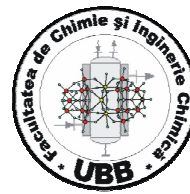




**UNIVERSITATEA BABEŞ-BOYAI  
CLUJ-NAPOCA**



**Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică  
Școala Doctorală Chimie**

**Adiții/eliminări stereoselective și  
sinteza biodieselului cu enzime  
imobilizate pe nanotuburi de carbon  
funcționalizate**

**Rezumat teză de doctorat**

**Student doctorand: Judith-Hajnal VÁRI (căs. Bartha-Vári)**

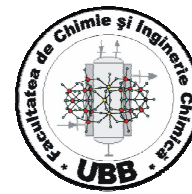
**Conducător științific: Prof. Dr. Ing. Florin Dan IRIMIE**

**Cluj-Napoca**

**2016**



**UNIVERSITATEA BABEŞ-BOYAI**  
**CLUJ-NAPOCA**



**Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică**

**Școala Doctorală Chimie**

**Adiții/eliminări stereoselective și sinteza  
biodieselului cu enzime imobilizate pe  
nanotuburi de carbon funcționalizate**

Rezumat teză de doctorat

**Student doctorand: Judith-Hajnal VÁRI (căs. BARTHA-VÁRI)**

**Comisie**

**Președinte**

Prof. Cristian SILVESTRU – Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

**Conducător științific**

Prof. Florin Dan IRIMIE - Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

**Referenți**

Prof. Francisc PETER, Universitatea Politehnică, Timișoara

Prof. Valentin ZAHARIA – Universitatea de Medicină și Farmacie Iuliu Hațieganu,  
Cluj-Napoca

Conf. Niculina Hădade - Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca

**Cluj-Napoca**

**2016**

## Cuprins

Lista figurilor .....	VII
Lista schemelor .....	IX
Lista tabelelor .....	X
Abrevieri .....	XI
1 Introducere .....	1
1.1 Imobilizarea enzimelor .....	1
1.1.1 Reticulare .....	2
1.1.2 Incapsulare .....	3
1.1.3 Legare pe suport.....	3
1.2 Nanotuburi de carbon.....	4
1.2.1 Fenilalanin amoniac liaza (PAL) .....	7
1.2.2 Lipaze.....	10
2 Rezultate și discuții.....	13
2.1 Imobilizarea fenilalanin amoniac liazei din <i>Petroselinum crispum</i> (PcPAL) pe nanotuburi cu un singur perete funcționalizate pentru biotransformări stereoselective în reacții batch și în reactoare continue .....	13
2.1.1 Introducere .....	13
2.1.2 Obiectivele studiului .....	14
2.1.3 Imobilizarea covalentă a PcPAL pe nanotuburi de carbon funcționalizate cu grupări carboxil.....	14
2.1.4 Imobilizarea covalentă a PAL pen SwCNT <sub>NH2</sub> .....	17
2.1.5 Comportamentul biocatalitic al enzimelor imobilizate în biotransformări stereoselective al acidului 2-amino-3-(tiofen-2-il) propanoic și al acidului 3-(tiofen-2-il)acrilic în reacții batch .....	17
2.1.6 Reacția de adiție de amoniac la acidul 3-(tiofen-2-il)acrilic 2 mediată de SwCNT <sub>COOH</sub> -PAL <sup>II</sup> în reactor continuu .....	22
2.1.6.1 Adiția de amoniac la 2 în reactor continuu fără presiune .....	22
2.1.6.2 Adiția de amoniac la 2 în reactor continuu cu presiune .....	23
2.1.7 Investigarea tracției de adiție de amoniac la acidul 3-(tiofen-2-il)acrilic 2 catalizată de SwCNT <sub>NH2</sub> -PAL într-un microreactor continuu .....	28
2.1.8 Concluzii .....	31
2.2 Lipaze imobilizate pe nanotuburi de carbon pentru producția de biodiesel.....	33
2.2.1 Introducere .....	33
2.2.2 Lipaza B din <i>Candida antarctica</i> imobilizată pe nanotuburi de carbon pentru producția de biodiesel .....	34
2.2.2.1 Obiectivele studiului .....	34
2.2.2.2 Imobilizarea covalentă a CaL-B pe nanotuburi de carbon cu un singur perete .....	34
2.2.2.3 Transesterificarea uleiului de floarea soarelui cu SwCNT-CaL-B .....	36

2.2.2.4	Efectul solventului organic asupra reacției de etanoliză.....	37
2.2.2.5	Efectul cantității de apă asupra producției de biodiesel.....	38
2.2.2.6	Efectul raportului substrat-solvent asupra reacției de etanoliză.....	39
2.2.2.7	Efectul concentrației de etanol asupra producției de biodiesel.....	40
2.2.2.8	Efectul tipului și lungimii linkerului și a prezenței surfactantului asupra reacției de transesterificare.....	41
2.2.2.9	Efectul temperaturii.....	42
2.2.2.10	Reutilizabilitatea biocatalizatorului.....	43
2.2.2.11	Profilul de timp al reacției de transesterificare.....	44
2.2.2.12	Concluzii.....	45
2.2.3	Lipaza Amano din <i>Pseudomonas Fluorescens (L-AK)</i> imobilizată pe nanotuburi de carbon în producția de biodiesel.....	46
2.2.3.1	Obiectivele studiului.....	46
2.2.3.2	Imobilizarea covalență a L-AK pe SwCNT <sub>COOH</sub> .....	46
2.2.3.3	Transesterificarea uleiului de floarea soarelui cu SwCNT-L-AK.....	46
2.2.3.4	Efectul solventului organic asupra producției biodieselului.....	47
2.2.3.5	Efectul conținutului de apă asupra producției biodieselului.....	47
2.2.3.6	Efectul încălzirii cu enzimă asupra reacției de transesterificare.....	48
2.2.3.7	Efectul concentrației de etanol asupra producției de biodiesel.....	49
2.2.3.8	Producția de biodiesel în reactor continuu.....	49
2.2.3.9	Concluzii.....	50
3	Concluzii generale.....	52
4	Partea experimentală.....	53
4.1	Materiale.....	53
4.1.1	Enzime.....	53
4.1.2	Reactanți.....	53
4.1.3	Echipamente.....	54
4.2	Metode de imobilizare.....	55
4.2.1	Imobilizarea PcPAL pe nanotuburi de carbon funcționalizate.....	55
4.2.1.1	Adsorbția PAL pe SwCNT <sub>COOH</sub> .....	55
4.2.1.2	Legarea covalență a PAL pe SwCNT <sub>COOH</sub> prin activare diimidică.....	56
4.2.1.3	Legarea covalență a PAL pe SwCNT <sub>COOH</sub> prin linker GDE.....	57
4.2.2	Funcționalizarea SwCNT cu grupări amino.....	59
4.2.2.1	Legarea covalență a PAL pe SwCNT <sub>NH2</sub> prin linker GDE.....	60
4.2.3	Imobilizarea lipazelor pe nanotuburi de carbon cu un singur perete.....	61
4.2.3.1	Legarea covalență a CaL-B pe SwCNT <sub>COOH</sub> prin linker GDE.....	61
4.2.3.2	Legarea covalență a CaL-B prin linker de tip BS(PEG) <sub>5</sub> .....	64
4.2.3.3	Imobilizarea covalență a L-AK pe SwCNT <sub>COOH</sub> prin linker GDE.....	66

4.3 Eliminare de amoniac din acid 2-amino-3-(tiofen-2-yl)propanoic 1 cu SwCNT <sub>COOH</sub> -PAL în reacții batch .....	69
4.4 Adiție de amoniac la acid 3-(tiofen-2-il)acrilic 2 cu SwCNT <sub>COOH</sub> -PAL în reacții batch .....	70
4.5 Adiție de amoniac la acid 3-(tiofen-2-il)acrilic 2 mediată de SwCNT <sub>COOH</sub> -PAL <sup>II</sup> în reactor continuu fără presiune.....	70
4.6 Adiție de amoniac la acid 3-(tiofen-2-il)acrilic 2 cu SwCNT <sub>COOH</sub> -PAL <sup>II</sup> în reactor continuu cu presiune .....	71
4.7 Eliminare de amoniac din 1 cu SwCNT <sub>NH2</sub> -PAL.....	72
4.8 Adiție de amoniac la 2 cu SwCNT <sub>NH2</sub> -PAL în reacție batch.....	72
4.9 Adiție de amoniac la acid 3-(tiofen-2-il)acrilic 2 cu SwCNT <sub>NH2</sub> -PAL în reactor continuu în .....	72
4.10 Producție de biodiesel prin etanoliză bazică .....	73
4.11 Compoziția de acizi grași ai uleiului de floarea soarelui .....	74
4.12 Producția de biodiesel prin transesterificare enzimatică mediată de SwCNT <sub>COOH</sub> -CaL-B ....	74
4.13 Producția de biodiesel prin transesterificare enzimatică mediată de SwCNT <sub>COOH</sub> -L-AK.....	76
4.14 Producția de biodiesel mediată de SwCNT <sub>COOH</sub> -L-AK în reactor continuu.....	77
4.15 Determinarea conversiilor pentru reacțiile de transesterificare.....	77
5 Mulțumiri .....	81
6 Lista de publicații.....	83
7 Referințe .....	85

**Cuvinte cheie:** nanotuburi de carbon cu un singur perete funcționalizate, imobilizare, biotransformări, sinteza biodieselului

# 1 Introducere

## 1.1 Imobilizarea enzimelor

Enzimele sunt folosite ca biocatalizatori pe scară largă în multe domenii, cum ar fi industria produselor chimice fine, industria produselor farmaceutice,<sup>1</sup> în industria alimentară și a băuturilor, industria cosmeticelor precum și pentru producția de biocombustibili.<sup>2</sup> Enzimele sunt biocompatibile și pot fi obținute din surse regenerabile, procesele enzimatică fiind ecologice și eficiente din punct de vedere al costurilor.<sup>3</sup> Cu toate acestea, enzimele sunt instabile și reutilizarea lor este dificilă, ceea ce poate împiedica aplicarea lor la scară industrială.<sup>4</sup> Prin folosirea enzimelor în formă imobilizată rezultă biocatalizatori cu reutilizabilitate și stabilitate.<sup>5</sup> Pe lângă stabilitatea îmbunătățită și reutilizabilitatea enzimelor imobilizate, imobilizarea poate permite, de asemenea, schimbări favorabile de temperatură optimă sau pH optim, co-imobilizarea cu alte enzime, și poate reduce riscul de contaminare.<sup>4</sup> În plus, prin diferite tehnici de imobilizare enantioselectivitatea enzimelor poate fi de asemenea îmbunătățită.<sup>6</sup> Față de aceste avantaje imobilizarea poate avea și dezavantaje, poate cauza limitări de transfer de masă, prin imobilizare se poate reduce activitatea enzimelor, poate provoca o denaturare a enzimelor, modificând proprietățile finale ale enzimei, și poate produce, de asemenea, creșterea costurilor.<sup>7</sup>

Principalele strategii de imobilizare a enzimelor pot fi rezumate în trei categorii: legarea pe un suport solid, reticulare și încapsulare. Metoda de imobilizare este unică pentru fiecare enzimă, și trebuie aleasă prin compromis între avantajele și dezavantajele menționate. Proprietățile materialelor de suport pot, de asemenea, influența performanța enzimei imobilizate.<sup>8</sup>

## 1.2 Nanotuburile de carbon

Nanotuburile de carbon sunt formate din atomi de carbon, care sunt structurate în straturi de grafenă înfășurate în formă de cilindru.<sup>9</sup>

Nanotuburile pot fi clasificate în două grupe: nanotuburi de carbon cu un singur perete și cu pereți multipli (SwCNT și MwcNTs) MwcNTurile sunt compuse din SwCNT-uri expuse concentric.<sup>10</sup>

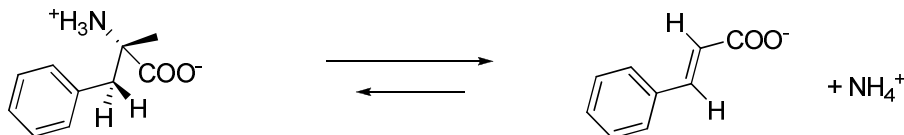
Utilizarea nanotuburilor de carbon variază de la structuri la scară largă în automobile la scară de nanometri în electronice.<sup>11</sup> Nanotuburile de carbon sunt utilizate în principal în materiale compozite,<sup>12</sup> dar și în fibre de rezistență la tracțiune și în producția materialelor ignifuge.<sup>13</sup>

Datorită proprietăților lor structurale, mecanice, electrice, electrochimice unice, de asemenea, câștigă interes în aplicații biologice utilizate în principal în interacțiune cu proteine cu scopul

de a dezvolta biosenzori.<sup>14</sup> Nanotuburile de carbon sunt utilizate pe scară largă pentru imobilizarea biomacromoleculilor, exploatând, proprietățile lor electrice mecanice, termice și biocompatibilitatea.<sup>15</sup>

### 1.3 Fenilalanin amoniac liaza (PAL)

Amoniac-liazele acționează pe legături C-N pentru a cataliza formarea legăturilor alfa, beta-nesaturate prin eliminarea amoniacului din substraturile lor.<sup>16</sup> Fenilalanin amoniac-liazele (PAL EC 4.3.1.24, EC 4.3.1.25) sunt enzime homotetramere care efectuează dezaminarea non-oxidativă al L-fenilalaninei în acid (*E*) cinamic<sup>17</sup> (**Schema 1**), precursorul diferitelor fenilpropanoide, cum ar fi lignine, flavonoide și cumarine,<sup>18</sup> dar la pH ridicat și concentrația de amoniac ridicată și reacția inversă este posibilă, rezultând L-fenilalanina.<sup>19</sup>



**Schema 1** Dezaminarea non-oxidativă al L-fenilalaninei

### 1.4 Lipaza B din *Candida Antractica* (CaL-B)

Drojdia *Candida antarctica* a fost izolată inițial în Antarctica. Ea produce două lipaze, CaL-A și CaL-B.<sup>20</sup> Aceste lipaze au fost purificate și caracterizate.<sup>21</sup> Structura tridimensională și secvența de aminoacizi ai enzimei CaL-B a fost rezolvată de către Uppenberg și colab., dezvăluind că acesta este compusă de 317 aminoacizi.<sup>22</sup> pH-ul optim al enzimei este 7, dar lipaza este stabilă în intervalul de pH 3,5- 9,5 . Temperatura de denaturare este de aproximativ 50-60 °C.<sup>23</sup>

Situsul activ al CaL-B conține triada catalitică Ser105-His224-Asp187, care este comună tuturor serină-hidrolazelor,<sup>24</sup> o gaură oxianionică (care stabilizează starea de tranziție) și un buzunar de stereospecificitate.<sup>25</sup> Buzunarul de stereospecificitate îi conferă enzimei selectivitate de substrat mare față de alcooli secundari.<sup>24</sup>

### 1.5 Lipaza amano din *Pseudomonas fluorescens* (L-AK)

L-AK a fost caracterizată de către cercetătorii Amano. Enzima are o masă molară de 33 kDa. pH-ul optim al enzimei este 8, în timp ce temperatura optimă este 60°C. Soluția de L-AK este stabilă într-un interval larg de pH (4 - 10).<sup>26</sup> S-a demonstrat că utilizat în alcooliza trigliceridelor are o toleranță ridicată față de etanol și metanol.<sup>27,28</sup>

## 2 Rezultate și discuții

### 2.1 Imobilizarea fenilalanin amoniac liazei din *Petroselinum crispum* (*PcPAL*) pe nanotuburi de carbon funcționalizate cu un singur perete pentru biotransformări stereoselective în reacții batch și în reactoare continue

#### 2.1.1 Obiectivele studiului

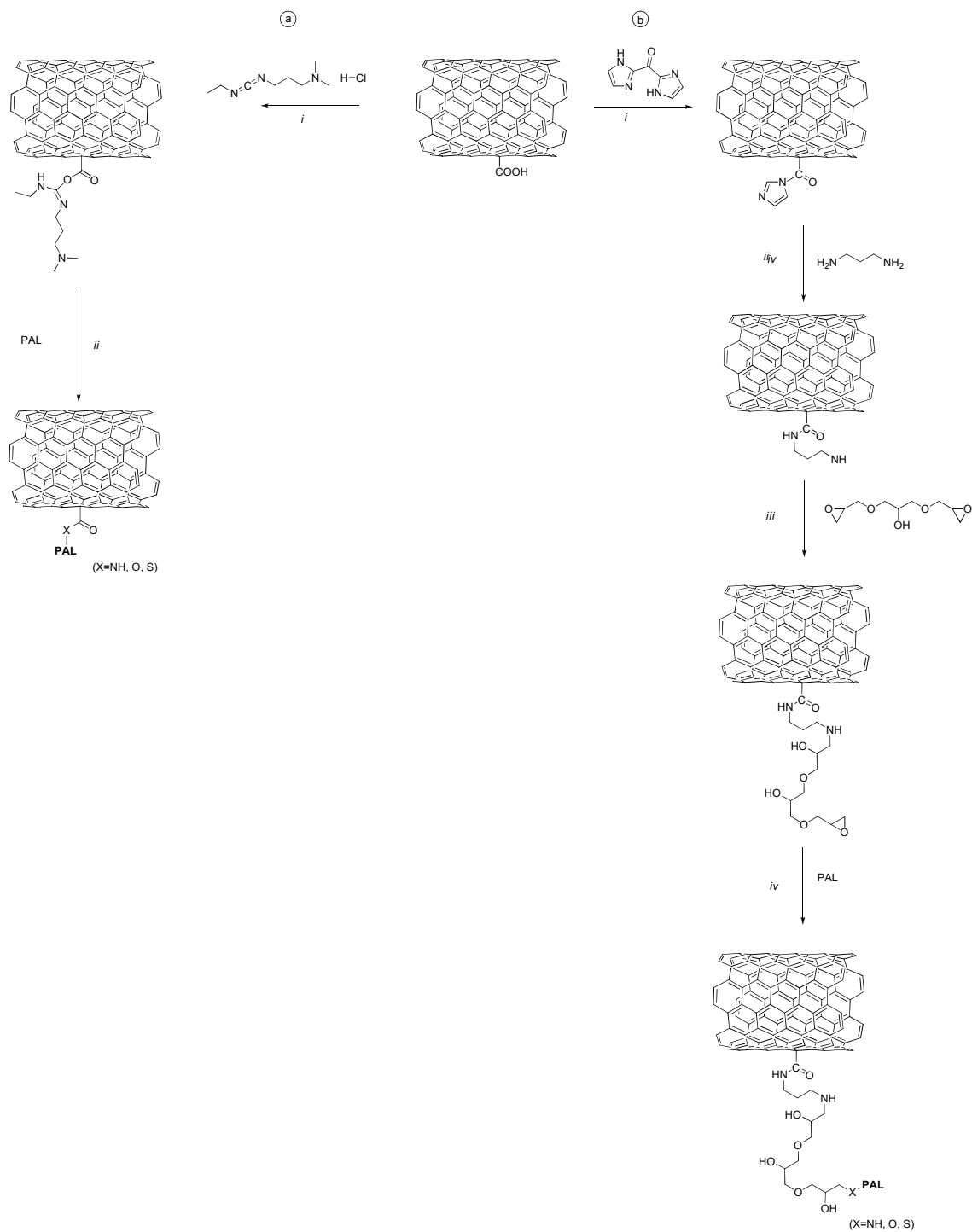
Obiectivele studiului au constat din imobilizarea enzimei *PcPAL* pe nanotuburi de carbon funcționalizate ( $\text{SwCNT}_{\text{COOH}}$  și  $\text{SwCNT}_{\text{NH}_2}$ ) și testarea activității și reutilizabilității biocatalizatorului rezultat în reacții batch și în reactoare continue.

#### 2.1.2 Imobilizarea covalentă a enzimei *PcPAL* pe nanotuburi de carbon funcționalizate cu grupări carboxil

Imobilizarea covalentă a enzimei *PcPAL* pe nanotuburi de carbon s-a efectuat prin două metode. În prima procedură de imobilizare 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimid hidroclicid, EDAC.HCl, s-a folosit pentru a activa grupările carboxil de pe suprafața nanotuburilor (**Schema 2a**). Deși această metodă de imobilizare a furnizat conversii de imobilizare ridicate, 89.5% din cantitatea de enzimă s-a legat de suport iar biocatalizatorul obținut ( $\text{SwCNT}_{\text{COOH-PAL}}^{\text{I}}$ ) a fost stabil în reacția de eliminare amoniacului din **1**, nu a fost destul de stabil în condițiile mult mai dure de adiție de amoniac la **2**, realizate în soluție de amoniac de 6M (**Tabel 1**).

Astfel, pentru a crea enzimă imobilizată cu o stabilitate ridicată, glicerol diglicidil eter (GDE) s-a folosit pentru a atașa enzima pe suprafața nanotuburilor funcționalizate cu 1,3-diaminopropan (**Schema 2b**). Produsul obținut ( $\text{SwCNT}_{\text{COOH-PAL}}^{\text{II}}$ ) s-a caracterizat prin reproductibilitate și conversii de imobilizare ridicate (95.5% din cantitatea de enzimă legată pe  $\text{SwCNT}_{\text{COOH}}$ ).

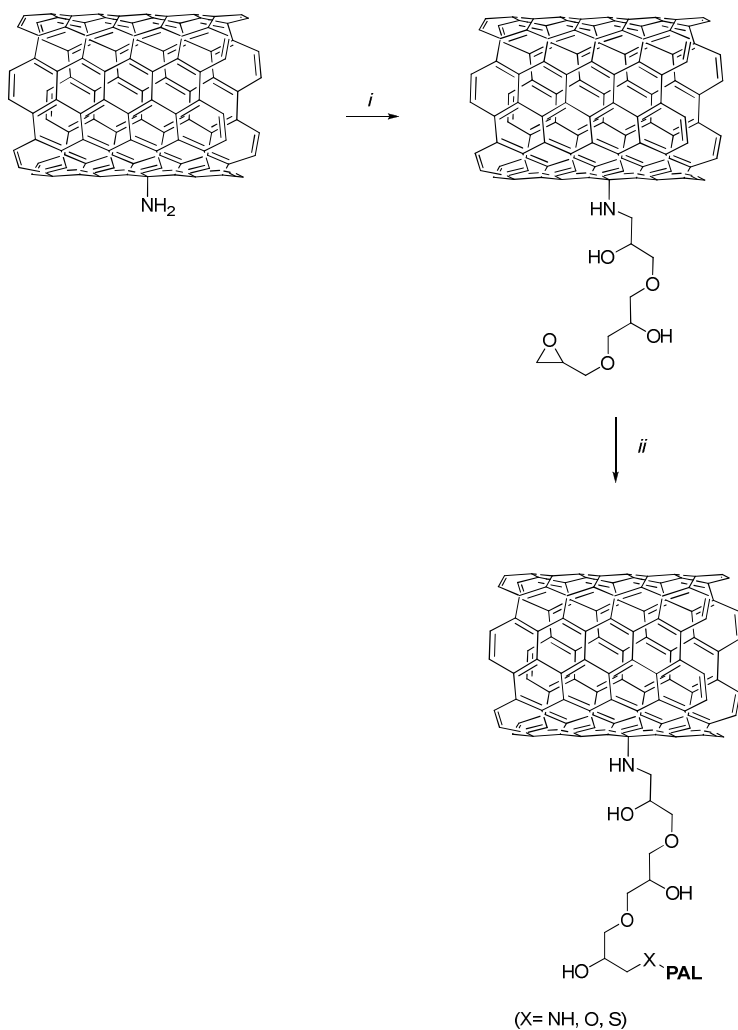




**Schema 2** Imobilizarea PcPAL pe SwCNT<sub>COOH</sub> a) prin activare cu EDAC: *i*) EDAC.HCl în soluție tampon Tris (0.1M, pH 8.8); *ii*) PcPAL în soluție tampon Tris (0.1M, pH 8.8), b) prin linker GDE: *i*) CDI în CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; *ii*) H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> în apă *iii*) glicerol diglicidil eter în CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; *iv*) PAL în soluție tampon Tris (0.1M, pH 8.8)

### 2.1.3 Imobilizare covalentă a PAL pe SwCNT<sub>NH2</sub>

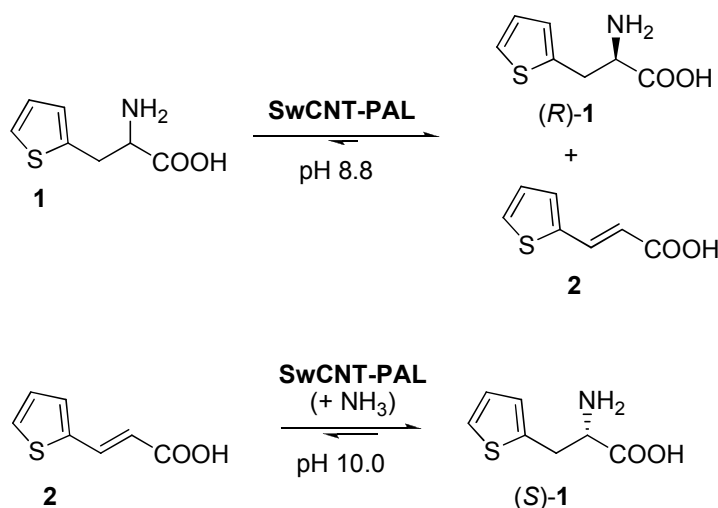
SwCNT<sub>NH2</sub> s-a obținut prin aminarea nanotuburilor de carbon accesibile comercial printr-o reacție asistată de microunde. Pentru imobilizarea enzimei PcPAL pe SwCNT<sub>NH2</sub> s-a folosit o metodă similară imobilizării aceleiași enzime pe SwCNT<sub>COOH</sub>. Astfel glicerol diglicidil eter s-a utilizat pentru a lega enzima pe suprafața nanotuburilor (**Schema 3**). Produsul, (SwCNT<sub>NH2</sub>-PAL), s-a caracterizat prin reproductibilitate și conversii de imobilizare ridicate (97% din cantitatea de enzimă legată pe SwCNT<sub>NH2</sub>).



**Schema 3** Imobilizarea PAL pe SwCNT<sub>NH2</sub> *i*) CDI în CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; *ii*) PAL în soluție tampon Tris (0.1 M, pH 8.0)

### 2.1.4 Comportamentul biocatalitic ale enzimelor imobilizate în biotransformări stereoselective al acidului 2-amino-3-(tiofen-2-il) propanoic și al acidului 3-(tiofen-2-il)acrilic în reacții batch

*PcPAL* este selectivă în reacția de eliminare de amoniac din acidul 2-amino-3-(tiofen-2-il) propanoic și în reacția de adiție de amoniac la acidul 3-(tiofen-2-il)acrilic<sup>29</sup>. Prezervarea enantiopreferinței oferă posibilitatea obținerii ambilor enantiomeri. Enzimele imobilizate pe suprafața  $\text{SwCNT}_{\text{COOH}}$  și  $\text{SwCNT}_{\text{NH}_2}$  s-au testat ca și biocatalizatori în reacția de eliminare de amoniac din **1** și în reacția de adiție de amoniac la **2** în reacții batch efectuate la temperatura camerei (**Schema 4**).



**Schema 4** SwCNT-PAL în reacția de eliminare de amoniac din **1** și adiție de amoniac la **2**.

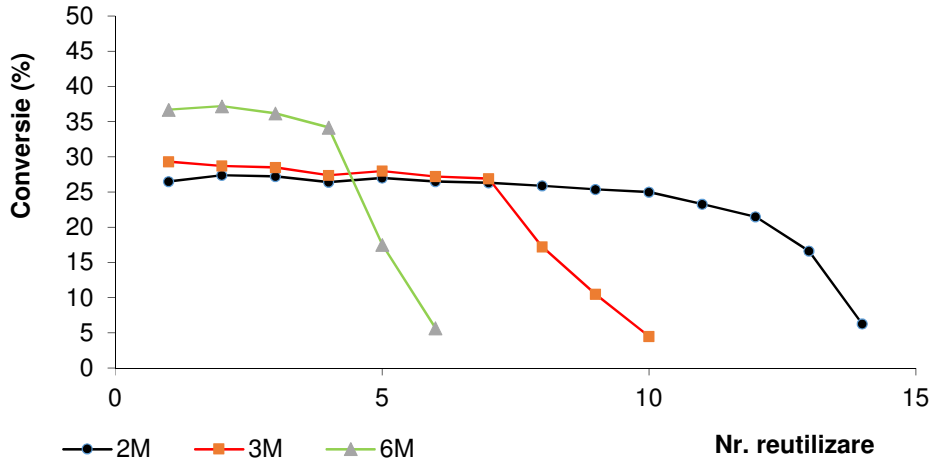
$\text{SwCNT}_{\text{COOH}}\text{-PAL}$  și  $\text{SwCNT}_{\text{NH}_2}\text{-PAL}$  au arătat conversii mari în rezoluția cinetică a recematurii **1** aproape de conversia de 50% teoretic posibilă. Experimentele de reutilizabilitate nu au arătat pierderi semnificative în activitatea inițială a enzimelor (**Tabel 1**). În condițiile mai dure necesare adiției de amoniac (soluție de amoniac 6M, pH 10), preparatele enzimatică nu au fost la fel de stabile. Dintre cele două forme de enzimă imobilizată,  $\text{SwCNT}_{\text{COOH}}\text{-PAL}^{\text{II}}$  a permis un număr mai mare de reutilizări, păstrând peste 85% din activitatea sa inițială după 4 utilizări.

$\text{SwCNT}_{\text{NH}_2}\text{-PAL}$  a arătat conversii mai ridicate, însă nu a fost la fel de stabilă în experimentele de reutilizabilitate.

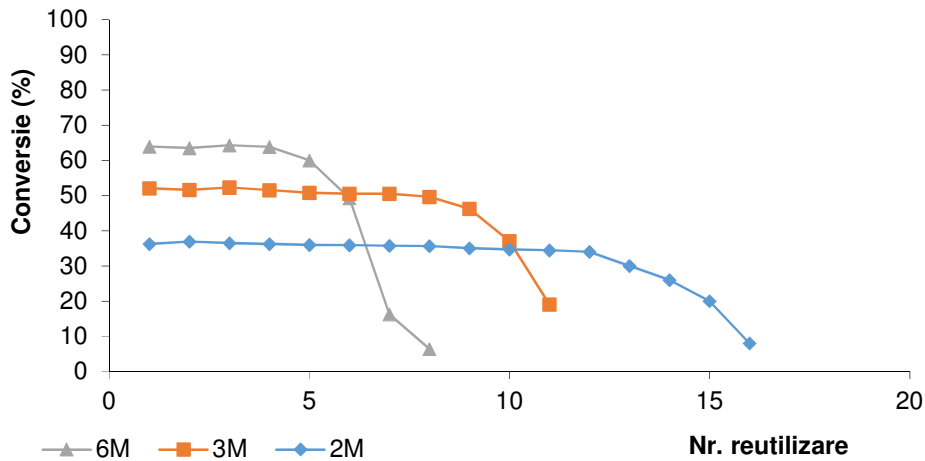
**Tabel 1** Conversia reacțiilor catalizate de cele două preparate enzimatic (25 °C, 17 h)

Nr.	Eliminare din 1 (pH 8.8.) Conversie (%)			Adiție la 2 (4.5 mM în 6 M NH <sub>3</sub> , pH 10.0) Conversie (%)		
	SwCNT <sub>COOH</sub> - PAL <sup>I</sup>	SwCNT <sub>COOH</sub> - PAL <sup>II</sup>	SwCNT <sub>NH<sub>2</sub></sub> - PAL	SwCNT <sub>COOH</sub> - PAL <sup>I</sup>	SwCNT <sub>COOH</sub> - PAL <sup>II</sup>	SwCNT <sub>NH<sub>2</sub></sub> - PAL
1	48.4	49.2	49.6	36.9	36.7	64.1
2	49.2	48.5	48.5	24.2	37.2	41.3
3	49.0	48.8	48.8	3.8	36.2	45.1
4	49.3	47.4	47.4		34.2	16.4
5	45.6	46.3	46.3		17.5	6.4
6	43.7	42.4	42.4		5.7	
7	42.5	42.3	42.3		2.2	

Condițiile de adiție la 2 (6 M amoniac, pH 10) s-au dovedit prea dure chiar și pentru cele mai durabile preparate enzimatic (SwCNT<sub>COOH</sub>-PAL<sup>II</sup>), astfel concentrația soluției de amoniac s-a scăzut la 3 M respectiv 2M. La concentrațiile mai mici de amoniac biocatalizatorii au fost mai stabili. Folosind soluție de amoniac de 2 M SwCNT<sub>COOH</sub>-PAL<sup>II</sup> și-a păstrat mai mult de 80% din activitatea inițială după 12 utilizări, iar SwCNT<sub>NH<sub>2</sub></sub>-PAL și-a păstrat mai mult de 82% din activitatea inițială după 12 cicluri (**Figura 1** și **Figura2**).

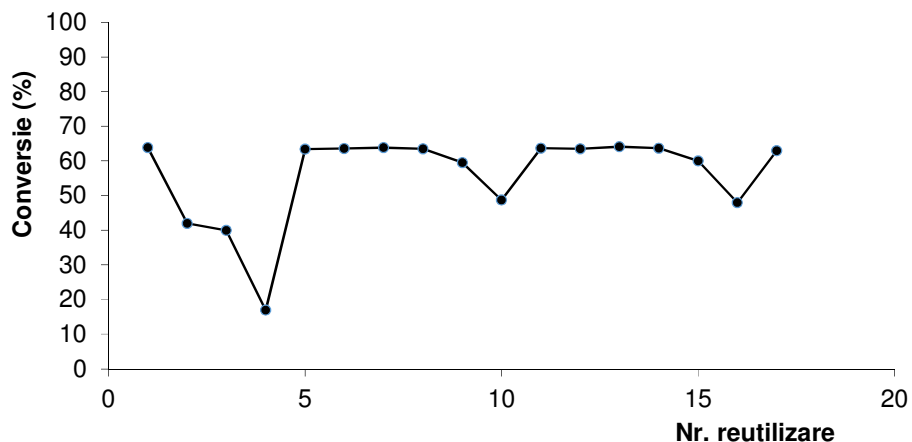


**Figura 1** Reutilizabilitatea SwCNT<sup>COOH</sup>-PAL<sup>II</sup> în reacția de adiție de amoniac la **2** la diferite concentrații de amoniac (2 M, 3 M și 6 M; 25 °C, 17 h, pH 10.0).



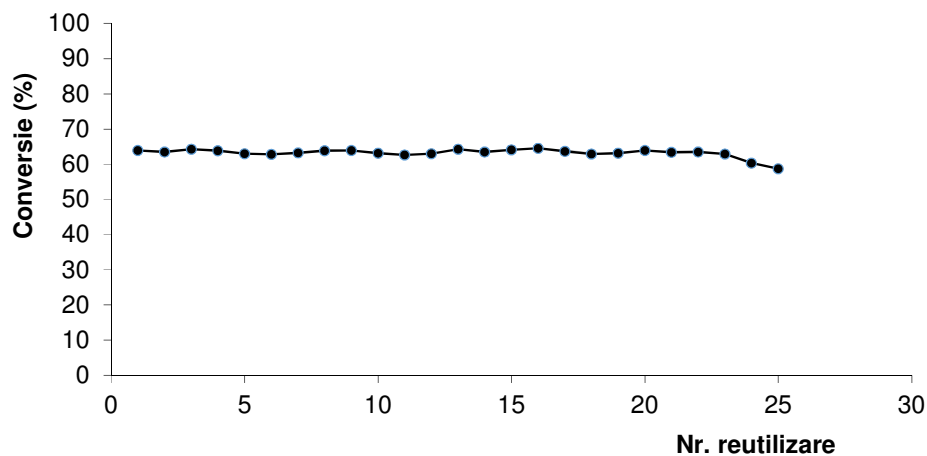
**Figura 2** Reutilizabilitatea SwCNT<sup>COOH</sup>-NH<sub>2</sub> în reacția de adiție de amoniac la **2** la diferite concentrații de amoniac (2 M, 3 M și 6 M; 25 °C, 17 h, pH 10.0).

Pentru a crește durabilitatea enzimei imobilizate în reacția de adiție, atunci când s-a observat inactivarea aparentă a biocatalizatorului SwCNT<sup>NH<sub>2</sub></sup>-PAL, acesta s-a spălat cu o soluție de tampon fosfat pH 6. După această procedură, enzima și-a recăpatat activitatea inițială pentru câteva cicluri (**Figura 3**). Când s-a observat inactivarea, procedura de spălare s-a repetat.



**Figura 3** Reacția de adiție de amoniac la **2**; spălarea enzimei cu tampon fosfat pH=6 când se observă inactivarea aparentă

În continuare, la reacția de adiție de amoniac mediată de SwCNT<sub>NH2</sub>-PAL (6 M soluție de amoniac, pH=10), după fiecare utilizare enzima s-a spălat cu soluția de tampon fosfat pH=6. În aceste condiții enzima și-a păstrat peste 90% din activitatea inițială chiar și după 25 de reutilizări (**Figura 4**).

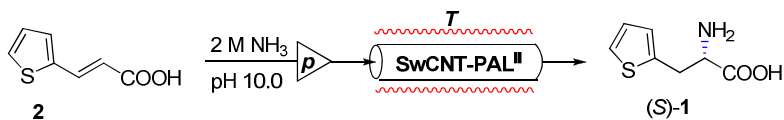


**Figura 4** Adiția de amoniac la **2**; spălarea enzimei cu tampon fosfat (pH 6) după fiecare utilizare.

### 2.1.5 Reacția de adiție de amoniac la acid 3-(tiofen-2-il)acrilic 2 mediată de SwCNT<sub>COOH</sub>-PAL<sup>II</sup> în reactor continuu

Studiile inițiale de adiție de amoniac la acid 3-(tiofen-2-il)acrilic în reactor continuu a indicat o aparentă inactivare a enzimei, care se poate atribui formării bulelor, astfel studiile au fost conduse la o presiune de 15 bari. În aceste condiții inactivarea aparentă a enzimei nu s-a observat.

Adiția de amoniac în reactor continuu s-a studiat într-un sistem SynBioCart umplut cu enzima imobilizată. Bioreactorul s-a legat de termostatul unui aparat HPLC cu control asupra presiunii și a temperaturii (**Figura 5**).



**Figura 5** Adiția de amoniac la acid 3-(tiofen-2-il)acrilic **2** catalizat de SwCNT<sub>COOH</sub>-PAL<sup>II</sup> în reactor continuu (debit 0.1 mL/min)

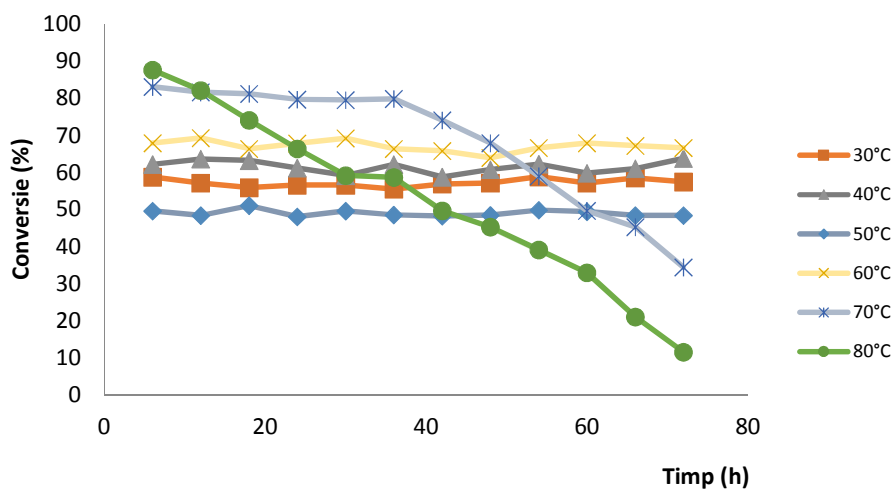
Primul obiectiv a constat din compararea ratei de reacție specifice a reacției de adiție de amoniac la **2** mediate de SwCNT<sub>COOH</sub>-PAL<sup>II</sup> la 30 °C în reacție batch și în reactor continuu.

Rata de reacție specifică este o posibilă măsură a productivității biocatalizatorului.

Rata de reacție specifică pentru reactor continuu ( $r_{\text{flow}}$ ) poate fi calculat din concentrația de produs ( $[P]$ ,  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ), debit ( $f$ ,  $\text{mL min}^{-1}$ ) și masa biocatalizatorului ( $m_e$ , g)  $\{r_{\text{flow}} = ([P] \times f) / m_e\}$ .<sup>30</sup> Pentru reacția batch rata de reacție specifică ( $r_{\text{batch}}$ ) se poate calcula din cantitatea de produs ( $n_p$ ,  $\mu\text{mol}$ ), timpul de reacție ( $t$ , min) și masa biocatalizatorului ( $m_e$ , g)  $\{r_{\text{batch}} = n_p / (t \times m_e)\}$ .<sup>30</sup>

Reacția batch și cel în sistem continuu în soluție de amoniac 2 M s-au comparat la conversia de 58%. Pentru sistemul continuu valoarea ratei specifice de reacție ( $r_{\text{flow}} = 2.39 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) era semnificativ mai mare decât cel pentru sistem batch ( $r_{\text{batch}} = 1.34 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ).

Influența temperaturii pentru reacția de adiție de amoniac la **2** s-a investigat în intervalul de temperatură 30 - 80 °C (**Figura 6**). Conversia reacției de adiție de amoniac la **2** în sistem continuu a rămas constant și după 72 de ore la temperaturi de până la 60 °C. Aceste rezultate indică durabilitatea îmbunătățită a enzimei imobilizate.

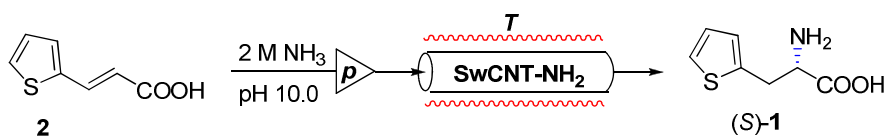


**Figura 6.** Efectul temperaturii asupra stabilității în timp a reacției de adiție mediată de SwCNT<sub>COOH</sub>-PAL<sup>II</sup> în intervalul de temperatură 30 - 80 °C în reactor continuu

### 2.1.6 Reacția de adiție de amoniac la acid 3-(tiofen-2-il)acrilic 2 mediată de SwCNT<sub>NH2</sub>-PAL în reactor continuu

Pentru a evita formarea bulelor, reacția de adiție de amoniac la **2** în sistem continuu mediată de SwCNT<sub>NH2</sub>-PAL s-a realizat, de asemenea la presiune de 15 bari, astfel inactivarea aparentă a enzimei nu s-a observat.

Pentru reacția de adiție de amoniac la **2** în sistem continuu mediată de SwCNT<sub>NH2</sub>-PAL s-a utilizat același sistem ca și în cazul reacției de adiție mediată de SwCNT<sub>COOH</sub>-PAL<sup>II</sup> (**Figura 7**).

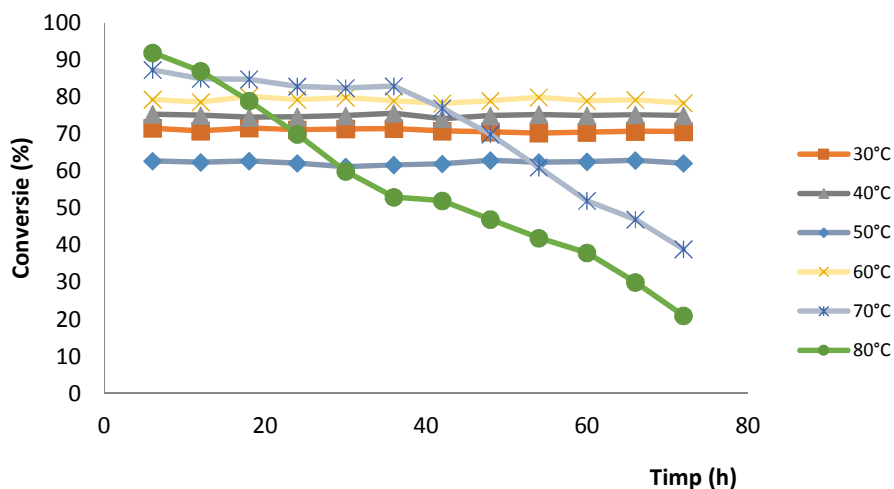


**Figura 7** Adiția de amoniac la acid 3-(tiofen-2-il)acrilic **2** catalizat de SwCNT<sub>COOH</sub>-NH<sub>2</sub> în reactor continuu (debit 0.1 mL/min)

Ca și în cazul reacției catalizate de SwCNT<sub>COOH</sub>-PAL<sup>II</sup> primul scop a constat în compararea ratei de reacție specifică pentru reacția de adiție de amoniac la **2** în reacția batch și sistemul continuu la 30°C. Rata de reacție specifică pentru reacția în reactor continuu ( $r_{\text{flow}} = 3.2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) era mai ridicată decât cel pentru reacția batch ( $r_{\text{batch}} = 1.6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$ ), valorile obținute fiind mai mari decât în cazul reacțiilor catalizate de SwCNT<sub>COOH</sub>-PAL<sup>II</sup>.



Influența temperaturii pentru reacția de adiție de amoniac la **2** s-a investigat în intervalul de temperatură 30 - 80 °C (**Figura 8**). Conversia reacției de adiție de amoniac la **2** în sistem continuu a rămas constant și după 72 de ore la temperaturi de până la 60 °C.



**Figura 8.** Efectul temperaturii asupra stabilității în timp a reacției de adiție mediată de SwCNT<sub>NH2</sub>-PAL în intervalul de temperatură 30 - 80 °C în reactor continuu

### 2.1.7 Concluzii

Prezentul studiu demonstrează că nanotuburile de carbon cu un singur perete funcționalizate cu grupări carboxil și amino (SwCNT<sub>COOH</sub> și SwCNT<sub>NH2</sub>) pot fi utilizate ca suport pentru imobilizarea covalentă a fenilalanin amoniac liazei din *Petroselinum crispum*.

În cazul nanotuburilor funcționalizate cu grupări carboxil cele mai durabile preparate enzimatic s-au obținut prin folosirea glicerol diglicidil eterului ca și linker pentru imobilizarea enzimei. În cazul nanotuburilor funcționaizate cu grupări amino imobilizarea s-a reiaizat folosind același linker. Biocatalizatorii obținuți în acest fel (SwCNT<sub>COOH</sub>-PAL<sup>II</sup> și SwCNT<sub>NH2</sub>-PAL) s-au dovedit a fi eficienți pentru prepararea acidului (*R*)-2-amino-3-(tiofen-2-il)propanoic prin rezoluția cinetică a racemicului **1** și a enantiomerului acesteia (*S*)-**1** prin adiția de amoniac enantiotop selectivă la acid (*E*)-3-(tiofen-2-il)acrilic. Studiile de reutilizare au demosnstrat că SwCNT<sub>COOH</sub>-PAL<sup>II</sup> își păstrează peste 80% din activitatea inițială după 7 cicluri de eliminare de amoniac din **1** și 12 cicluri în reacția de adiție de amoniac la **2** în soluție de amoniac 2 M, în timp ce SwCNT<sub>NH2</sub>-PAL își păstrează peste 82% din activitatea inițială după 12 cicluri de adiție de amoniac folosind o soluție de amoniac de 2 M. Prin spălarea SwCNT<sub>NH2</sub>-PAL după fiecare utilizare cu tampon fosfat pH 6, acesta își păstrează peste 90% din activitatea inițială chiar și după 25 de cicluri de adiție de amoniac (soluție de amoniac de 2 M).

Studiile efectuate folosind SwCNT<sub>COOH</sub>-PAL<sup>II</sup> și SwCNT<sub>NH<sub>2</sub></sub>-PAL în sistem continuu în reacția de adiție de amoniac în intervalul de temperatură 30-80 °C au arătat că activitatea enzimatică rămâne nealterată până la 60 °C timp de cel puțin 72 de ore (în soluție de amoniac 2 M)

## **2.1 Lipaze immobilizate pe nanotuburi de carbon funcționalizate pentru producția biodieselului**

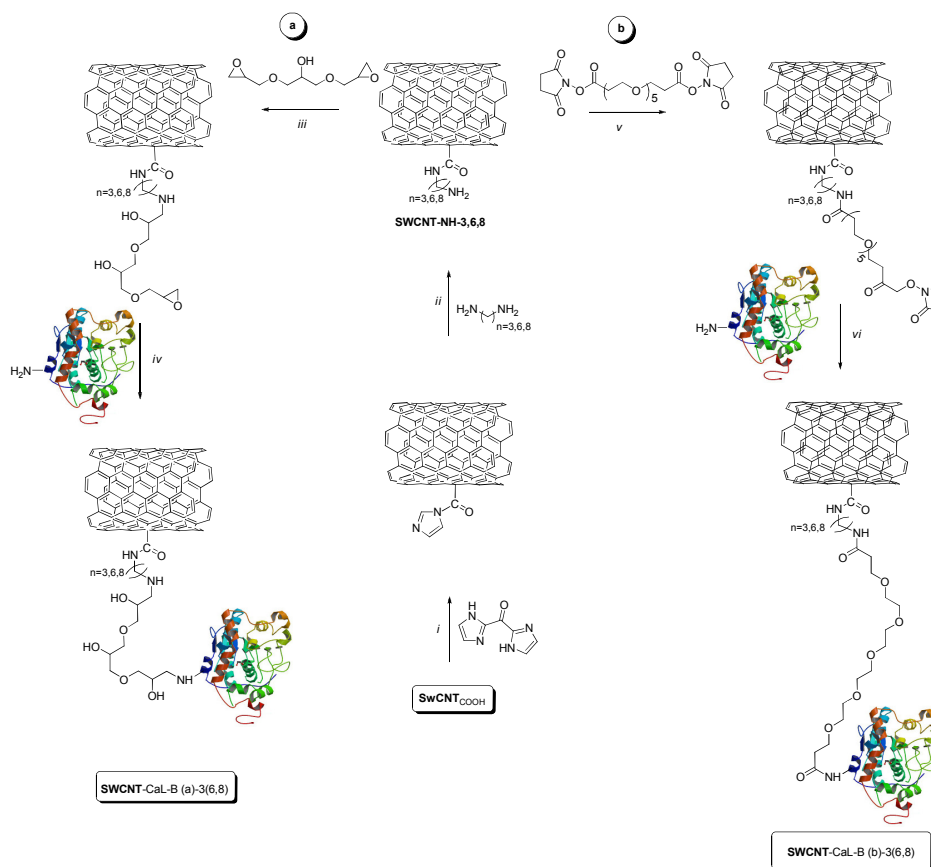
### **2.1.1 Lipaza B din *Candida antarctica* immobilizată pe nanotuburi de carbon pentru producția biodieselului**

#### **2.1.1.1 Obiectivele studiului**

Obiectivele studiului constau din immobilizarea lipazei B din *Candida antarctica* (CaL-B) pe nanotuburi de carbon funcționalizate și utilizarea preparatelor enzimaticice pentru obținerea biodieselului din ulei de floarea soarelui.

#### **2.1.1.2 Imobilizarea covalentă a CaL-B pe nanotuburi de carbon cu un singur perete**

Nanotuburile de carbon funcționalizate cu grupări carboxil s-au activat cu carbonildiimidazol (CDI) urmată de o cuplare cu alchildiamine cu lungimi diferite (1,3-diaminopropan, 1,6-diaminohexan and 1,8 diamonooctan), rezultând nanotuburile de carbon funcționalizate cu lungimi diferite (SwCNT-NH-3, SwCNT-NH-6, SwCNT-NH-8). În continuare, s-au folosit doi agenți de reticulare (glicerol diglicidil eter, GDE și bis (sulfosuccinimidil)suberat PEGilat, BS(PEG)<sub>5</sub> (**Schema 5**) pentru a activa SwCNT-NHs pentru a crea legătura cu grupările amino de pe suprafața enzimei cu suportul. Imobilizarea enzimei s-a realizat în prezența și în absența de Tween 80, un surfactant neionic. Protocoalele de imobilizare s-au caracterizat prin conversii de imobilizare ridicate și reproductibilitate (> 99% din enzimă s-a legat pe suport.)



**Scheme 5** Imobilizarea CaL-B pe  $\text{SWCNT}_{\text{COOH}}$ . a) cu GDE: *i*) CDI în  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; *ii*)  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2/\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2/\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_8\text{NH}_2$  în apă; *iii*) glicerol diglycidyl ether în  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; *iv*) CaL-B în soluție tampon PBS (20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 7); b) cu BS(PEG)<sub>5</sub>: *i*) CDI în  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; *ii*)  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2/\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2/\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_8\text{NH}_2$  în apă; *v*) BS(PEG)<sub>5</sub> în DMSO; *vi*) CaL-B în soluție tampon PBS (20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 8).

### 2.1.1.3 Transesterificarea uleiului de floarea soarelui cu SwCNT-CaL-B

Pentru a testa preparatele enzimice obținute, s-a realizat transesterificarea uleiului de floarea soarelui. Folosind un preparat enzimatic model, SwCNT-CaL-B(a)-6, obținut prin imobilizare cu 1,6-hexandiamină și glicerol diglycidil eter în prezența surfactantului s-au determinat condițiile de reacție optime.

### 2.1.1.4 Efectul solventului organic asupra reacției de etanoliză

Reacțiile de transesterificare s-au realizat în diferiți solvenți organici, rezultatele indicând că acetonitrilul este solventul optim pentru sinteza biodieselului mediată de biocatalizatorul model, SwCNT-CaL-B(a)-6. În acest caz conversia a fost de 63% după patru ore de reacție (**Tabel 2**)

**Tabel 2** Efectul solventului asupra etanolizei uleiului de floarea soarelui mediată de SwCNT-CaL-B(a)-6 după 4 ore de reacție

	<b>Solvent</b>	<b>Conversie(%)</b>
1	EtOH	20.7
2	ACN	63.5
3	<i>t</i> -BuOH	30.3
4	DIPE	12.1
5	<i>t</i> -BME	9.51
6	1,4-Dioxan	<5
7	Heptan	<5
8	Hexan	<5
9	Octan	<5
10	Isooctan	<5
11	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	<5
12	CCl <sub>4</sub>	<5
13	DMF	<5
14	THF	<5
15	Acetonă	<5
16	EtOAc	<5

#### 2.1.1.5 Efectul conținutului de apă asupra producției de biodiesel

Reacția de transesterificare a uleiului de floarea soarelui mediată de SwCNT-CaL-B(a)-6 s-a realizat prin adăugarea de diferite cantități de apă (0-5 vol. %,) în mediul de reacție. Rezultatele au arătat că reacțiile cu cantități mici de apă permit conversii mai ridicate, prin creșterea cantității de apă activitatea enzimei a scăzut semnificativ (**Tabel 3**).

**Tabel 3** Efectul conținutului de apă asupra producției de biodiesel, după trei ore de reacție

	<b>Cantitate (vol. %)</b>	<b>Conversie (%)</b>
1	0	56.9
2	0.1	59.2
3	0.5	58.5
4	1	49.5
5	1.5	46.7
6	2	38.5
7	3	34.6
8	4	42.3
9	5	34.9

### 2.1.1.6 Efectul raportului substrat-solvent asupra etanolizei uleiului de floarea soarelui

Concentrația substratului de asemenea poate avea o influență semnificativă asupra activității enzimei. Prin realizarea reacțiilor cu cantități diferite de solvent, conversia maximă s-a obținut la un raport substrat-solvent de 1:5 (**Tabel 4**).

**Tabel 4** Efectul concentrației de substrat asupra producției de biodiesel (după 3 ore de reacție)

	<b>Raport substrat- ACN (w/v)</b>	<b>Conversie (%)</b>
1	1:1	6.9
2	1:2	17.5
3	1:5	58.9
4	1:10	51.5
5	1:20	52.2
6	1:25	52.1
7	1:50	37.2

### 2.1.1.7 Efectul concentrației de etanol asupra producției de biodiesel

Cantitatea de nucleofil poate de asemenea avea o influență semnificativă asupra vitezei de reacție a procesului de transesterificare biocatalitică.<sup>32</sup> Raportul ulei:etanol fixat inițial (1:5) s-a variat, rezultatele arătând că prin scăderea conținutului de etanol crește conversia reacției. Cea mai mare valoare a conversiei s-a înregistrat la raportul stoichiometric ulei etanol (1:3) (**Tabel 5**).

**Tabel 5** Efectul raportului molar ulei:etanol asupra procesului de etanoliză (după 3 ore de reacție )

	<b>Raport molar ulei-etanol</b>	<b>Conversie (%)</b>
1	1:1	46.7
2	1:3	59.7
3	1:5	58.3
4	1:10	38.7
5	1:20	42.2
6	1:50	20.7

### 2.1.1.8 Efectul tipului și a lăgimii agentului de reticulare și a prezenței surfactantului asupra reacției de transesterificare

Activitatea catalitică a diferitelor preparate enzimatică s-a testat folosind condițiile optimizate determinate. Preparatele enzimatică obținute fără Tween 80 au avut activitate enzimatică mai scăzută decât cele imobilizate în prezența surfactantului. Linkerul mai scurt, 1,3-

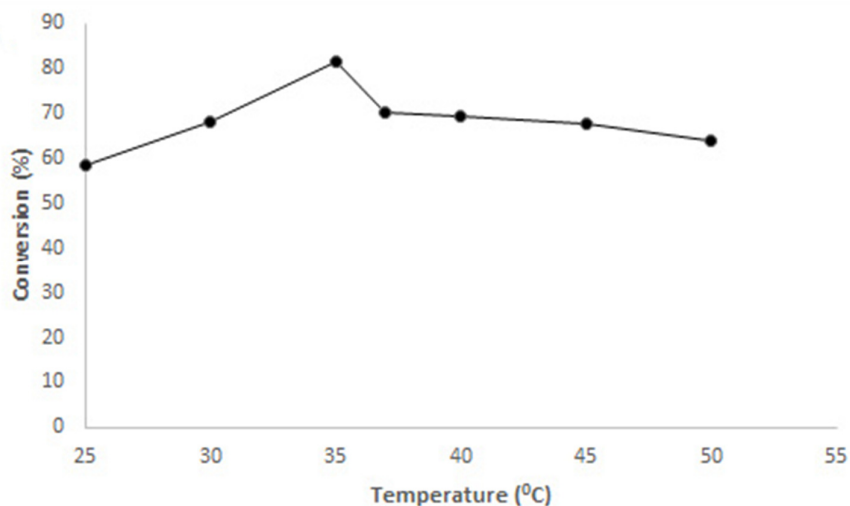
diaminopropan, a furnizat rezultate mai bune, în timp ce folosirea linkerelor mai lungi a avut efect negativ asupra eficacității enzimei. În toate cazurile folosirea agentului de reticulare mai scurt, glicerol diglicidil eter, a dus la creșterea activității enzimei (**Tabel 6**).

**Tabel 6** Efectul modului de imobilizare asupra reacției de etanoliză după 4 ore (\*imobilizare fără Tween-80)

	Enzimă imobilizată	Linker	Conversie (%)
1	SwCNT-CaL-B(a)-3	1,3-diaminopropan	79.9
2	SwCNT-CaL-B(a)-3*	1,3-diaminopropan	30.3
3	SwCNT-CaL-B(a)-6	1,6-diaminohexan	63.2
4	SwCNT-CaL-B(a)-8	1,8-diaminooctan	20.4
5	SwCNT- CaL-B(b)-3-1	1,3-diaminopropan	37.2
6	SwCNT-CaL-B(b)-3-2	1,3-diaminopropan	50.8
7	SwCNT-CaL-B(b)-3-2*	1,3-diaminopropan	20.2
8	SwCNT- CaL-B(b)-6-1	1,6-diaminohexan	30.1
9	SwCNT-CaL-B(b)-6-2	1,6-diaminohexan	39.7
10	SwCNT- CaL-B(b)-8-1	1,8-diaminooctan	21.1
11	SwCNT- CaL-B(b)-8-2	1,8-diaminooctan	27.6

### 2.1.1.9 Efectul temperaturii

Prin investigarea efectului temperaturii asupra reacției de etanoliză catalizată de CaL-B(a)-3 s-a constatat că temperatura optimă este la 35°C (**Figura 9**)

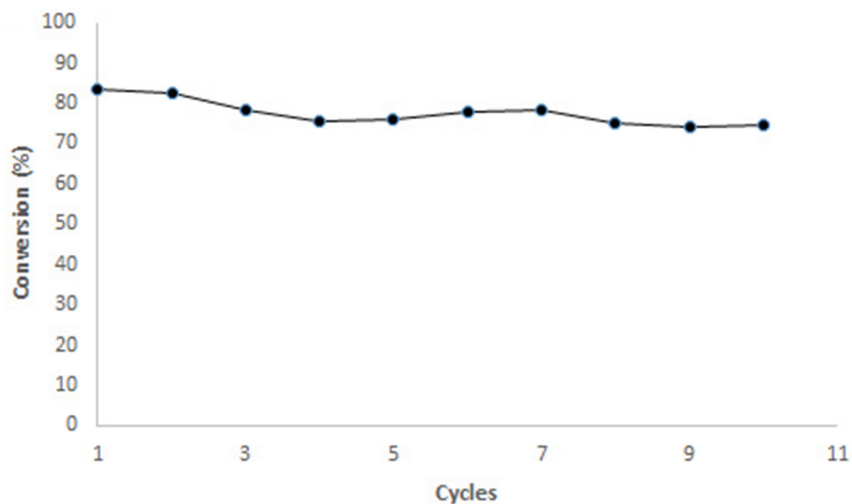


**Figura 9** . Efectul temperaturii asupra transesterificării enzimatică după 3 ore de reacție

### 2.1.1.10 Reutilizabilitatea biocatalizatorului

Reutilizabilitatea lipazelor este un aspect important din cauza costurilor lor ridicate. Reutilizabilitatea SwCNT-CaL-B(a)-3 s-a testat în reacții batch repetate utilizând condițiile

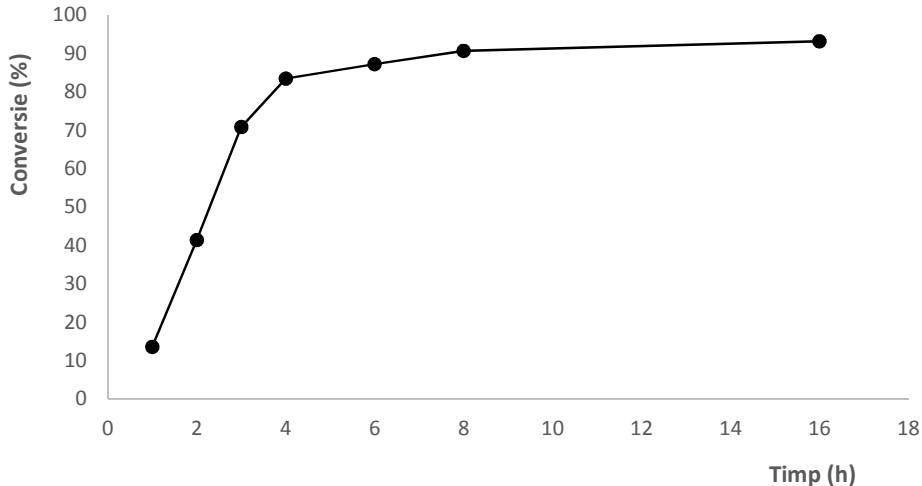
optime. După 10 cicluri biocatalizatorul și-a păstrat peste 90% din activitatea inițială (**Figura 10**).



**Figura 10** Studiul de eutilizabilitate a SwCNT<sub>COOH</sub>-CaL-B(3)-a prin reacții batch de câte 4 ore

#### 2.1.1.11 Profilul de timp al reacției de transesterificare

Profilul de timp al reacției arată că reacția decurge rapid în primele 4 ore (atingând o conversie de 83.4%), după care încetinește (ajungând la o conversie de 93.1% după 16 ore) (**Figura 11**)



**Figura 11** Profilul de timp al reacției de transesterificare

#### 2.1.1.12 Concluzii

Prin imobilizarea covalentă a lipazei B din *Candida antarctica* pe nanotuburi cu un singur perete funcționalizate cu grupări carboxil (SwCNT<sub>COOH</sub>) s-au obținut biocatalizatori utili pentru producția biodieselului. Lungimea linkerului influențează semnificativ activitatea enzimatică, preparate enzimatiche mai active obținându-se prin folosirea linkerului mai scurt, 1,3-

diaminopropan. SwCNT-CaL-B(a)-3, cel mai activ preparat enzimatic obținut prin imobilizarea lipazei cu glicerol diglicidil eter și 1,3-diaminopropan a arătat conversii ridicate în reacția de etanoliză a uleiului de floarea soarelui. Studiile de reutilizabilitate au arătat că SwCNT-CaL-B(a)-3 are stabilitate operațională ridicată, păstrându-și peste 90% din activitatea inițială chiar și după 10 utilizări.

## **2.1.2 Imobilizarea lipazei amano din *Pseudomonas Fluorescens* (L-AK) pe nanotuburi de carbon funcționalizate**

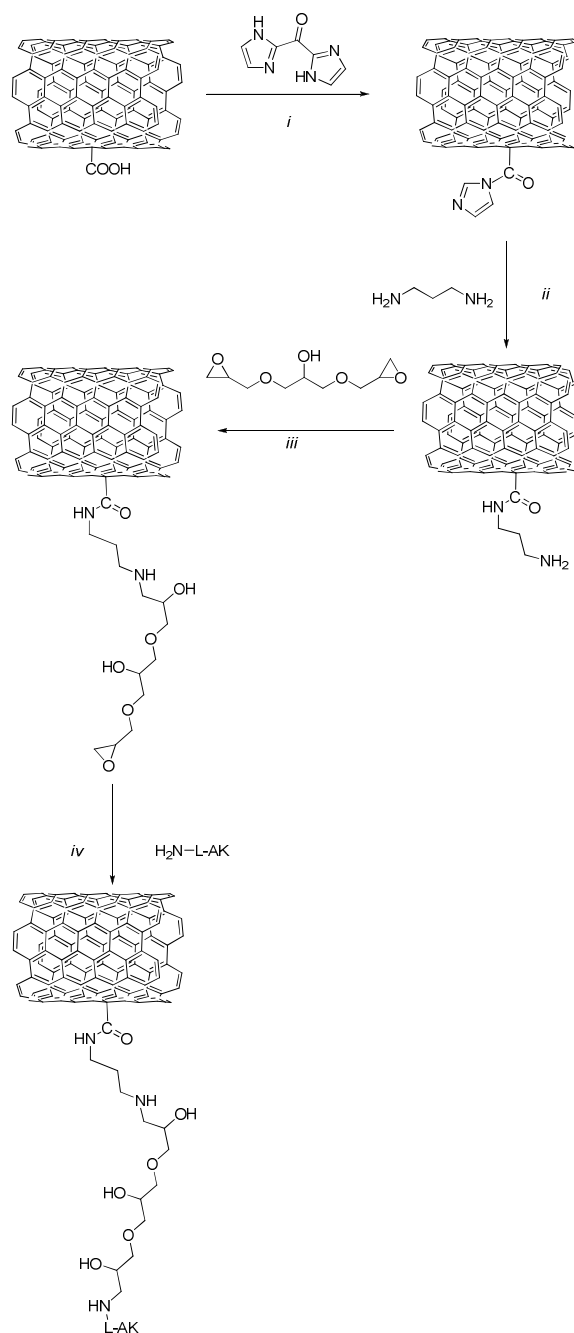
### **2.1.2.1 Obiectivele studiului**

Scopul studiului reprezintă imobilizarea lipazei amano din *Pseudomonas Fluorescens* (L-AK) pe nanotuburi de carbon funcționalizate cu grupări carboxil (SwCNT<sub>COOH</sub>) pentru obținerea de biocatalizatori cu proprietăți îmbunătățite pentru reacții în reactoare continue.

### **2.1.2.2 Imobilizarea covalentă L-AK pe SwCNT<sub>COOH</sub>**

Imobilizarea enzimei L-AK s-a realizat folosind protocolul de imobilizare optimizat din cazul imobilizării lipazei B din *Candida antarctica*. Astfel s-a utilizat 1,3-diaminopropan, glicerol diglicidil eter, iar imobilizarea s-a realizat în prezența surfactantului (**Schema 6**). Preparatele enzimatiche s-au caracterizat prin conversii de imobilizare ridicate și reproductibilitate (> 99% de enzimă legată pe SwCNT<sub>COOH</sub>).





**Schema 6** Imobilizarea L-AK pe SwCNT<sub>COOH</sub>. cu GDE: *i*) CDI în CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; *ii*) H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> în apă; *iii*) glicerol diglicidil eter în CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; *iv*) L-AK în soluție tampon PBS (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7)

### 2.1.2.3 Transesterificarea uleiului de floarea soarelui cu SwCNT-L-AK

Activitatea preparatelor enzimatice s-a testat în etanoliza uleiului de floarea soarelui. Condițiile de reacții optime s-a determinat prin realizarea unor screeninguri la scară analitică, folosind ca

și preparat enzimatic model SwCNT-L-AK obținut cu o încărcare a suportului cu enzimă de 0.33mg de enzimă/ mg preparat enzimatic.

#### 2.1.2.4 Efectul solventului organic asupra producției de biodiesel

Prin efectuarea reacțiilor de transesterificare în solvenți diferiți s-a constatat că izooctanul este solventul optim, conversiile atingând valori ridicate (87 %) după 4 ore de reacție (**Tabel 7**).

**Tabel 7** Efectul naturii solventului asupra reacției de etanoliză al uleiului de floarea soarelui mediată de SwCNT-L-AK after după 4 ore de reacție.

	Solvent	Conversie (%)
1	ACN	53.74909
2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	2.829617
3	EtOH	86.78548
4	Hexan	67.80793
5	Izooctan	87.74641
6	t-Bme	31.71333
7	t-BuOH	42.17548

#### 2.1.2.5 Efectul conținutului de apă

Realizând reacția de etanoliză a uleiului de floarea soarelui mediată de SwCNT-L-AK cu diferite cantități de apă (0-5 vol. %), s-a constatat că absența apei în mediul de reacție are efect benefic asupra activității enzimaticice (**Tabel 8**).

**Tabel 8** Efectul conținutului de apă asupra producției de biodiesel după 4 ore de reacție

	Conținut de apă (vol. %)	Conversie (%)
1	0	84.0525
2	0.1	82.98121
3	0.5	63.50525
4	1	54.4212
5	1.5	34.95314
6	2	16.09766
7	3	48.85216
8	4	73.0505
9	5	49.17327

### 2.1.2.6 Efectul încărcării cu enzimă a suportului

Prin efectuarea reacțiilor cu preparate enzimaticice cu diferite rapoarte de suport enzimă s-a constatat că cele mai mari conversii se ating folosind un raport suport enzimă de 1:2 (**Tabel 9**).

**Tabel 9** Efectul încărcării cu enzimă a suportului asupra activității biocatalizatorului, după 3 ore de reacție

	Raport suport- enzimă ratio (w/w)	Conversie (%)
1	2:1	53.57741
2	1:1	72.6089
3	1:2	85.57113
4	1:5	67.52561

### 2.1.2.7 Efectul concentrației de atanol asupra reacției de transesterificare

Prin modificarea raportului molar de ulei:etanol s-a constatat că raportul 1:5 conduce la conversii cele mai ridicate (**Tabel 10**).

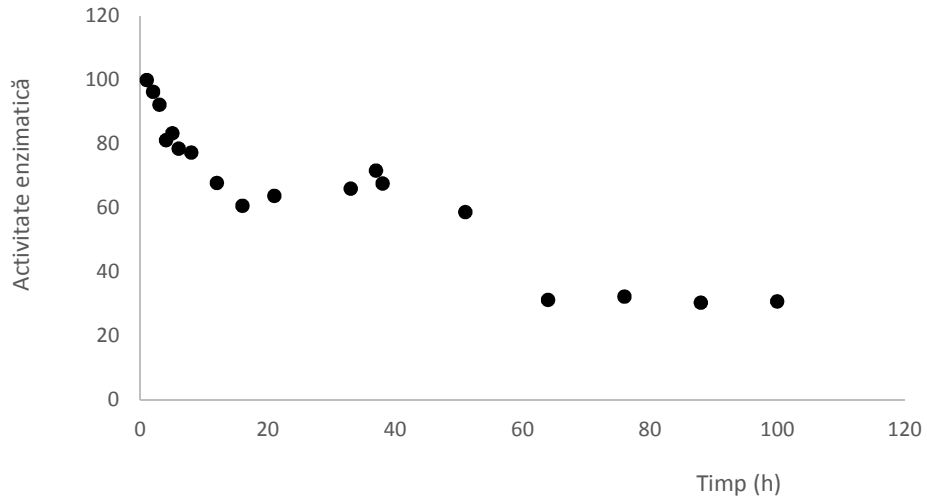
**Tabel 10** Efectul raportului molar ulei:etanol asupra procesului de etanoliză, după 3 ore de reacție

	Raport molar ulei-etanol	Conversie (%)
1	1:1	65.2
2	1:3	88.8
3	1:5	91.5
4	1:10	89.4
5	1:20	90.4
6	1:50	84.4

### 2.1.2.8 Producția biodieselului în reactor continuu

Producția biodieselului s-a investigat într-o coloană SynBioCart, umplută cu enzima imobilizată, atașată de modulul de pompă al unui HPLC. Coloana s-a plasat vertical, pentru a preveni atașarea produsului secundar, glicerolul, de enzima imobilizată.

Inițial debitul s-a setat la o valoare de 0.35 mL/min, valoare la care conversia inițială era de aproximativ 70%. Pentru investigarea stabilității în timp a enzimei imobilizate în reacția de transesterificare a uleiului de floarea soarelui, s-au luat probe la intervale de timp și s-au analizat. Rezultatele arată o scădere a activității inițiale a enzimei în primele 60 de ore, după care activitatea rămâne constantă pentru cel puțin 40 de ore (**Figura 12**).



**Figura 12** Comportamentul în timp al L-AK în sistem continuu

### 2.1.2.9 Concluzii

Imobilizarea covalentă a lipazei amano din *Pseudomonas fluorescens* pe naotuburi de carbon cu un singur perete funcționalizate cu grupări carboxil a furnizat biocatalizatori utili în producția biodieselului. După optimizarea parametrilor de reacție conversia a atins valori de peste 90% folosind izooctan ca și solvent. Preparatele enzimatică obținute pot avea o potențială aplicație în producția biodieselului în reactor continuu.

### 3 Concluzii generale

Teza descrie utilitatea nanotuburilor cu un singur perete funcționalizate ca și suport pentru imobilizarea covalentă a enzimelor fenilalanin amoniac liaza din *Petroselinum crispum* (PcPAL), lipaza B din *Candida antarctica* (CaL-B) și lipaza amano din *Pseudomonas fluorescens* (L-AK).

Prin imobilizarea covalentă a PcPAL pe nanotuburi de carbon cu un singur perete funcționalizate cu grupări carboxil și amino (SwCNT<sub>COOH</sub> și SWCNT<sub>NH2</sub>) s-a demonstrat, pentru prima dată, utilitatea biocatalizatorilor obținuți (SwCNT<sub>COOH</sub>-PAL<sup>II</sup> și SwCNT<sub>NH2</sub>-PAL) pentru biotransformări stereoselective în reacții batch și în microreactoare continue. S-a caracterizat dependența de temperatură și reutilizabilitatea enzimelor imobilizate.

Prin imobilizarea covalentă a lipazei B din *Candida antarctica* (CaL-B) și lipaza amano din *Pseudomonas fluorescens* (L-AK) pe nanotuburi de carbon cu un singur perete funcționalizate cu grupări carboxil, s-au obținut biocatalizatori stabili și eficienți pentru producția biodieselului.

## 4 Mulțumiri

Cercetarea experimentală s-a realizat la laboratoarele Grupului de Cercetare Biocataliză și Biotransformări condusă de Prof. Dr. Ing. Florin Dan Irimie, din cadrul facultății de Chimie și Inginerie Chimică, Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca.

În primul rând aș dori să-mi exprim recunoștința față de conducătorul meu științific, Prof. Dr. Ing. Florin Dan Irimie, pentru îndrumare, ajutorul acordat și răbdare pe timpul anilor de doctorat.

Le adresez mulțumiri speciale Prof. Habil. Dr. Ing. Csaba Paizs, Conf. Habil. Dr. Ing. Monica Ioana Toșa, Lect. Dr. Paula Veronica Podea, Conf. Dr. Gabriel Katona, Lect. Dr. Paula Podea, Asist. Univ. Csaba László Bencze, Dr. Brem Jürgen, pentru ajutorul lor acordat pe timpul studiilor.

Mulțumiri le adresez și colegilor mei pentru ajutorul acordat și pentru prietenia lor: Dr. Ing. Mara Ana Naghi, Dr. Ing. Alexandra Radu (Mantu), Dr. Ing. Andrea Varga, Ing. Botond Nagy, Ing. Norbert-Arthur Dima, Alina Filip, Ing. Mădălina-Elena Moisă,, Dr. Melinda Emese Füstös, Ing. Mihai Lăcătuș, Ing. Emma Zsafia Aletta Nagy.

Îmi exprim recunoștința față de colaboratorul nostru, Prof. Habil. Dr. László Poppe de la Universitatea Tehnică și Economică, Budapesta.

Aș dori să mulțumesc membrilor comisiei pentru interesul acordat acesei teze.

Mulțumesc pentru suportul financiar acordat de Ministerul Român al Educației și Cercetării (PN-II-PT-PCCA-2013-4-1006).

Îi mulțumesc din suflet soțului meu, Bartha Ádám, părinților și surorii mele care au fost mereu alături de mine oferindu-mi încredere și sprijin.

## 5 Publicații științifice

1. Bartha-Vári, J.H., Toșa, M.I., Irimie, F.D., Weiser, D., Boros, Z., Vértessy, B.G., Paizs, C., Poppe, L. Immobilization of phenylalanine ammonia-lyase on single-walled carbon nanotubes for stereoselective biotransformation in batch and continuous-flow modes. *ChemCatChem*, **2015**, 7, 1122-1128, I.F.= 4.556
2. Bencze, L.C., Bartha-Vári, J.H., Katona, G., Toșa, M.I., Paizs, C., Irimie, F.D. Nanobioconjugates of *Candida antarctica* lipase B and single-walled carbon nanotubes in biodiesel production. *Bioresource Technol*, **2016**, 200, 853–860, I.F.=4.494

## Conferințe

1. Bartha-Vári, J.H., Bencze, L.C., Toșa, M.I., Paizs, C., Irimie, F.D., Functionalized Nanotubes Supported Lipases for Biodiesel Synthesis, *Young Researchers' International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, 12nd-14<sup>th</sup> May, **2016**, Cluj-Napoca, Romania – oral presentation
2. Bartha-Vári, J.H., Nagy, E.Z., Gal, C.A., Bencze, L.C., Toșa, M.I., Irimie, F.D., Abaházi, E., Poppe, L., Paizs, C., CaL-B Immobilized on Single Walled Carbon Nanotubes as Efficient Biocatalyst for the Kinetic Resolution of 1-(Hetero)aryl – Ethanol, COST Action CM1303 “*SysBiocat*” *Training School*, 27<sup>th</sup>- April-1<sup>st</sup> May, 2016, Certosa di Pontignano, Italy - poster
3. Vári, J.H., Varga, A., Poppe, L., Irimie, F.D., Paizs, C., Covalent Immobilization of Phenylalanine Ammonia Lyase on Functionalized Single Walled Carbon Nanotubes, *COST Action CM1303 “SysBiocat” Training School*, 28<sup>th</sup> May-1<sup>st</sup> June, **2014**, Certosa di Pontignano, Italy - poster
4. Vári, J.H., Varga, A., Poppe, L., Irimie, F.D., Paizs, C., Covalent immobilization of Phenylalanine Ammonia Lyase on Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes, *COST Action CM1303 “SysBiocat” Kick-off Workshop*, 10<sup>th</sup>-14<sup>th</sup> April, **2014**, Madrid, Spain – oral presentation
5. Vári, J.H., Poppe, L., Irimie, F.D., Paizs, C., Fenil-alanin ammónia-liáz (PAL) és Candida Antarctica lipase B (CaL-B) kovalens immobilizálása funkcionizált egyfalú szén nanocsövön (SWNT), *19<sup>th</sup> International Conference on Chemistry*, 21<sup>st</sup> – 24<sup>th</sup> November, 2013, Baia-Mare, Romania - oral presentation



## 6 Referințe

- 1 Sheldon, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349 (8-9), 1289–1307.
- 2 DiCosimo, R.; McAuliffe, J.; Poulou, A. J.; Bohlmann, G. Industrial Use of Immobilized Enzymes. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (15), 6437.
- 3 Sheldon, R. A.; Van Pelt, S. Enzyme Immobilisation in Biocatalysis: Why, What and How. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (42), 6223–6235.
- 4 Hartmann, M.; Kostrov, X. Immobilization of Enzymes on Porous Silicas--Benefits and Challenges. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (15), 6277–6289.
- 5 Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fuentes, M.; Betancor, L.; Grazu, V.; López-Gallego, F.; Pessela, B. C. C.; Hidalgo, A.; Fernández-Lorente, G.; Fernández-Lafuente, R.; Guisan, J. M. Glyoxyl Agarose: A Fully Inert and Hydrophilic Support for Immobilization and High Stabilization of Proteins. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, 39 (2), 274–280.
- 6 Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity via Immobilization Techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, 40 (6), 1451–1463.
- 7 Adlercreutz, P. Immobilisation and Application of Lipases in Organic Media. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (15), 6406–6436.
- 8 Tischer, W.; Wedekind, F. Immobilized Enzymes: Methods and Applications. *Biocatal. Discov. to Appl.* **1999**, 200, 95–126.
- 9 Gustavsson, P.; Hedmer, M.; Rissler, J. Carbon Nanotubes-Exposure, Toxicology and Protective Measures in the Work Environment. Report 2011:1. **2011**.
- 10 Vidu, R.; Rahman, M.; Mahmoudi, M.; Enachescu, M.; Poteca, T. D.; Opris, I. Nanostructures: A Platform for Brain Repair and Augmentation. *Front. Syst. Neurosci.* **2014**, vol. 8 (June), 24 pp.
- 11 Bandaru, P. R. Electrical Properties and Applications of Carbon Nanotube Structures. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2007**, 7 (4), 1239–1267.
- 12 Gustavsson, P.; Hedmer, M.; Rissler, J. Carbon Nanotubes-Exposure, Toxicology and Protective Measures in the Work Environment. Report 2011:1. **2011**.
- 13 Rümmeli, M. H.; Ayala, P.; Pichler, T. Carbon Nanotubes and Related Structures: Production and Formation. *Carbon Nanotub. Relat. Struct. Synth. Charact. Funct. Appl.* **2010**, 1–21.
- 14 Lee, J. K. Immobilization of Enzyme on Hydrophobic Room Temperature Solid-Phase Ionic Liquids and Its Use for Biocatalytic Transesterification in Organic Solvent: Remarkably Enhanced Activity of Lipase. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2012**, 33 (10), 3458–3460.
- 15 Pavlidis, I. V.; Vorhaben, T.; Tsoufis, T.; Rudolf, P.; Bornscheuer, U. T.; Gournis, D.;

- Stamatis, H. Development of Effective Nanobiocatalytic Systems through the Immobilization of Hydrolases on Functionalized Carbon-Based Nanomaterials. *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 164–171.
- <sup>16</sup> Poppe, L.; Rétey, J. Properties and Synthetic Applications of Ammonia-Lyases. *Curr Org Chem* **2003**, *7* (13), 1297–1315.
- <sup>17</sup> Poppe, L.; Rétey, J. Friedel-Crafts-Type Mechanism for the Enzymatic Elimination of Ammonia from Histidine and Phenylalanine. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44* (24), 3668–3688.
- <sup>18</sup> Ritter, H.; Schulz, G. E. Structural Basis for the Entrance into the Phenylpropanoid Metabolism Catalyzed by Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Plant Cell* **2004**, *16* (12), 3426–3436.
- <sup>19</sup> Hu, Y.; Tang, T.; Yang, W.; Zhou, H. Bioconversion of Phenylpyruvic Acid to L-Phenylalanine by Mixed-Gel Immobilization of Escherichia Coli EP8-10. *Process Biochem.* **2009**, *44* (2), 142–145.
- <sup>20</sup> Kirk, O.; Christensen, M. W. Lipases from Candida Antarctica: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6* (4), 446–451.
- <sup>21</sup> Patkar SA, Björkling F, Zundel M, Schüle M, Svendsen, A, Heldt-Hansen P, Gormsen, E. Purification of Two Lipases from Candida Antarctica and Their Inhibition by Various Inhibitors. *Ind J Chem* **1993**, *32*, 76–80.
- <sup>22</sup> Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A. The Sequence, Crystal Structure Determination and Refinement of Two Crystal Forms of Lipase B from Candida Antarctica. *Structure* **1994**, *2* (4), 293–308.
- <sup>23</sup> Anderson, E. M.; Larsson, K. M.; Kirk, O. One Biocatalyst - Many Applications: The Use of Candida Antarctica B-Lipase in Organic Synthesis. *Biocatal. Biotransformation* **1998**, *16*, 181–204.
- <sup>24</sup> Kumari, V.; Shah, S.; Gupta, M. N. Preparation of Biodiesel by Lipase-Catalyzed Transesterification of High Free Fatty Acid Containing Oil from Madhuca Indica. *Energy and Fuels* **2007**, *21* (1), 368–372.
- <sup>25</sup> Magnusson, A. O.; Rotticci-Mulder, J. C.; Santagostino, A.; Hult, K. Creating Space for Large Secondary Alcohols by Rational Redesign of Candida Antarctica Lipase B. *ChemBioChem* **2005**, *6* (6), 1051–1056.
- <sup>26</sup> Kojima, Y.; Yokoe, M.; Mase, T. Purification and Characterization of an Alkaline Lipase from Pseudomonas Fluorescens AK102. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58* (9), 1564–1568.
- <sup>27</sup> Salis, A.; Bhattacharyya, M. S.; Monduzzi, M.; Solinas, V. Role of the Support Surface on the Loading and the Activity of Pseudomonas Fluorescens Lipase Used for Biodiesel Synthesis. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *57* (1-4), 262–269.
- <sup>28</sup> Kumari, V.; Shah, S.; Gupta, M. N. Preparation of Biodiesel by Lipase-Catalyzed Transesterification of High Free Fatty Acid Containing Oil from Madhuca Indica.

*Energy and Fuels* **2007**, *21* (1), 368–372.

- <sup>29</sup> Paizs, C.; Katona, A.; Rétey, J. The Interaction of Heteroaryl-Acrylates and Alanines with Phenylalanine Ammonia-Lyase from Parsley. *Chem. - A Eur. J.* **2006**, *12* (10), 2739–2744.
- <sup>30</sup> Jas, G.; Kirschning, A. Continuous Flow Techniques in Organic Synthesis. *Chem. - A Eur. J.* **2003**, *9* (23), 5708–5723.
- <sup>31</sup> Paizs, C.; Katona, A.; Rétey, J. Chemoenzymatic One-Pot Synthesis of Enantiopure L-Arylalanines from Arylaldehydes. *European J. Org. Chem.* **2006**, No. 5, 1113–1116.
- <sup>32</sup> Gog, A.; Roman, M.; Toşa, M.; Paizs, C.; Irimie, F. D. Biodiesel Production Using Enzymatic Transesterification - Current State and Perspectives. *Renew. Energy* **2012**, *39* (1), 10–16.