor din literatură [77], s-a presupus că lipazele utilizate 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 din cromatograma pe fază staționară chirală, folosind relația.

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

3.2.12. Analiza cantitativă prin cromatografie de gaze

Gaz cromatografia este considerată o metodă dinamică de separare a amestecurilor de gaze (sau vaporilor), principiul metodei bazându-se pe distribuția diferită a compușilor unui amestec la deplasarea fazei mobile gazoase printr-o fază staționară [230].

Determinarea concentrației componentelor analizați se poate face prin mai multe metode, cea mai bună fiind cea a standardului intern. Un standard intern în chimia analitică este o substanță chimică ce se adaugă într-o cantitate constantă atât în probă cât și în blank. Această substanță standard se utilizează pentru obținerea unei drepte de etalonare, prin reprezentarea grafică a raportului dintre semnalul analitului și semnalul standardului intern, ca funcție a raportului concentrațiilor, dreaptă ce duce la obținere parametrilor a și b . Standardul trebuie să prezinte un comportament cromatografic similar analitului. Raportul dintre semnalul analitului și cel al standardului intern din probă se folosește pentru determinarea concentrației analitului, folosind parametrul a și b obținuți la trasarea dreptei de etalonare.

Ecuția dreptei de etalonare :

$$y=ax+b$$

permite calcularea parametrilor a și b .

Concentrația analitului care se găsește în probă se calculează cu relația:

$$c_x = \left(\frac{A_x}{A_{st}} - b \right) \cdot \frac{c_{st}}{a} \cdot 100 \quad [\%]$$

unde:

a = panta dreptei de etalonare,

b = ordonata la origine a acestei drepte,

c_{st} = cantitatea (sau concentrația) de standard introdusă în amestecul de analizat.

Mod de lucru pentru determinarea parametrilor a și b :

În șase fiole cromatografice s-au cântărit cu exactitate volume diferite de 2-hexanol, 2-heptanol, 2-octanol, 1-feniletanol, intervalul cantităților au fost alese astfel încât să cuprindă concentrațiile din domeniul reacției urmărite. Ca și standard intern sau folosit n -dodecan și decan, solventul folosit a fost n -hexan (1 mL în fiecare sticlucă). Probele au fost analizate gaz-cromatografic și s-a reprezentat grafic dependența dintre raportul de arii și raportul maselor compusului și standardului. Valorile parametrilor de etalonare sunt prezentați în Tabelele 3.14-3.16. Deoarece analizele au fost realizate în diferite perioade de timp și proprietățile coloanei au suferit modificări, aceste valori sunt diferite, chiar pentru același compus și același standard.

Tabel 3.14. Parametrii a și b ai dreptelor de etalonare folosiți în calculul activității inițiale a biocatalizatorilor obținuți folosind enzimele Cal B, Amano AK, Amano PS.

| Nr.crt | Compus etalon | Standard intern | a | b |
|--------|---------------|-----------------|--------|---------|
| 1 | 2-hexanol | n -dodecan | 0.7254 | -0.0936 |
| 2 | 2-heptanol | decan | 0.7537 | -0.0355 |
| 3 | 2-octanol | decan | 0.7651 | -0.0585 |

Tabel 3.15. Parametrii a și b ai dreptelor de etalonare folosiți în calculul activității de transesterificare a biocatalizatorilor obținuți folosind lipaza Cal A*, a stabilității termice și a stabilității în solvenți organici ai biocatalizatorilor obținuți folosind enzimele Cal B, Amano AK, Amano PS.

| Nr.crt | Compus etalon | Standard intern | a | b |
|--------|-------------------|-----------------|--------|---------|
| 1 | 2-hexanol | n -dodecan | 0.71 | -0.0136 |
| 2 | 2-heptanol | decan | 0.6514 | 0.1563 |
| 3 | 2-octanol | decan | 0.7199 | 0.0577 |
| 4* | 2-octanol | decan | 0.7859 | -0.011 |
| 5* | Acetat de 2-octil | decan | 0.6916 | 0.0301 |

Tabel 3.16. Parametrii a și b ai dreptelor de etalonare folosiți în studiile în sistem continuu.

| Nr.crt | Compus etalon | Standard intern | a | b |
|--------|-------------------|-----------------|--------|---------|
| 1 | 2-octanol | decan | 0.7859 | -0.011 |
| 2 | 2-octanol | decan | 0.9006 | 1.3352 |
| 3 | Acetat de 2-octil | decan | 0.6916 | 0.0301 |
| 4 | 1-feniletanol | n-dodecan | 0.9039 | -0.0661 |

3.2.13. Stabilitatea în solvenți organici a lipazelor din Amano AK, Amano PS și Cal B

Într-o fiolă de sticlă de 4 mL s-au introdus 1 mL solvent organic (*n*-hexan, izo-octan, toluen, tetrahidrofuran, terț-butanol, acetonă, acetonitril) și 5 mg lipază nativă sau 25 mg preparat enzimatic obținut prin entrapare în sol-gel sau obținut prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție. Fiola de sticlă a fost plasată apoi într-o incintă termostată la 25°C, timp de o săptămână. După aceea, solventul organic a fost îndepărtat cu ajutorul unei micropipete. Enzima nativă sau preparatul enzimatic rămase în fiolă au fost spălate cu 2 mL *n*-hexan și centrifugate la 15°C și 5000 rpm. După decantarea solventului, peste lipaza nativă sau preparatul enzimatic s-au introdus 0,5 mmoli alcool secundar, 1,5 mmoli acetat de vinil, 1 mL *n*-hexan și 15 μL (standard intern), iar amestecul rezultat a fost introdus într-o incintă termostată la 40°C timp de 24h. Pe baza analizelor gaz-cromatografice efectuate, s-au calculat prin metoda standardului intern conversia alcoolului, masa de ester, activitatea preparatelor imobilizate, activitatea relativă raportată la reacția inițială, excesul enantiomeric al produsului (e.e_p) și raportul enantiomeric (E).

3.2.14. Stabilitatea termică a lipazelor native și imobilizate

Într-o fiolă de sticlă de 4 mL s-au introdus 5 mg lipază nativă sau 25 mg preparat enzimatic (obținut prin entrapare în sol-gel SGE-1 sau prin entrapare combinată cu adsorbție SGE-A) și 1 mL solvent organic (*n*-hexan), după care aceasta a fost plasată într-o incintă termostată, fiind menținută 24 h la diferite temperaturi (40°C, 50°C, 60°C, 70°C). Dacă solventul a fost izooctan, enzimele au fost menținute 5 zile la 80°C. După răcire la temperatura camerei s-au introdus 0,5 mmoli alcool secundar și 1,5 mmoli acetat de vinil. Fiola de sticlă conținând amestecul de reacție a fost plasată într-o incintă termostată la 40°C și supusă agitării la 200 rpm. Reacția a fost oprită după 24 de ore.

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

3.2.15. Reutilizarea lipazelor native și imobilizate în reacții de transesterificare

Studiul de reutilizare a fost realizat la 40°C. Reacția inițială a fost descrisă la subcapitolul 3.2.11. La finalul fiecărei reacții, după 24 de ore, faza lichidă ce conținea produsul a fost îndepărtată folosind o pipetă, iar faza solidă rămasă (lipaza nativă sau

imobilizată) a fost spălată de două ori cu *n*-hexan (2 mL), centrifugată la 15°C, 5000 rpm, iar supernatantul decantat. Ulterior, s-a adăugat aceeași cantitate de reactivi (2-hexanol, acetat de vinil și *n*-hexan) ca și în cazul primei reacții pentru a reutiliza enzima nativă sau preparatul enzimatic, în aceleași condiții.

3.2.16. Acilarea 2-octanolului și a 1-feniletanolului cu acetat de vinil în mediu de *n*-hexan, în sistem continuu

Lipaza Cal B imobilizată prin tehnica sol-gel, 1063 mg pentru 2-octanol (rac-1), respectiv 1278 mg atunci când s-a folosit ca substrat 1-feniletanol (rac-2) a fost introdusă într-o coloană din oțel inoxidabil (150 x 4,6 mm). Înainte de a introduce biocatalizatorul în coloană, coloana a fost spălată cu apă, etanol, *n*-hexan și acetonă. Reacția de acilare a rac-1 cu acetat de vinil a fost realizată folosind o soluție ce conține rac-1 de diferite concentrații, în intervalul 0,05-1,25 M și acetat de vinil, la diferite raporte molare 1:1, 1:3 sau 1:5, în *n*-hexan ca mediu de reacție. Amestecul de reacție a fost pompat prin coloana umplută cu lipază imobilizată la diferite valori de temperatură (40, 50 și 60°C), la un debit setat în intervalul 0,1 -1,25 mL/min.

Reacția de acilare a rac-2 cu acetat de vinil a fost realizată folosind aceeași metodologie experimentală. Soluția conținând rac-2 la o concentrație în intervalul 0,05 - 1,25 M și acetat de vinil (la un raport molar 1:3) în *n*-hexan a fost pompată prin coloana umplută cu lipază la diferite temperaturi (40,50 și 60°C) la un debit în intervalul 0,3 -1,5 mL/min. În ambele cazuri s-au colectat probe la intervale specifice de timp și au fost supuse analizei gas cromatografice.

3.3. Metode de analiză

3.3.1 Microscopia electronică de scanare – SEM

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

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

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

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

Imaginile SEM au fost înregistrate folosind tehnica microscopiei electronice de scanare (SEM), pe un microscop electronic de baleiaj Inspect S + Edax Genesis XM 2i (FEI Company - Olanda). Parametri folosiți au fost: presiune 1.5×10^{-2} Pa, rezoluție < 10 nm la 3kV.

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 stat (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 μ A s-a început scanarea (baleierea). Zonele de interes au fost aduse la magnificația corespunzătoare obținându-se astfel imaginile SEM.

3.3.2 Microscopia de fluorescență - FITC

Marcarea cu compuși fluorescenți se poate folosi la modificarea proteinelor, acizilor nucleici și a altor molecule. Acești compuși conțin grupări care oferă direct sau indirect detectabilitate sensibilă pe baza unor substanțe chimice intrinseci sau proprietăți atomice cum ar fi fluorescența, chemiluminescența, absorbția, radioactivitatea sau afinitatea față de o altă biomoleculă.

Marcarea cu grupări fluorescente poate oferi sensibilitate ridicată din cauza proprietăților lor de emisie a luminii la excitație. Proteine, acizi nucleici și alte molecule pot fi marcate cu grupări fluorescente pentru a obține reactivi foarte sensibili pentru numeroase proceduri în vitro [231].

Fluorescein izotiocianatul (FITC) este unul dintre cei mai utilizați compuși fluorocromici pentru modificarea proteinelor și altor biomolecule.

Pentru această determinare s-au folosit: lipaza din *Pseudomonas fluorescens* Amano AK, 5(6)-izotiocianat de fluoresceină (Fluka), soluție tampon TRIS pH= 8,0, N,N-dimetilformamidă (Sigma Aldrich), Sephadex A-25 (Sigma Aldrich), microscop cu fluorescență Leica True Confocal Scanner (Leica TCS SPE).

Modul de lucru

Cantitatea de proteine din probă a fost determinată prin metoda Bradford. Reacția de cuplare s-a realizat într-un flacon de sticlă prin incubarea a 7 mL soluție de lipază (10,04 mg proteină/mL) și 1439,3 μ L soluție FITC, timp de o oră la temperatura camerei (conform PIERCE EZ-Label™ FITC Labelling Kit). Reacția s-a realizat la întuneric, sub folie de aluminiu.

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

$$\eta_{\text{FITC}} = V \cdot c \cdot 24 \cdot \frac{1}{M} \text{ [mmoli FITC]}$$

unde:

η_{FITC} – numărul de mmoli de FITC necesari;

V – volumul soluției enzimaticice [mL];
 c – concentrația soluției enzimaticice [mg/mL];
 24 – excesul molar al FITC;
 M – masa moleculară a proteinei [mg/mmol].

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

$$V_{\text{FITC}} = n \cdot M \cdot 100 \text{ } [\mu\text{L}]$$

unde:

V_{FITC} – volumul soluției de FITC [μL];
 n – numărul de mmoli de FITC [mmoli];
 M – masa moleculară a FITC [mg/mmol];
 100 – volumul de DMF [μL] utilizat pentru a dizolva 1 mg FITC.

Separarea moleculelor de FITC libere de cele legate de proteină s-a realizat folosind concentratoare de proteine - filtre centrifugale pentru concentrarea proteinelor CENTRICON Plus-20. Astfel amestecul rezultat după incubarea timp de 1 oră la temperatura camerei, la întuneric, a fost introdus în fiola de concentrare, s-a adăgat 5 mL apă distilată și apoi a fost supus centrifugării la 6000 rpm timp de 10 min. Lichidul de la partea inferioară a concentratorului a fost îndepărtat și s-a citit absorbanta la 493 nm (unde FITC prezintă un maxim de absorbție). S-a repetat operația de spălare a moleculelor FITC nelegate de proteină de încă 4 ori până la scăderea valorii absorbantei citite la 493 nm sub 1.

Soluția complexului FITC-lipază rezultată după îndepărtarea completă a moleculelor FITC rămase libere s-a folosit la imobilizare prin metodele descrise la subcapitolul 3.2.1. Imaginile fluorescente ale preparatelor obținute au fost înregistrate cu ajutorul microscopului cu fluorescență Leika True Confocal Scanner (Leika TCS SPE, Cehia).

3.3.3. Spectroscopia FT-IR

Spectrele (FTIR) ale probelor au fost obținute în modul de atenuarea totală a reflecției (ATR). Aparat: spectrofotometru Bruker Vertex 70 (Bruker Daltonik GmbH, Germany) echipat cu Platinum ATR, Bruker Diamond Type A225/Q. Spectrele au fost colectate în intervalul 4.000-400 cm^{-1} cu rezoluție de 4 cm^{-1} și 60 scanări/min.

3.3.4. Microscopia de forță atomică– AFM

Topografia preparatelor sol-gel au fost realizate folosind un instrument Nanosurf® EasyScan 2 Advanced AFM. Probele au fost mojarate cu *n*-hexan și după mojarare au fost depuse pe plăci din sticlă de siliciu și uscate la temperatura camerei.

Imaginile bidimensionale (2D) și tridimensionale (3D) au fost înregistrate în modul de contact cantilever, suprafața de scanare a fost 1 μm x 1 μm . Rezultatele AFM sunt cantitative în toate cele 3 dimensiuni, metoda de afișare se face prin mapare color; în culori de gri, tonurile întunecate și luminoase reprezintă caracteristicile înalte și joase. Parametrii rugozității cuprind rugozitatea medie a suprafeței (S_a , nm), înălțimea maximă a picului (S_p nm), adâncimea maximă a văii (S_v , nm) și au fost calculați folosind softul Nanosurf EasyScan 2.

3.3.5. Analiza termică – TG

Măsurătorile termogravimetrice (TGA/DTA) au fost înregistrate folosind un instrument TG 209 F1 Libra thermogravimetric analyser (Netzsch, Germania). Condițiile de operare au fost rezoluția 0,1 μg , atmosferă de azot. Curbele termogravimetrice au fost înregistrate în intervalul de temperatură 30 - 1000°C, încălzirea s-a făcut cu 10°C/min, masa medie a probelor a fost de $7,0 \pm 0,1$ mg, într-un creuzet de aluminiu deschis (masa medie $190 \pm 1,0$ mg).

3.4. Oxidarea glucozei la acid glucaric

Prima etapă constă în oxidarea glucozei la acid gluconic care a fost efectuată la 30°C la un pH controlat de 5. Volumul a fost de 10 ml conținând 2,4 mmol glucoză, 1380 U glucozoxidază și 6250 U catalază.

Conversia glucozei a fost determinată prin cuantificarea acidului gluconic format prin cromatografie de lichide de înaltă performanță și utilizând o metodă colorimetrică prin care s-a determinat concentrația de glucoză transformată.

În a doua etapă are loc oxidarea grupării -OH al carbonului C6 al acidului aldonic la carboxil, care a fost de asemenea efectuată la temperatura de 30°C la pH controlat de 5.

În același amestec de reacție s-a adăugat lacază 50 U și TEMPO 10% din concentrația glucozei, reacția are loc în prezență de oxigen. pH-ul a fost menținut la valoarea de 5 prin adăugarea de NaOH 1 M.

3.5. Utilizarea peroxidazei imobilizate pentru eliminarea unor coloranți din apă

3.5.1. Determinarea activității peroxidazei utilizând ABTS

Activitatea peroxidazei imobilizate a fost testată folosind ABTS ca substrat [232]. S-au adăugat 20 μL soluție nativă de peroxidază (1 mg/mL) sau 10 mg peroxidază imobilizată la 100 μL de 3 mM ABTS, urmată de adăugarea a 1498 μL soluție tampon citrat-fosfat pH 5 și 40 μL H_2O_2 . Absorbanța a fost măsurată la 414 nm, după 5 minute de incubare la 25°C, utilizând un spectrofotometru Jasco V-530 UV/VIS (JASCO, Japonia).

3.5.2. Efectul concentrației de apă oxigenată

Influența concentrației de co-substrat (H_2O_2) a fost studiată în intervalul 0,21-2,86 mM folosind AB10 ca substrat. Scăderea absorbanței la 611 nm a fost măsurată continuu timp de 3500 s la 25°C, folosind un spectrofotometru Jasco V-530 UV/VIS.

3.5.3. Profilul de pH al peroxidazei imobilizate

Efectul pH-ului asupra activității peroxidazei imobilizate (5 mg/ml) a fost investigat în intervalul de pH 4,0-12,0, folosind o soluție tampon care conține acid citric, acid boric și fosfat trisodic [233]. Profilul de pH al peroxidazei native (20 μL , 1

mg/mL) a fost determinat în aceleași condiții, ca referința. Testul de activitate a fost efectuat așa cum este descris în secțiunea anterioară.

3.5.4. Degradarea coloranților azoici de către peroxidaza imobilizată

Șase coloranți diferiți au fost utilizați pentru a determina procentul de decolorare ulterior oxidării cu peroxidază imobilizată la două valori de pH, 3,5 și 6. Soluțiile de colorant au fost la o concentrație de 10 mg/mL și experimentele au fost efectuate la valori diferite ale pH-ului soluțiilor tampon (1 ml soluție tampon) la temperatura camerei după 3 h, 12 h și, respectiv, 24 h. Scăderea absorbanței a fost monitorizată prin utilizarea unui spectrofotometru Jasco V-530 UV / VIS.

3.5.5. Efectul temperaturii asupra activității peroxidazei imobilizate

Enzima nativă (20 μ L enzimă nativă 1 mg/mL), imobilizată (5 mg / mL) a fost incubată timp de 2 ore în soluție tampon de pH 5,0 în absența substratului, la diferite temperaturi, în intervalul de la 25°C la 55°C, urmată de răcire pe gheață timp de 10 minute și apoi s-a adăugat substratul AB10, iar scăderea absorbăției a fost monitorizată prin utilizarea unui spectrofotometru Jasco V-530 UV / VIS după 30 min.

3.5.6. Utilizarea repetată a biocatalizatorului

Activitatea peroxidazei imobilizate a fost determinată și după utilizarea repetată la 30°C timp de 2 ore în soluție tampon de pH 5, cu Amido Black 10 ca substrat. După fiecare ciclu, enzima imobilizată a fost separată prin filtrare și spălată de trei ori cu tampon fosfat de 50 mM pH 6,5. Un nou ciclu de reacție a fost efectuat prin adăugarea aceleiași cantități de tampon și substrat. Procentul de decolorare obținut cu biocatalizatorul reutilizat a fost determinat așa cum s-a descris anterior, iar valoarea rezultată a fost comparată cu primul ciclu (stabilit la 100%).

4. Concluzii generale și contribuții originale

În urma studiilor efectuate au rezultat următoarele concluzii:

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

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

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

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

Pentru metoda combinată au fost testate și sisteme binare de silani precursori. În cazul sistemelor binare pentru biocatalizatori cu Amano AK și Amano PS cele mai bune valori ale activității s-au obținut la un raport molar VTMO5:TMOS de 4:1 și 3:1, adică un conținut mai ridicat de grupări vinilice.

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

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

Lipaza Cal A a fost imobilizată prin două metode sol-gel (SGE-1 și SGE-2). Cele mai bune valori ale activității de transesterificare s-au obținut pentru metoda SGE-1 pentru toate substraturile studiate. În ceea ce privește enantioselectivitatea s-a observat că lipaza nativă are o enantioselectivitate redusă, dar prin imobilizare folosind metoda SGE-2 s-au obținut biocatalizatori care discriminează eficient enantiomerii prezenți în amestecul racemic.

În urma analizei SEM s-a observat că morfologia biocatalizatorilor este diferită pentru fiecare metodă de imobilizare.

În cazul metodei SGE-1, indiferent de raportul molar al silanilor precursori, preparatele au o structură poroasă (uneori mai compactă) de tip microcanal care permit accesul substratului la centrul activ al enzimei.

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

Pentru biocatalizatorii obținuți prin entrapare în sol-gel urmată de adsorbția pe un suport solid (Celite 545) se poate observa că particulele de xerogel sunt formate atât pe suprafața suportului solid cât și în interiorul porilor.

Analiza FITC a demonstrat că enzima este distribuită atât la suprafață cât și în interiorul xerogelului. Lipazele marcate sunt distribuite în întreaga matrice, sugerând o uniformitate a enzimei în preparatele imobilizate.

Analiza FT-IR a confirmat că toți precursorii au fost incluși în matricea sol-gel.

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

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

Curbele DTG ale preparatelor cu lipază din *Candida antarctica* B și *Pseudomonas fluorescens* arată că maximum vitezei de descompunere termică a fost deplasat spre temperaturi mai ridicate pentru preparatele imobilizate în comparație cu enzima nativă, ceea ce indică o protejare mai bună împotriva temperaturii ridicate după imobilizare.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

e. Optimizarea rezoluției cinetice enzimatiche în sistem continuu a 2-octanolului și a 1-feniletanolului folosind programul experimental factorial

În urma aplicării programului experimental factorial pentru substrat-urile, 2-octanol și 1-feniletanol, s-au optimizat parametrii care influențează rezoluția cinetică în sistem continuu.

Prin metodologia suprafeței de răspuns (RSM), bazat pe cele mai mari valori ale lui E și ee_p , au fost stabiliți parametrii optimi de reacție pentru procesul de rezoluție cinetică.

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

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

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

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

Cele mai mari valori ale activității enzimatice, 665 $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{g}$ preparat, s-au obținut în cazul legării covalente pe suportul cu grupări active epoxi/butil.

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

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

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

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

h. Utilizarea peroxidazei imobilizate pentru eliminarea unor coloranți din apă

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

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

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

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

Contribuții originale

Creșterea stabilității lipazelor în procese de rezoluție cinetică prin imobilizare în matrici de sol-gel conținând grupări vinilice.

1. Stabilizarea lipazei din *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) prin imobilizare folosind două metode diferite (SGE-1, SGE-A).
2. Stabilizarea lipazei din *Burkholderia cepacia* (Amano PS) prin imobilizare folosind două metode diferite (SGE-1, SGE-A).
3. Stabilizarea lipazei din *Candida antarctica* B (Cal B) prin imobilizare folosind o metodă (SGE-A).
4. Stabilizarea lipazei din *Candida antarctica* A (Cal A) prin imobilizare folosind două metode diferite (SGE-1, SGE-2).

Caracterizarea biocatalizatorilor obținuți cu lipaze prin diverse tehnici/metode

5. Utilizarea tehnicilor SEM, FITC, FT-IR, AFM, TG, DTG pentru caracterizarea preparatelor enzimatic.
6. Demonstrarea creșterii/ menținerii stabilității operaționale a preparatelor cu lipaze în solvenți organici.
7. Demonstrarea stabilității operaționale a preparatelor enzimatic obținute la temperaturii ridicate.
8. Demonstrarea stabilității operaționale a preparatelor în mai multe cicluri de reacție.

Optimizarea rezoluției cinetice enzimatică în sistem continuu folosind un program experimental factorial.

9. Realizarea în sistem continuu a reacției de transesterificare a 2-octanolului și a 1-feniletanolului cu acetat de vinil folosind unul din preparatele obținute în urma imobilizării prin metoda SGE-1.

Creșterea stabilității lacazei din *Trametes versicolor* prin imobilizare – determinarea efectului raportului enzimă/suport asupra activității catalitice a lacazei imobilizate

10. Stabilizarea lacazei din *Trametes versicolor* prin imobilizare covalentă folosind trei suporturi diferite.
11. Stabilizarea lacazei din *Trametes versicolor* prin imobilizare prin adsorbție folosind 3 suporturi diferite.

Caracterizarea biocatalizatorului obținut cu lacază - imobilizare prin legare covalentă

12. Demonstrarea creșterii stabilității lacazei imobilizate prin legare covalentă pe suport cu grupări epoxi/butil la valori mai mari ale pH-ului.

13. Demonstrarea influenței conținutului de apă al preparatului enzimatic obținut prin legare covalentă pe un suport cu grupări epoxi/butil asupra activității preparatului.
14. Îmbunătățirea stabilității termice a preparatului enzimatic obținut prin legare covalentă pe suport cu grupări epoxi/butil în comparație cu cea a enzimei native.

Contribuțiile originale ale tezei au fost diseminate în 3 articole publicate în reviste de specialitate cotate ISI, 3 articole publicate în reviste de specialitate indexate în baze de date internaționale (BDI) și 11 lucrări științifice publicate în volumele unor manifestări științifice.

5. Bibliografie

- [1] K. Kakaei, M. D. Esrafil, A. Ehsani, Chapter 1 - Introduction to Catalysis, în: C. Chen (Editor), *Interface Science and Technology* (Prima ediție), Academic Press, New York, **2018**, 27, 1-21.
- [2] P. N. Devine, R. M. Howard, R. Kumar, M. P. Thompson, M. D. Truppo, and N. J. Turner, Extending the application of biocatalysis to meet the challenges of drug development, *Nat. Rev. Chem.*, **2018**, 2, 409-421.
- [3] <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry> accesat 19.05.2019.
- [4] R.V. Muralidhar, R. Marchant and P. Nigam, Lipases in racemic resolutions, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2001**, 76:3-8.
- [5] J. Chapman, A. E. Ismail and C. Zoica Dinu, Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances Techniques and Outlooks, *Catalysts*, **2018**, 8, 238.
- [6] L. Tamborini, P. Fernandes, F. Paradisi, and F. Molinari, Flow Bioreactors as Complementary Tools for Biocatalytic Process Intensification, *Trends Biotechnol.*, **2018**, 36(1), 73-88.
- [7] L. Lange, V. Parmar, A. Meyer, Biocatalysis, în: M. A. Abraham (Editor), *Encyclopedia of Sustainable Technologies* (Prima ediție), Elsevier, Oxford, **2017**, 663-673.
- [8] G. Rothenberg, Introduction, în: G. Rothenberg (Editor), *Catalysis: Concepts and Green Applications* (Ediția a-2-a), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2008**, 1, 1-35.
- [9] N. J. Turner, R. Kumar Biocatalysis and biotransformation: The golden age of biocatalysis, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2018**, 43:A1-A3.
- [10] C. P. S. Badenhorst, U. T. Bornscheuer, Getting Momentum: From Biocatalysis to Advanced Synthetic Biology, *Cell Press*, **2018** (article in press)
- [11] I. Schomburg, A. Chang, O. Hofmann, C. Ebeling, F. Ehrentreich and D. Schomburg, BRENDA: a resource for enzyme data and metabolic information, *Trends Biochem. Sci.*, **2002**, 27(1), 54-56.
- [12] S. M. Cuesta, S. A. Rahman, N. Furnham and J. M. Thornton, The Classification and evolution of enzyme function, *Biophys. J.*, **2015**, 109, 1082-1086.
- [13] A. Dalkiran, A. S. Rifaioglu, M. J. Martin, R. Cetin-Atalay, V. Atalay and T. Doğan, ECPred: a tool for the prediction of the enzymatic functions of protein sequences based on the EC nomenclature, *BMC Bioinformatics*, **2018**, 19:334.

- [14] A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts & B. Witholt, Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature*, **2001**, 402, 258-268.
- [15] T. D. H. Bugg, All Enzymes Are Proteins, în: T. D. H. Bugg (Editor), Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry (Ediția a-3-a), John Wiley & Sons, Ltd., New York, **2012**, 2, 7-25.
- [16] L. L. J. Kingsley, M. A. Lill, Substrate tunnels in enzymes: structure-function relationships and computational methodology, *Proteins*, **2015**, 83(4):599-611.
- [17] Y. J. Yoo, Y. Feng, Y.H. Kim, C.F.J. Yagonia, Enzyme Catalysis. In: Fundamentals of Enzyme Engineering, *Springer, Dordrecht*, **2017**, 101-110.
- [18] B. M. Weckhuysen, S. Kitagawa and M. Tsapatsis, Reactions in Confined Spaces, *ChemPhysChem.*, **2018**, 19, 339-34.
- [19] R. Navanietha Krishnaraj, A. David, R. K. Sani, Fundamentals of Enzymatic Processes, în: R. K. Sani, R. Navanietha Krishnaraj (Editori), Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy (Prima ediție), Springer International Publishing, Cham, Elveția, **2017**, 2, 5-29.
- [20] J. M. Blamey, F. Fischer, H-P. Meyer, F. Sarmiento, M. Zinn, Enzymatic Biocatalysis in Chemical Transformations: A Promising and Emerging Field in Green Chemistry Practice, în: G. Brahmachari (Editor), Biotechnology of Microbial Enzymes, (Prima ediție) Academic Press, Cambridge, Statele Unite, **2017**, 14, 347-403.
- [21] G. Brahmachari, Lipase-Catalyzed Organic Transformations: A recent update, în: G. Brahmachari (Editor), Biotechnology of Microbial Enzymes (Prima ediție), Academic Press, Cambridge, Statele Unite, **2017**, 325-346.
- [22] P-Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L-G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, EM. Papamichael, Advances in lipase-catalyzed esterification reactions, *Biotechnol. Adv.*, **2013**, 31(8):1846-59.
- [23] F. Hasan, A. A. Shah, A. Hameed, Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme Microb. Tech.*, 39, **2006**, 235-251.
- [24] J. L. Porter, R. A. Rusli, D. L. Ollis, Directed Evolution of enzymes for industrial biocatalysis, *ChemBioChem.*, **2016**, 17(3), 197-203.
- [25] K. R. Jegannathan, S. Abang, D. Poncelet, S. Chan and P. Ravindra, Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase—A Critical Review, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **2008**, 28(4):253-64.
- [26] E. M. Anderson, K. M. Larsson and O. Kirk, One Biocatalyst- Many applications: The use of *Candida Antarctica* B-Lipase in organic Synthesis, *Biocatal. Biotransformation*, **1998**, 16:3, 181-204.
- [27] O. Kirk and M. W. Christensen, Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin, *Org. Process Res. Dev.*, **2002**, 6(4), 446-451.
- [28] G. Rabbani, E. Ahmad, M. V. Khan, M. T. Ashraf, R. Bhat and R. H. Khan, Impact of structural stability of cold adapted *Candida antarctica* lipase B (CaLB): in relation to pH, chemical and thermal denaturation, *RSC Adv.*, **2015**, 5, 20115-20131.
- [29] D. J. Ericsson, A. Kasrayan, P. Johansson, T. Bergfors, A. G. Sandstrom, J-E. Backvall and S. L. Mowbray, X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation, *J. Mol. Biol.*, **2008**, 376 (1),109-119.
- [30] D. A. Sanchez, G. M. Tonetto, M. L. Ferreira, *Burkholderia cepacia* lipase: A versatile catalyst in synthesys reactions, *Biotechnol. Bioeng.*, **2017**, 115(1), 6-24.
- [31] J. L. Arpigny, K-E. Jaeger, Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties, *Biochem. J.*, **1999**, 343 Pt1, 177-83.

- [32] N. S. Rios, B. B. Pinheiro, M. P. Pinheiro, R. M. Bezerra, J. C. Sousa dos Santos, L. R. B. Goncalves, Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications, *Process Biochem.*, **2018**, 75, 99-120.
- [33] K-E. Jaeger, S. Ransac, B. W. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel and O. Misset, Bacterial lipases, *FEMS Microbiol. Rev.*, **1994**, 15(1), 29-63.
- [34] L. Li, F. Ji, J. Wang, Y. Li and Y. Bao, Esterification degree of fructose laurate exerted by *Candida antarctica* lipase B in organic solvents, *Enzyme Microb. Technol.*, **2015**, 69, 46-53.
- [35] H. J. Park, J. C. Joo, K. Park, Y. H. Kim and Y. J. Yoo, Prediction of the solvent affecting site and the computational design of stable *Candida antarctica* lipase B in a hydrophilic organic solvent, *J. Biotechnol.*, **2013**, 163(3), 346-52.
- [36] R. Kumar, R. Singh, J. Kaur, Combinatorial reshaping of a lipase structure for thermostability: additive role of surface stabilizing single point mutations, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2014**, 447(4), 626-32.
- [37] C. W. Lee, S-H. Jang and H-S. Chung, Improving the stability of cold-adapted enzymes by immobilization, *Catalysts*, **2017**, 7(4), 112.
- [38] M. Mohtashami, J. Fooladi, A. Haddad-Mashadrizeh, M. R. Housaindokhte, H. Monhemi, Molecular mechanism of enzyme tolerance against organic solvents: Insights from molecular dynamics simulation, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2019**, 122, 914-923.
- [39] X-F. Zhang, G-Y. Yang, Y. Zhang, Y. Xie, S. G. Withers & Y. Feng, A general and efficient strategy for generating the stable enzymes, *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 33797.
- [40] A. A. N. Saqib, K. S. Siddiqui, How to Calculate Thermostability of Enzymes Using a Simple Approach, *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, **2018**, 46 (4), 398-402.
- [41] F. Hasan, A. A. Shah, A. Hameed, Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme Microb. Technol.*, **2006**, 39(2), 235-251.
- [42] W-J. Zhou, Y. Ni, G-W. Zheng, H-H. Chen, , Z-R. Zhu, J-H. Xu, Enzymatic resolution of a chiral chlorohydrin precursor for (R)- α -lipoic acid synthesis via lipase catalyzed enantioselective transacylation with vinyl acetate, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2014**, 99, 102-107.
- [43] I. M. Ferreira, R. H. V. Nishimura, A. B. Souza, G. C. Clososki, S. A. Yoshioka and A. L. M. Porto, Highly enantioselective acylation of chlorohydrins using Amano AK lipase from *P. fluorescens* immobilized on silk fibroin-alginate spheres, *Tetrahedron Lett.*, **2014**, 55(36), 5062-5065.
- [44] L. Costa, V. Brissos, F. Lemos, F. R. Ribeiro, J. M. Cabral, Enhancing the thermal stability of lipases through mutagenesis and immobilization on zeolites, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **2009**, 32(1), 53-61.
- [45] S. Rodriguez-Couto, Solid-State Fermentation for Laccases Production and Their Applications, in: A. Pandey, C. Larroche and C. R. Soccol (Editori), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (Prima ediție), Elsevier, Amsterdam, Olanda, **2018**, 11, 211-234.
- [46] C. S. Nunes, A. Kunamneni, Laccases—properties and applications, in: C. S. Nunes and V. Kumar (Editori), *Enzymes in Human and Animal Nutrition* (Prima ediție), Academic Press, Cambridge, Statele Unite, **2018**, 7, 133-161.
- [47] P. Upadhyay, R. Shrivastava, P. K. Agrawal, Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase, *3 Biotech.*, **2016**, 6(1):15.
- [48] S. Roth, A. C. Spiess, Laccases for biorefinery applications: a critical review on challenges and perspectives, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2015**, 38(12): 2285-313.
- [49] V. Vernekar, S. S. Lele, Laccase: Properties and applications, *BioResources*, **2009**, 4(4), 1694-1717.

- [50] P. Baldrian, Fungal laccases- occurrence and properties, *FEMS Microbio. Rev.*, **2006**, 30(2), 215-42.
- [51] D. M. Mate, M. Alcalde, Laccase engineering: From rational design to direct evolution, *Biotechnol. Adv.*, **2015**, 33(1), 25-40.
- [52] P. S. Chauhan, B. Goradia, A. Saxena, Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications, *3 Biotech.*, **2017**, 7(5):323.
- [53] M. Mogharabi, M. A. Faramarzi, Laccase and Laccase -Mediated Systems in the Synthesis of Organic Compounds, *Adv.Synth.Catal.*, **2014**, 356 (5), 897-927.
- [54] T. Senthivelan, J. Kanagaraj, and R. C. Panda, Recent Trends in Fungal Laccase for Various Industrial Applications: An Eco-friendly Approach - A Review, *Biotechnol. Bioproc. E.*, **2016**, 21: 19.
- [55] S. R. Couto, J. L. T. Herrera, Industrial and biotechnological applications of laccases: A review, *Biotechnol. Adv.*, **2006**, 24, 500-13.
- [56] H. V. Prajapati and F. P. Minocheherhomji, Laccase - A Wonder Molecule: A Review of its Properties and Applications, *Int. J. Pure App. Biosci.*, **2018**, 6(1): 766-773.
- [57] C. Pezzella, L. Guarino, A. Piscitelli, How to enjoy laccases, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2015**, 72(5):923-40.
- [58] T. Kudanga, M. Le Roes-Hill, Laccase applications in biofuels production: current status and future prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2014**, 98(15):6525-42.
- [59] A. Kunamneni, S. Camarero, C. Garcia-Burgos, F. J. Plou, A. Ballesteros and M. Alcalde, Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis, *Microbial. Cell. Factories*, **2008**, 20;7:32.
- [60] S. J. Varjani, Microbial Laccases and Nanobiotechnology: Environmental Perspective, în: R. Prasad (Editor), *Advances and Applications Through Fungal Nanobiotechnology, Fungal Biology* (Prima ediție), Springer International Publishing, Elveția, **2016**, 253-264.
- [61] M. Alcade, Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications, în: J. Polaina and A. P. MacCabe (Editori), *Industrial Enzymes*, (Prima ediție), Springer Netherlands, Heidelberg, **2007**, 461-476.
- [62] N. C. Veitch, Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, *Phytochemistry*, **2004**, 65, 249-259.
- [63] R. Morsi, M. Bilal, H. M. N. Iqbal, S. S. Ashraf, Laccases and peroxidases: The smart, greener and futuristic biocatalytic tools to mitigate recalcitrant emerging pollutants, *Science of The Total Environment*, **2020**, 714, 136572.
- [64] R. Ahmad, M. Sardar, Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix, *Biochem. Anal. Biochem.*, **2015**, 4:178.
- [65] J. M. Nelson, E. G. Griffin, Adsorption of invertase, *J.Am.Chem.Soc.*, **1916**, 38 (5), 1109-1115.
- [66] Z-G. Wang, L-S. Wan, Z-M. Liu, X-J. Huang, Z-K. Xu, Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview, *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **2009**, 56 (4), 189-195.
- [67] R. A. Sheldon, Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance, *Adv. Synth. Catal.*, **2007**, 349 8-9, 1289-1307
- [68] N. S. Hettiarachchy, D. J. Feliz, J.S. Edwards, R. Horax, The use of immobilized enzymes to improve functionality, în: R. Y. Yada (Editor), *Proteins in Food Processing*, (Ediția a 2-a), Woodhead Publishing, Cambridge, **2018**, 569-597.
- [69] P. Fernandes, F. Carvalho, Microbial Enzymes for the Food Industry, în: G. Brahmachari (Editor), *Biotechnology of Microbial Enzymes*, (Prima ediție), Academic Press, Cambridge, Statele Unite, **2016**, 513-544.

- [70] L. Cao, L. van Langeny and R. A. Sheldon, Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free, *Curr. Opin. Biotech.*, **2003**, 14:387-394.
- [71] C. Garcia-Galan, A. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente and R. C. Rodrigues, Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance, *Adv. Synth. Catal.*, **2011**, 353(16), 2885 – 2904.
- [72] U. T. Bornscheuer, Immobilizing Enzymes: How to Create More Suitable Biocatalysts, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42(29), 3336-7.
- [73] L. Fernandez-Lopez, S. G. Pedrero, N. Lopez-Carrobles, B. C. Gorines, J. J. Virgen-Ortiz, R. Fernandez-Lafuente, Effect of Protein Load on Stability of Immobilized Enzymes., *Enzyme and Microb. Technol.*, **2017**, 98, 18-25.
- [74] S. B. Sigurdardóttir, J. Lehmann, S. Ovtar, J-C. Grivel, M. D. Negra, A. Kaiser, M. Pinelo, Enzyme immobilization on inorganic surfaces for membrane reactor applications: Mass transfer challenges, enzyme leakage and reuse of materials, *Adv. Synth. Catal.*, **2018**, 360 (14), 2578-2607.
- [75] J. F. Díaz, K. J. Balkus Jr., Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve, *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **1996**, 2(2-3), 115-126.
- [76] G. F. Bickerstaff Jr., Immobilization of Enzymes and Cells, in: G. F. Bickerstaff (Editor), *Immobilization of Enzymes and Cells* (Prima editie), Humana Press, New York, **1997**, 1-11.
- [77] C-K. Lee A-N. Au-Duong, Enzyme Immobilization on Nanoparticles: Recent Applications, in: H. N. Chang (Editor), *Emerging Areas in Bioengineering* (Pima editie), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2018**, 67-80.
- [78] D. Norouziyan, Enzyme immobilization: the state of art in biotechnology, *Iran. J. Biotechnol.*, **2003**, 1(4), 197-206.
- [79] S. Datta, L. R. Christena, Y. R. S. Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3 Biotech.*, **2012**, 3(1): 1-9.
- [80] J. Zdarta, A. S. Meyer, T. Jesionowski and M. Pinelo, A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility, *Catalysts*, **2018**, 8(2), 92.
- [81] R. DiCosimo, J. McAuliffe, A. J. Poulouseb and G. Bohlmann, Industrial use of immobilized enzymes, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42(15), 6437-74.
- [82] U. Hanefeld, L. Gardossib and E. Magner, Understanding enzyme immobilisation, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38(2), 453-468.
- [83] P. Tielmann, H. Kierkels, A. Zonta, A. Ilie and M. T. Reetz, Increasing the activity and enantioselectivity of lipases by sol-gel immobilization: further advancements of practical interest, *Nanoscale*, **2014**, 6, 6220-6228.
- [84] I. Gill and A. Ballesteros, Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals, *Trends in Biotechnol.*, **2000**, 18(7), 282-96.
- [85] A. E. Danks, S. R. Hall and Z. Schnepf, The evolution of 'sol-gel' chemistry as a technique for materials synthesis, *Mater. Horiz.*, **2016**, 3, 91-112.
- [86] A. A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato, Enzyme immobilization: an update, *J. Chem. Biol.*, **2013**, 6(4):185-205.
- [87] B. Mattiasson, Affinity Immobilization, *Method. Enzymol.*, **1988**, 137, 647-656.
- [88] M. Hartmann and X. Kostrov, Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42(15):6277-89.
- [89] V. R. Murty, J. Bhat, and P. K. A. Muniswaran, Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **2002**, 7(2): 57-66.

- [90] R. A. Sheldon, R. Schoevaart, & L. M. Van Langen, Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization, *Biocatal. Biotransfor.*, **2005**; 23(3-4): 141-147.
- [91] R. A. Sheldon and S. van Pelt, Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42(15):6223-35.
- [92] R. A. Sheldon, M. Sorgedragger, M. H. A. Janssen, Use of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) for performing biotransformations, *Chimica oggi*, **2007**, 25(1), 62-67.
- [93] H. Yamaguchi, Y. Kiyota and M. Miyazaki, Techniques for Preparation of Cross-Linked Enzyme Aggregates and Their Applications in Bioconversions, *Catalysts*, **2018**, 8(5), 174.
- [94] I. Matijosyt, I.W.C.E. Arends, S. de Vries, R. A. Sheldon, Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases, *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **2010**, 62(2), 142-148.
- [95] A. I. S. Brígida, P. F. F. Amaral, M. A .Z. Coelho, L. R. B. Goncalves, Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Production, characterization and application as an industrial biocatalyst, *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **2014**, 101, 148-158.
- [96] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, R. Fernandez-Lafuente, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb. Tech.*, **2007**, 40(6), 1451-1463.
- [97] A. G. Cunha, G. Fernández-Lorente, J. V. Bevilacqua, J. Destain, L. M. C. Paiva, D. M. G. Freire, R. Fernández-Lafuente, J. M. Guisán, Immobilization of *Yarrowia lipolytica* Lipase—a Comparison of Stability of Physical Adsorption and Covalent Attachment Techniques, in: W.S. Adney, J.D. McMillan, J. Mielenz, K.T. Klasson (Editori), *Biotechnology for Fuels and Chemicals, (Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology)*, Humana Press, New York, **2007**, 169-176.
- [98] Z. Ali, T. Li, M. Khan, N. Ali and Q. Zhang, Immobilization Of Lipase On Iron Oxide Organic/Inorganic Hybrid Particles: A Review Article, *Rev.Adv. Mater. Sci.*, **2018**, 53(1), 106-117.
- [99] E. A. Manoel, J. C. S. dos Santos, D. M. G.Freire, N. Rueda, R. Fernandez-Lafuente, Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme, *Enzyme Microb. Tech.*, **2015**, 71, 53-7.
- [100] L. N. Lima, G. C. Oliveira, M. J. Rojas, H. F. Castro, P. C. M. Da Rós, A. A. Mendes, R. L. C. Giordano, P. W. Tardioli, Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2015**, 42(4): 523-35.
- [101] S. P. de Souza, R. A. D. de Almeida, G. G. Garcia, R. A. C. Leão, J. Bassut, R. O. M. A. de Souza and I. Itabaiana Jr, Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on epoxy functionalized silica: characterization and improving biocatalytic parameters, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2018**, 93(1), 105-111.
- [102] S. Arana-Peña Y. Lokha, R. Fernández-Lafuente, Immobilization on octyl-agarose beads and some catalytic features of commercial preparations of lipase a from *Candida antarctica* (Novocor ADL): Comparison with immobilized lipase B from *Candida antarctica*, *Biotechnol. Prog.*, **2018**, 35(1) e:2735.
- [103] C. Lee, B. Sandig, M. R. Buchmeiser and M. Haumann, Supported ionic liquid phase (SILP) facilitated gas-phase enzyme catalysis - CALB catalyzed transesterification of vinyl propionate, *Catal. Sci. Technol.*, **2018**, 8, 2460-2466.
- [104] E. P. Cipelatti, A. Valerio, R. O. Henriques, D. E. Moritz, J. L. Ninow, D. M. G. Freire, E. A. Manoel, R. F. Lafuente and D. de Oliveira, Nanomaterials for biocatalyst

- immobilization – state of the art and future trends, *RSC Adv.*, **2016**, 6, 104675-104692.
- [105] E.P. Cicolatti, A. Valerio, G. Nicoletti, E. Theilacker, P.H.H. de Araujo C. Sayer, J. L. Ninow, D. de Oliveira, Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on PEGylated poly(urea-urethane) nanoparticles by step miniemulsion polymerization, *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **2014**, 109, 116-121.
- [106] E. P. Cicolatti, E. A. Manoel, R. Fernandez-Lafuentec, D. M. G. Freire, Support engineering: relation between development of new supports for immobilization of lipases and their applications, *Biotechnology Research and Innovation*, **2017**, 1(1), 26-34.
- [107] J. C. S. dos Santos, H. L. Bonazza, L. J. B. L. de Matos, E. A. Carneiro, O. Barbosa, R. Fernandez-Lafuente, L. R. B. Gonçalves, H. B. de Sant'Ana, R. S. Santiago-Aguiar, Immobilization of CALB on activated chitosan: Application to enzymatic synthesis in supercritical and near-critical carbon dioxide, *Biotechnol. Rep.*, **2017**, 14, 16-26.
- [108] Y-K. Sim, H. Jung, S. H. Kim, J-W. Park, W-J. Park and C-H. Jun, A one-step method for covalent bond immobilization of biomolecules on silica operated in aqueous solution, *Chem. Sci.*, **2018**, 9(41), 7981-7985.
- [109] M. P. Pinheiro, N. S. Rios, T. de S. Fonseca, F. de A. Bezerra, E. Rodríguez-Castellón, R. Fernandez-Lafuente, M. C. de Mattos, J. C. S. dos Santos, L. R. B. Gonçalves, Kinetic resolution of drug intermediates catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on imobead-350, *Biotechnol. Progr.*, **2018**, 34(4), 878-889.
- [110] N. Guajardo, K. Ahumada, P. D. de María and R. A. Schrebler, Remarkable stability of *Candida antarctica* lipase B immobilized via cross-linking aggregates (CLEA) in deep eutectic solvents, *Biocatal. Biotransfor.*, **2019**, 37(2), 106-114.
- [111] J. Brem, M. C. Turcu, C. Paizs, K. Lundell, M.-I. Tosa, F-D. Irimiea, L. T. Kanerva, Immobilization to improve the properties of *Pseudomonas fluorescens* lipase for the kinetic resolution of 3-aryl-3-hydroxy esters, *Process Biochem.*, **2012**, 47(1), 119-126.
- [112] S. Shah, A. Sharma, M. N. Gupta, Preparation of cross-linked enzyme aggregates by using bovine serum albumin as a proteic feeder, *Anal. Biochem.*, **2006**, 351 (2), 207-13.
- [113] P. Hara, U. Hanefeld, L. T. Kanerva, Sol-gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents, *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **2008**, 50(2), 80-86.
- [114] R. L. Souza, E. L. P. Faria, R. T. Figueiredo, S. Mettedi, O. A. A. Santos, A. S. Lima, C. M. F. Soares, Protic ionic liquid applied to enhance the immobilization of lipase in sol-gel matrices, *J. Therm. Anal. Calorim.*, **2017**, 128(2): 833-840.
- [115] I. Itabaiana Jr., F. K. Sutili, S. G. F. Leite, K. M. Gonçalves, Y. Cordeiro, I. C. R. Leal, L. S. M. Miranda, M. Ojeda, R. Luqued and R. O. M. A. de Souza, Continuous flow valorization of fatty acid waste using silica-immobilized lipases, *Green Chem.*, **2013**, 15, 518-524.
- [116] S. M. Meunier, A. R. Rajabzadeh, R. L. Legge, Kinetic modelling of the production of methyl oleate by Celite® supported lipase sol-gels, *Biochem. Eng. J.*, **2014**, 85, 63-70.
- [117] D. Weiser, Z. Boros, G. Hornyánszky, A. Tóth, L. Poppe, Disubstituted dialkoxysilane precursors in binary and ternary sol-gel systems for lipase immobilization, *Process Biochem.*, **2012**, 47, 428-434.

- [118] H-Z. Ma, X-W. Yub, C. Songa, Q-l. Xue, B. Jiang, Immobilization of *Candida Antarctica* lipase B on epoxy modified silica by sol-gel process, *J. Mol. Catal., B Enzym.*, **2016**, 127, 76-81.
- [119] M.T. Reetz, A. Zonta, J. Simpelkamp, Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials, *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, 49(5):527-34.
- [120] X. Cao, J. Yang, L. Shu, B. Yu, Y. Yan, Improving esterification activity of *Burkholderia cepacia* lipase encapsulated in silica by bioimprinting with substrate analogues, *Process Biochem.*, **2009**, 44 (2), 177-182.
- [121] M. T. Reetz, A. Zonta, V. Vijayakrishnan, K. Schimossek, Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials: magnetic separation of heterogeneous biocatalysts, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **1998**, 134, 251-258.
- [122] H. Nouredini, X. Gao, R. S. Philkana, Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil, *Bioresour. Technol.*, **2005**, 96(7), 769-77.
- [123] D. Weiser, F. Nagy, G. Bánóczy, M. Oláh, A. Farkas, A. Szilágyi, K. László, Á. Gellért, G. Marosi, S. Keményf and L. Poppe, Immobilization engineering – How to design advanced sol-gel systems for biocatalysis?, *Green Chem.*, **2017**, 19, 3927-3937.
- [124] S. K. Parashar, S. K. Srivastava, N. N. Dutta, V. K. Garlapati, Engineering aspects of immobilized lipases on esterification: A special emphasis of crowding, confinement and Diffusion effects, *Eng. Life Sci.*, **2018**, 18(5), 308-316.
- [125] M. Mohammadi, M. A. As'habi, P. Salehi, M. Yousefi, M. Nazari, J. Brask, Immobilization of laccase on epoxy-functionalized silica and its application in biodegradation of phenolic compounds, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**, 109, 443-447.
- [126] L. Lonappan, Y. Liu, T. Rouissi, F. Pourcel, S. K. Brar, M. Verma, R. Y. Surampalli, Covalent immobilization of laccase on citric acid functionalized micro-biochars derived from different feedstock and removal of diclofenac, *Chem. Eng. J.*, **2018**, 351, 985-994.
- [127] A. A. Kadam, J. Jang, S. C. Jee, J.-S. Sung, and D. S. Lee, Chitosan-functionalized supermagnetic halloysite nanotubes for covalent laccase immobilization, *Carbohydr. Polym.*, **2018**, 194, 208-216.
- [128] A. A. Kadam, J. Jang and D. S. Lee, Supermagnetically tuned halloysite nanotubes functionalized with aminosilane for covalent laccase immobilization, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, 9(18), 15492-15501.
- [129] M. Maryšková, I. Ardao, C. A. García-González, L. Martinová, J. Rotková, A. Ševců, Polyamide 6/chitosan nanofibers as support for the immobilization of *Trametes versicolor* laccase for the elimination of endocrine disrupting chemicals, *Enzyme Microb. Technol.*, **2016**, 89, 31-38.
- [130] T. A. Nguyen, C-C. Fu, R.-S. Juang, Effective removal of sulfur dyes from water by biosorption and subsequent immobilized laccase degradation on crosslinked chitosan beads, *Chem. Eng. J.*, **2016**, 304, 313-324.
- [131] R. Amin, A. Khorshidi, A. F. Shojaei, S. Rezaei, M. A. Faramarzi, Immobilization of laccase on modified Fe₃O₄@SiO₂@Kit-6 magnetite nanoparticles for enhanced delignification of olive pomace bio-waste, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**, 114, 106-113.
- [132] Z. Gao, Y. Yi, J. Zhao, Y. Xia, M. Jiang, F. Cao, H. Zhou, P. Wei, H. Jia and X. Yong, Co-immobilization of laccase and TEMPO onto amino-functionalized magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and its application in acid fuchsin decolorization, *Bioresour. Bioprocess.*, **2018**, 5:27.

- [133] H. Yuana, L. Chena, and F. F. Honga, M. Zhua, Evaluation of nanocellulose carriers produced by four different bacterial strains for laccase immobilization, *Carbohydr. Polym.*, **2018**, 196, 457-464.
- [134] R. Tarasi, M. Alipour, L. Gorgannezhad, S. Imanparast, A. Yousefi-Ahmadipour, A. Ramezani, M. R. Ganjali, A. Shafiee, M. A. Faramarzi, M. Khoobi, Laccase immobilization onto magnetic β -cyclodextrin-modified chitosan: improved enzyme stability and efficient performance for phenolic compounds elimination, *Macromol. Res.*, **2018**, 26(8): 755-762.
- [135] D. Cao, W. Cheng, K. Tao, Y. Liang, Preparation of polydopamine-modified 3d interconnected macroporous silica for laccase immobilization, *Macromol. Res.*, **2018**, 26(7): 616-622.
- [136] S. H. Kacem, S. Galai, A. Pérez de los Ríos, F. J. H. Fernández, I. Smaali, New efficient laccase immobilization strategy using ionic liquids for biocatalysis and microbial fuel cells applications, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **2018**, 93(1): 174-183.
- [137] D. Wu, Q. Feng, T. Xu, A. Wei., H. Fong, Electrospun blend nanofiber membrane consisting of polyurethane, amidoxime polyacrylonitrile, and β -cyclodextrin as high-performance carrier/support for efficient and reusable immobilization of laccase, *Chem. Eng. J.*, **2018**, 331, 517-526.
- [138] M. Bajic, I. Plazl, R. Stloukal, P. Znidarsic-Plazl, Development of a miniaturized packed bed reactor with ω -transaminase immobilized in LentiKats®, *Process Biochem.*, **2017**, 52, 63-72.
- [139] S. Budžaki, G. Miljić, S. Sundaram, M. Tišma, V. Hessel, Cost analysis of enzymatic biodiesel production in small-scaled packed-bed reactors, *Appl. Energ.*, **2018**, 210, 268-278.
- [140] M. Habulin, Z. Knez, Optimization of (R,S)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2009**, 58(1-4), 24-28.
- [141] M. Oláh, Z. Boros, G. Hornyánszky, L. Poppe, Isopropyl 2-ethoxyacetate—an efficient acylating agent for lipase-catalyzed kinetic resolution of amines in batch and continuous-flow modes, *Tetrahedron*, **2015**, 72(46), 7249-7255.
- [142] I. M. Ferreira, R. H. V. Nishimura, A. B. dos A. Souza, G. C. Clososki, S. A. Yoshioka, A. L. M. Porto, Highly enantioselective acylation of chlorohydrins using Amano AK lipase from *P. fluorescens* immobilized on silk fibroin-alginate spheres *Tetrahedron Lett.*, **2014**, 55(36), 5062-5065.
- [143] A. Tomin, D. Weiser, G. Hellner, Z. Bata, L. Corici, F. Péter, B. Koczka, L. Poppe, Fine-tuning the second generation sol-gel lipase immobilization with ternary alkoxy silane precursor systems, *Process Biochem.*, **2011**, 46(1), 52-58.
- [144] Z. Boros, D. Weiser, M. Márkus, E. Abaháziová, Á. Magyar, A. Tomin, B. Koczka, P. Kovács, L. Poppe, Hydrophobic adsorption and covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on mixed-function-grafted silica gel supports for continuous-flow biotransformations, *Process Biochem.*, **2013**, 48(7), 1039-1047.
- [145] C. R. Matte, C. Bordinhão, J. K. Poppe, R. C. Rodrigues, P. F. Hertz, M. A. Z. Ayub, Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2016**, 127, 67-75.
- [146] K. K. Dubey, D. Kumar, P. Kumar, S. Haque and A. Jawed, Evaluation of Packed-Bed Reactor and Continuous Stirred Tank Reactor for the Production of Colchicine Derivatives, *ISRN Chemical Engineering*, **2013**, Article ID 865618, 6 pages.

- [147] P. dos Santos, M. A. A. Meireles, J. Martinez, production of isoamyl acetate by enzymatic reactions in batch and packed bed reactors with supercritical CO₂, *J. of Supercritical Fluids*, **2017**, 127, 71-80.
- [148] G. Hellner, Z. Boros, A. Tomin, L. Poppe, Novel sol-gel lipases by designed bioimprinting for continuous-flow kinetic resolutions, *Adv. Synth. Catal.*, **2011**, 353(13), 2481-2491.
- [149] E. Abaházi, D. Lestál, Z. Boros, L. Poppe, Tailoring the spacer arm for covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B—thermal stabilization by bisepoxide-activated aminoalkyl resins in continuous-flow reactors, *Molecules*, **2016**, 21(6), 767.
- [150] A. Ursoiu, C. Paul, T. Kurtan, F. Péter, Sol-gel entrapped *Candida antarctica* lipase B - a biocatalyst with excellent stability for kinetic resolution of secondary alcohols, *Molecules*, **2012**, 17(11), 13045-13061.
- [151] C. Csajági, G. Szatzker, E.R. Toke, L. Üрге, F. Darvas, L. Poppe, Enantiomer selective acylation of racemic alcohols by lipases in continuous-flow bioreactors, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19 (2), 237-246.
- [152] L. S. Chua, M. R. Sarmidi, Immobilised lipase-catalysed resolution of (R,S)-1-phenylethanol in recirculated packed bed reactor, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2004**, 28 (2-3), 111-119.
- [153] T. Mehtio, M. Toivari, M. G. Wiebe, A. Harlin, M. Penttila, and A. Koivula, Production and applications of carbohydrate-derived sugar acids as generic biobased chemicals, *Crit. Rev. in Biotechnol.*, **2016**, 36(5), 904-16.
- [154] H. Zhang, N. Li, X. Pan, S. Wu, and J. Xie, Oxidative conversion of glucose to gluconic acid by iron(III) chloride in water under mild conditions, *Green Chem.*, **2016**, 18, 2308-2312.
- [155] S. Rautiainen, P. Lehtinen, J. Chen, M. Vehkamäki, K. Niemelä, M. Leskelä, T. Repo, Selective oxidation of uronic acids into aldaric acids over gold catalyst, *RSC Adv.*, **2015**, 5, 19502-19507.
- [156] Y. Liu, X. Gong, C. Wang, G. Du, J. Chen, Z. Kang, Production of glucaric acid from myo-inositol in engineered *Pichia pastoris*, *Enzyme Microb. Technol.*, **2016**, 91, 8-16.
- [157] N. Merbouh, J. M. Bobbitt and C. Brückner, 4-AcNH-TEMPO-catalyzed oxidation of aldoses to aldaric acids using chlorine or bromine as terminal oxidants, *J. Carbohydr. Chem.*, **2002**, 21(1-2), 65-77.
- [158] I. Sakuta, K. Takeda, K. Igarashi, H. Ohno and N. Nakamura, Enzymes Suitable for Biorefinery to Coproduce Hexaric Acids and Electricity from Hexuronic Acids Derived from Biomass, *Energy Technol.*, **2018**, 6 (2), 273-279.
- [159] M. Ibert, P. Fuertèsa, N. Merbouhb, C. Fiol-Petit, C. Feasson, F. Marsais, Improved preparative electrochemical oxidation of d-glucose to d-glucaric acid, *Electrochim. Acta*, 55(10), **2010**, 3589-3594.
- [160] J. Lee, B. Saha and D. G. Vlachos, Pt catalysts for efficient aerobic oxidation of glucose to glucaric acid in water, *Green Chem.*, **2016**, 18, 3815-3822.
- [161] X. Jin, M. Zhao, M. Vora, J. Shen, C. Zeng, W. Yan, P. S. Thapa, B. Subramaniam, R. V. Chaudhari, Synergistic effects of bimetallic PtPd/TiO₂ nanocatalysts in oxidation of glucose to glucaric acid: structure dependent activity and selectivity, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2016**, 55 (11), 2932-2945.
- [162] S. Rautiainen, P. Lehtinen, J. Chen, M. Vehkamäki, K. Niemela, M. Leskela and T. Repo, Selective oxidation of uronic acids into aldaric acids over gold catalyst, *RSC Adv.*, **2015**, 5, 19502-19507.
- [163] E. Derrien, M. Ahmar, E. Martin-Sisteron, G. Raffin, Y. Queneau, P. Marion, M. Beyerle, C. Pinel, and M. Besson, Oxidation of aldoses contained in softwood

hemicellulose acid hydrolysates into aldaric acids under alkaline or noncontrolled pH conditions, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2018**, 57(13) 4543-4552.

[164] N. Merbouh, J. F. Thaburet, M. Ibert, F. Marsais, J. M. Bobbitt, Facile nitroxide-mediated oxidations of D-glucose to D-glucaric acid, *Carbohydr. Res.*, **2001**, 336(1), 75-78.

[165] N. Chen, J. Wang, Y. Zhao and Y. Deng, Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient production of glucaric acid at high titer, *Microb. Cell Fact.*, **2018**, 17(1), 67.

[166] C. C. Lee, R. E. Kibblewhite, C. D. Paavola, W. J. Orts, K. Wagschal, Production of glucaric acid from hemicellulose substrate by rosettasome enzyme assemblies, *Mol. Biotechnol.*, **2016**, 58(7), 489-96.

[167] T. S. Moon, S-H. Yoon, A. M. Lanza, J. D. Roy-Mayhew, and K. L. J. Prather, Production of glucaric acid from a synthetic pathway in recombinant *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2009**, 75(3), 589-595.

[168] Y. Li, Y. Xue, Z. Cao, T. Zhou, F. Alnadari, Characterization of a uronate dehydrogenase from *Thermobispora bispora* for production of glucaric acid from hemicellulose substrate, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **2018**, 34(7) 102.

[169] P. N. R. Vennestrøm, E. Taarning, C. H. Christensen, S. Pedersen, J-D Grunwaldt, and J. M. Woodley, Chemoenzymatic combination of *Glucose Oxidase* with Titanium Silicalite-1, *ChemCatChem*, **2010**, 2(8), 943-945.

[170] S. Nouren; H.N. Bhatti, Mechanistic study of degradation of basic violet 3 by Citrus limon peroxidase and phytotoxicity assessment of its degradation products, *Biochem. Eng. J.*, **2015**, 95, 9-19.

[171] F. Gholami-Borujeni; A. H. Mahvi; S. Naseri; M. A. Faramarzi; R. Nabizadeh; M. Alimohammadi, Application of immobilized horseradish peroxidase for removal and detoxification of azo dye from aqueous solution, *Res. J. Chem. Environ.*, **2011**, 15(2), 217-220.

[172] J. T. Chacko; K. Subramaniam, Enzymatic Degradation of Azo Dyes -A Review, *Int. J. Environ. Sci.*, **2011**, 1(6), 1250-1256.

[173] M. Monier; D.M. Ayad; Y. Wei, A.A. Sarhan, Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2010, 46(3), 324-330.

[174] M. Matto; Q. Husain, Decolorization of direct dyes by immobilized turnip peroxidase in batch and continuous processes, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2009**, 72(3), 965-971.

[175] R. G. Saratale; G. D. Saratale; J. S. Chang; S.P. Gowindvar, Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review, *J. Taiwan. Inst. Chem. Eng.*, **2011**, 42, 138-157.

[176] G.R. Lopes; D.C.G.A. Pinto; A.M.S. Silva, Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry, *RSC Adv.*, **2014**, 4, 37244-37265.

[177] L. Y. Juna; L. S. Yon; N.M. Mubarak; C. H. Bing; S. Pan; M. K. Danquah; E.C. Abdullah; M. Khalid, An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater, *J. Environ. Chem. Eng.*, **2019**, 7(2), 1-14.

[178] X. Xie; P. Luo; J. Han; T. Chen; Y. Wang; Y. Cai; Q. Liu, Horseradish peroxidase immobilized on the magnetic composite microspheres for high catalytic ability and operational stability, *Enzyme Microb. Technol.*, **2019**, 122, 26-35.

[179] B. Yu; H. Cheng; W. Zhuang; C. J. Zhu; J. Wu; H. Niu; D. Liu; Y. Chen; H. Ying, Stability and repeatability improvement of horseradish peroxidase by immobilization on amino-functionalized bacterial cellulose, *Process Biochem.*, **2019**, 79, 40-48.

- [180] S. Venkata Mohan; K. Krishna Prasad; N. Chandrasekhara Rao; P.N. Sarma, Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process, *Chemosphere*, **2005**, 58(8), 1097-1105.
- [181] O. Prodanović; M. Prokopijević; D. Spasojević; Z. Stojanović; K. Radotić; Z.D. Knežević-Jugović; R. Prodanović, Improved covalent immobilization of horseradish peroxidase on macroporous glycidyl methacrylate-based copolymers, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2012**, 168, 1288-1301.
- [182] J. L. Gómez; A. Bódalo; E. Gómez; J. Bastida; A. M. Hidalgo; M. Gómez, Immobilization of peroxidases on glass beads: An improved alternative for phenol removal, *Enzyme Microb. Technol.*, **2006**, 39(5), 1016-1022.
- [183] Z. Zhao; M. C. Zhou; R. L. Liu, Recent Developments in Carriers and Non-Aqueous Solvents for Enzyme Immobilization, *Catalysts*, **2019**, 9 (647), 1-15.
- [184] C. Mateo; O. Abian; R. F. Lafuente; J. M. Guisan, Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment, *Enzyme Microb. Technol.*, **2000**, 26(7), 509-515.
- [185] C. Mateo; V. Grazu; F. Lopez-Gallego; R. Fernandez-Lafuente; Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports, *Nat. Protoc.*, **2007**, 2(5), 1022-1033.
- [186] C. Mateo; J. M. Palomo; G. Fernandez-Lorente; J. M Guisan; R. Fernandez-Lafuente, Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzym. Microb. Technol.*, **2007**, 40(6), 1451-1463.
- [187] L. Pramparo; F. Stüber; J. Font; A. Fortuny; A. Fabregat; C. Bengoa, Immobilisation of horseradish peroxidase on EupergitC for the enzymatic elimination of phenol, *J. Hazardous Mat.*, **2010**, 177(1-3), 990-1000.
- [188] H. Sun; X. Jin; N. Long; R. Zhang, Improved biodegradation of synthetic azo dye by horseradish peroxidase cross-linked on nano-composite support, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2017**, 95, 1049-1055.
- [189] M.L.Cacicedo, R.M.Manzo, S.Municoy, H. L.Bonazza, G. A.Islan, M. Desimone, M. Bellino, E. J.Mammarella, G. R.Castro, Chapter 7 - Immobilized Enzymes and Their Applications in R. S. Singh, R. R. Singhanian, A. Pandey, C. Larroche (Editor) Biomass, Biofuels and Biochemicals: Advances in Enzyme Technology, Elsevier, **2019**, 169-200.
- [190] J. M. Guisan, F. López-Gallego, J. M. Bolivar, J. Rocha-Martín, G. Fernandez-Lorente, in: J. Guisan, J. Bolivar, F. López-Gallego, Rocha-Martín (Editor), Immobilization of Enzymes and Cells, Springer US, **2020**, vol 2100, 1-26.
- [191] A. Basso, S. Serban, Overview of Immobilized Enzymes Applications in Pharmaceutical, Chemical and Food Industry in: J. Guisan, J. Bolivar, F. López-Gallego, Rocha-Martín (Editor), Immobilization of Enzymes and Cells, Springer US, **2020**, vol 2100, 27-63.
- [192] A. Ursoiu, P. Borza, C. Paul, F. Péter, Influence of silane precursors system composition on the catalytic efficiency of sol-gel immobilized lipases, *Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara)*, **2012**, 57(71), 1, 42-45.
- [193] M.E. Moisa, C.G. Spelmezan, C. Paul, J.H. Bartha-Vari, L.C. Bencze, F.D. Irimie, C. Paizs, F. Peter, M.I. Tosa, Tailored sol-gel immobilized lipase preparates for the enzymatic kinetic resolution of heteroaromatic alcohols in batch and continuous flow systems, *RSC Adv.*, **2017**, 7 (83), 52977-52987.
- [194] C. Zarcuła, L. Corici, R. Croitoru, A. Ursoiu and F. Péter, Preparation and properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during the immobilization of lipase by the sol-gel method, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2010**, 65(1-4), 79-86.

- [195] C. Paul, **P. Borza** and F. Péter, High thermal stability of sol-gel entrapped lipases, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, **2015**, 21(2), 173-180.
- [196] R. C. Rodrigues, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres and R. Fernandez-Lafuente, Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42(15), 6290-307.
- [197] Y. Wikmark, M. Svedendahl Humble and J-E. Bäckvall, Combinatorial library based engineering of *Candida antarctica* lipase a for enantioselective transacylation of sec-alcohols in organic solvent, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2015**, 54(14), 4284-4288.
- [198] **P. Borza**, F. Péter, C. Paul, Improved enantioselectivity of *Candida antarctica* A lipase through sol-gel entrapment, *Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara)*, **2015**, 60(74), 2, 49-54.
- [199] C. Paul, **P. Borza**, A. Marcu, G. Rusu, M. Bîrdeanu, S. Marc Zarcu, F. Péter, Influence of the physico-chemical characteristics of the hybrid matrix on the catalytic properties of sol-gel entrapped *Pseudomonas fluorescens* lipase, *Nanomater. Nanotechnol.*, **2016**, 6:0.
- [200] S. M. Meunier, R. L. Legge, Evaluation of diatomaceous earth as a support for sol-gel immobilized lipase for transesterification, *J Mol Catal B: Enzymatic.*, **2010**, 62(1), 53-57.
- [201] C. M. F. Soares, O. A. dos Santos, H. F. de Castro, F. F. De Moraes, G. M. Zanin, Characterization of sol-gel bioencapsulates for ester hydrolysis and synthesis, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2005**, 123(1-3), 845-859.
- [202] A. M. Klivanov, Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature*, **2001**, 409, 241-246.
- [203] Y.Liu, C.Guo and C-Z.Liu, Development of a mixed solvent system for the efficient resolution of (R, S)-2-octanol catalyzed by magnetite-immobilized lipase, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2014**, 101, 23-27.
- [204] K. P. Dhake, A. H. Karoyo, M. H. Mohamed, L. D. Wilson and B. M. Bhanage, Enzymatic activity studies of *Pseudomonas cepacia* lipase adsorbed onto copolymer supports containing β -cyclodextrin, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, **2013**, 87, 105-112.
- [205] D. Herbst, S. Peper and B. Niemeyer, Enzyme catalysis in organic solvents: influence of water content, solvent composition and temperature on *Candida rugosa* lipase catalyzed transesterification, *J. Biotechnol.*, **2012**, 162(4), 398-403.
- [206] G. Careea, S. Riva, Medium engineering în: V. Gotor, I. Alfonso and E. Garcia-Udriales (Editori), *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes (Prima ediție)* Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, 3-20.
- [207] P. Borza, F. Péter, I. Hulka, C. Paul, Long-term exposure stability of sol-gel immobilized lipases in organic solvents, *Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara)*, 2015, 60(74), 1, 25-30.
- [208] A. Todea, **P. Borza**, A. Cimporescu, C. Paul, F. Péter, Continuous kinetic resolution of aliphatic and aromatic secondary alcohols by sol-gel entrapped lipases in packed bed bioreactors, *Catal. Today*, **2018**, 306, 223-232.
- [209] J. K. Poppe, C. R. Matte, V. O. de Freitas, R. Fernandez-Lafuente, R. C. Rodrigues, M. A. Z. Ayub, Enzymatic synthesis of ethyl esters from waste oil using mixtures of lipases in a plug-flow packed-bed continuous reactor, *Biotechnol. Prog.*, **2018**, 34(4), 952-959.
- [210] F. Strniša, M. Bajić, P. Panjan, I. Plazl, A. M. Sesay, P. Žnidaršič-Plazl, Characterization of an enzymatic packed-bed microreactor: experiments and modeling, *Chem. Eng. J.*, **2018**, 350, 541-550.

- [211] A. C. Carvalho, T. De S. Fonseca, M. C. de Mattos, M. D. C. F. de Oliveira, T. L. G. de Lemos, F. Molinari, D. Romano and I. Serra, Recent advances in lipase-mediated preparation of pharmaceuticals and their intermediates, *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, 16(12), 29682–29716.
- [212] K. Shimomura, H. Harami, Y. Matsubara, T. Nokami, N. Katada, T. Itoh, Lipase-mediated dynamic kinetic resolution (DKR) of secondary alcohols in the presence of zeolite using an ionic liquid solvent system, *Catal.Today*, **2015**, 255, 41–48.
- [213] A. M. L. Huijbrechts, T. Vermonden, P. Bogaert, M. C. R. Franssen, Gerben M. Visser, C. G. Boeriu, E. J. R. Sudhölter, Optimization of the synthesis of 1-allyloxy-2-hydroxy-propyl-starch through statistical experimental design, *Carbohydr. Polym.*, **2009**, 77 (1), 25–31.
- [214] A. Apriceno, R. Bucci, A.M. Girelli, Immobilization of Laccase from *Trametes versicolor* on Chitosan Macrobeads for Anthracene Degradation, *J. Analytical Letters.*, 2017,50(14), 2308-2322.
- [215] M. Fernández-Fernández, M. Á. Sanromán, D. Moldes, Recent developments and applications of immobilized laccase, *Biotechnology Advances*, **2013**, 31(8), 2808-1825
- [216] K. F. Tipton, H. B. F. Dixon, Effects of pH on enzymes, *Methods Enzymol.*, **1979**, 63, 183-234.
- [217] J. S. DORDICK, Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents, *Enzyme Microb. Technol.*, **1989**, 11(4), 194-211.
- [218] N. Mollania, M. Heidari, K. Khajeh, Catalytic activation of *Bacillus* laccase after temperature treatment: Structural and biochemical characterization, *I. J. Biol. Macromol.*, **2018**, 109, 49-56.
- [219] S. Khodaverdian, B. Dabirmanesh, A. Heydari, E. Dashtban-Moghadam, K. Khajeh, F. Ghazi, Activity, stability and structure of laccase in betaine based natural deep eutectic solvents, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**, 107(Pt B):2574-2579.
- [220] M. Mohammadi, M. A. As'habi, P. Salehi, M. Yousefi, M. Nazari, J. Brask, Immobilization of laccase on epoxy-functionalized silica and its application in biodegradation of phenolic compounds, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**, 109, 443-447.
- [221] I. W. C. E. Arends, Y-X. Li, R. Ausan, R. A. Sheldon, Comparison of TEMPO and its derivatives as mediators in laccase catalysed oxidation of alcohols, *Tetrahedron*, **2006**, 62(28), 6659-6665.
- [222] D. Jaušovec, R. Vogrinčič, V. Kokol, Introduction of aldehyde vs. carboxylic groups to cellulose nanofibers using laccase/TEMPO mediated oxidation, *Carbohydr. Polym.*, **2015**, 116, 74-85.
- [223] E. Biró; D. Budugan; A. Todea; F. Péter; S. Klébert; T. Feczko, Recyclable solid-phase biocatalyst with improved stability by sol-gel entrapment of β -d-galactosidase, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2016**, 123, 81-90.
- [224] B. Sahoo; S.K. Sahu; P. Pramanik, A novel method for the immobilization of urease on phosphonate grafted iron oxide nanoparticle, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2011**, 69(3-4), 95-102.
- [225] A. Cimporescu; A. Todea; V. Badea; C. Paul; F. Peter, Efficient kinetic resolution of 1, 5-dihydroxy-1, 2, 3, 4-tetrahydronaphthalene catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase in batch and continuous-flow system, *Process Biochem.*, **2016**, 51, 2076-2083.
- [226] M. Bilal; M. N. H. Iqbal; S. Z. H. Shah; H. Hu; W. Wang; X. Zhang, Horseradish peroxidase-assisted approach to decolorize and detoxify dye pollutants in a packed bed bioreactor, *J. Environ. Manage.*, **2016**, 183, 836-842.

- [227] S. A. Mohameda; A. A. Darwish, R.M.El-Shishtawy, Immobilization of horseradish peroxidase on activated wool, *Process Biochem.*, **2013**, 48, 649–655.
- [228] M. Bilal; H. M. N. Iqbal; H. Hu; W. Wang; X. Zhang, Enhanced bio-catalytic performance and dye degradation potential of chitosan-encapsulated horseradish peroxidase in a packed bed reactor system, *Sci. Total Environ.*, **2017**, 575, 1352–1360.
- [229] T. M. Silva, P. O. Santiago; L. L. A. Purcena, K. F. Fernandes, Study of the cashew gum polysaccharide for the horseradish peroxidase immobilization — Structural characteristics, stability and recovery, *Mat. Sci. Eng. C- Mater*, **2010**, 30, 526–530.
- [230] I. G. Kolomnikov, A. M. Efremov, T. I. Tikhomirova, N. M. Sorokina, Y. A. Zolotov, Early stages in the history of gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, **2018**, 1537, 109-117.
- [231] G. T. Hermanson, Chapter 10 - Fluorescent Probes, în: G. T. Hermanson (Editor), *Bioconjugate Techniques* (Ediția a 3-a), Academic Press, Cambridge, Statele Unite, **2013**, 395-463.
- [232] H. Cai, X. Liu, J. Zou, J. Xiao, B. Yuan; F. Li, Q. Cheng, Multi-wavelength Spectrophotometric Determination of Hydrogen Peroxide in Water With Peroxidase-Catalyzed Oxidation of ABTS, *Chemosphere*, **2018**, 193 833-839.
- [233] W.R. Carmody, Easily prepared wide range buffer series, *J. Chem. Educ.*, **1961**, 38, 559.

ANEXE

Tabel A.1. Influența pH-ului asupra activității enzimatice a lacazei native în reacția oxidarea a 2,6-dimetoxifenolului.

| pH | Cantitate enzimă nativă [mg] | $\Delta A/\text{timp}$ | Activitate [$\mu\text{moli}/\text{min}/\text{mg}$] |
|-------------------|------------------------------------|------------------------|---|
| Acid citric (1,8) | 0,1 | 0,746 | 271,210 |
| 2,5 | 0,1 | 0,842 | 306,350 |
| 3 | 0,1 | 0,874 | 317,730 |
| 3,5 | 0,1 | 0,906 | 329,540 |
| 4 | 0,1 | 0,835 | 303,610 |
| 4,5 | 0,1 | 0,699 | 254,320 |
| 5 | 0,1 | 0,462 | 168,030 |
| 5,5 | 0,1 | 0,277 | 100,730 |
| 6 | 0,1 | 0,090 | 32,790 |
| 6,5 | 0,1 | 0,022 | 7,920 |
| 7 | 0,1 | 0,003 | 1,060 |

Tabel A.2. Influenta pH-ului asupra activitatii enzimatice a lacazei imobilizate prin legare covalenta pe suport cu grupări epoxi/butil-metacrilat în reacția oxidarea a 2,6-dimetoxifenolului.

| pH | Cantitate biocatalizator [mg] | $\Delta A/\text{timp}$ | Activitate [$\mu\text{moli}/\text{min}/\text{mg}$] |
|----------------------|-------------------------------------|------------------------|---|
| Acid citric (1,8) | 12,1 | 0,014 | 0,043 |
| 2,5 | 12,5 | 0,031 | 0,090 |
| 3 | 12,4 | 0,066 | 0,193 |
| 3,5 | 12,4 | 0,086 | 0,252 |
| 4 | 12,3 | 0,095 | 0,281 |
| 4,5 | 12,5 | 0,076 | 0,222 |
| 5 | 12,5 | 0,063 | 0,182 |
| 5,5 | 12,4 | 0,039 | 0,116 |
| 6 | 12,4 | 0,011 | 0,031 |
| 6,5 | 12,5 | 0,002 | 0,006 |
| 7 | 12,4 | 0,0002 | 0,000 |

LISTA DE LUCRĂRI

Articole publicate în reviste de specialitate cotate (ISI)

1. **P. Borza**, I. C. Benea, I. Bîțcan, A. Todea, S. G. Muntean, F. Péter, Enzymatic degradation of azo dyes using peroxidase immobilized onto commercial carriers with epoxy groups, *Studia UBB Chemia*, **2020**, LXV, 1, 291-303 (F.I. 0,305)
2. A. Todea, **P. Borza**, A. Cimporescu, C. Paul, F. Péter, Continuous kinetic resolution of aliphatic and aromatic secondary alcohols by sol-gel entrapped lipases in packed bed bioreactors, *Catalysis Today*, **2018**, 306, 223-232 (F.I. 4,667)
3. C. Paul, **P. Borza**, A. Marcu, G. Rusu, M. Bîrdeanu, S. Marc Zarcu, F. Péter, Influence of the physico-chemical characteristics of the hybrid matrix on the catalytic properties of sol-gel entrapped *Pseudomonas fluorescens* lipase, *Nanomaterials and Nanotechnology*, **2016**, 6:3 (F.I. 1.730)

Articole publicate în reviste de specialitate indexate în baze de date internaționale (BDI)

1. **P. Borza**, F. Péter, C. Paul, Improved enantioselectivity of *Candida antarctica* A lipase through sol-gel entrapment, *Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara)*, **2015**, 60(74), 2, 49-54, http://www.chemicalbulletin.upt.ro/Chemical-Bulletin-Issue_cDA.html
2. **P. Borza**, F. Péter, I. Hulka, C. Paul, Long-term exposure stability of sol-gel immobilized lipases in organic solvents, *Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara)*, **2015**, 60(74), 1, 25-30, http://www.chemicalbulletin.upt.ro/Chemical-Bulletin-Issue_hiF.html
3. C. Paul, **P. Borza**, F. Péter, High thermal stability of sol-gel entrapped lipases, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, **2015**, 21(2), 173-180, http://www.journal-of-agroalimentary.ro/Journal-of-Agroalimentary-Processes-and-Technologies-Issue_z1w.html
4. S. Popa, S. Boran, C. Paul, **P. Borza**, Esterification of benzoic acid with propylene glycol in an experimental bubble column reactor – Part I, *Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara)*, **2015**, 60(74), 2, 55-59, <http://www.chemicalbulletin.upt.ro/Chemical-Bulletin-Issues.html>
5. A. Ursoiu, **P. Borza**, C. Paul, F. Péter, Influence of silane precursors system composition on the catalytic efficiency of sol-gel immobilized lipases, *Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara)*, **2012**, 57(71), 1, 42-45, http://www.chemicalbulletin.ro/admin/articole/23853art_9%2842-45%29.pdf

Lucrări științifice în volumele unor manifestări științifice din străinătate (în rezumat)

1. **P. Borza**, C. Paul, A. Todea, F. Péter, Sol-gel immobilized biocatalyst for continuous-flow enantioselective acylation, 17th European Congress on Biotechnology, Krakow 3-6 iulie, **2016**, Abstract book, P8-32, Volume 33, Issue S, ISSN 1871-6784.
2. **P. Borza**, F. Péter, C.G. Boeriu, A two-step biocatalytic cascade to obtain aldaric acids by selective oxidation of monosaccharides, 8th European Meeting on Oxizymes, Wageningen, 3-6 iulie, **2016**.
3. **P. Borza**, C. Paul, Francisc Péter, Enhanced stability of new sol-gel entrapped biocatalysts in organic solvents, 3rd European Congress of Applied Biotechnology - ECAB3, Nice 27 septembrie - 1 octombrie **2015**, Abstract book, pag. 923. ISBN: 978910239-82-4.
4. C. Paul, **P. Borza**, F. Péter, Thermal stability of immobilized biocatalysts by sol-gel techniques, 11th International Conference on Renewable Resources & Biorefineries RRB-11, York, Anglia, 3-5 iunie **2015**, abstract book, 71-72.
5. F. Péter, C. Paul, E. Biró, **P. Borza**, A. Todea, Enhancing activity and selectivity of biocatalysts by tailored sol-gel entrapment, XVIII International Sol-gel Conference, Kyoto, 6-11 septembrie, **2015**
5. C. Paul, **P. Borza**, F. Péter, Vinyl silane precursors system for combined sol-gel entrapment and adsorption of Candida antarctica B lipase, 7th International Congress on Biocatalysis, Hamburg 31 august - 4 septembrie **2014**, P3-97, 255, ISBN 978-3-941492-76-9.

Lucrări științifice publicate în volumele unor manifestări științifice internaționale organizate în România (cu referenți științifici) (în rezumat)

1. **P. Borza**, A. Cimporescu, A. Todea, C. Paul, F. Péter, Continuous kinetic resolution of racemic aromatic alcohols in packed bed bioreactors, XXXIV-th ROMANIAN CHEMISTRY CONFERENCE, Valcea, 4-7 octombrie, **2016**, <http://conferinta.oltchim.ro/index1.php?lb=en&var=1> .
2. A. Todea, **P. Borza**, A. Cimporescu, C. Paul, F. Péter, Continuous kinetic resolution of aliphatic and aromatic secondary alcohols by sol-gel entrapped lipases in packed bed bioreactors, The 11th International Symposium of The Romanian Catalysis Society - RomCat, Timisoara, 6-8 iunie, **2016**, <http://www.chimie.unibuc.ro/romcat/> .
3. **P. Borza**, C. Paul, F. Péter, Sol-gel immobilized Burkholderia cepacia lipase with vinyl silane precursors system, The XVIth International Symposium "Young People and Multidisciplinary Research", Timișoara 13-14 Noiembrie **2014**, abstract book pp. 15. (Publicare abstract în volumul de rezumate, pag. 15) <http://www.acmv.ro/j/lang-ro/simpozion-2014.html>

4. C. Paul, **P. Borza**, F. Péter, Kinetic resolution of secondary alcohols by a nanoscale biocatalyst system using *Pseudomonas fluorescens* lipase, XXXIIIrd Romanian Chemistry Conference, Călimănești-Căciulata, Vâlcea 1-3 Octombrie **2014**, P.S.I. 30. <http://conference.oltchim.ro>
5. **P. Borza**, A. Marcu, C. Paul, F. Péter, Vinyl silane precursors system for sol-gel immobilized lipases, The XV International Symposium Young People and Multidisciplinary Research, Timișoara 14-15 Noiembrie **2013**, abstract book pp. 15.