



Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică

Universitatea Babeș-Bolyai

Cluj-Napoca



**Metode Biocatalitice în Sinteza Sustenabilă a
Aditivilor de Biodiesel și a Aciloinelor de
Enantiopuritate Ridicată**

Rezumatul Tezei de Doctorat

Doctorand: Mihai Andrei Lăcătuș

Conducător Științific: Prof. Dr. Ing. Florin Dan Irimie

Cluj-Napoca

2022

Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică

Școala Doctorală de Chimie

Metode Biocatalitice în Sinteza Sustenabilă a Aditivilor de Biodiesel și a Aciloinelor de Enantiopuritate Ridicată

Rezumatul Tezei de Doctorat

- Doctorand:** Mihai Andrei Lăcătuș
- Președinte Comisie:** Prof. Dr. Tiberiu Frentiu— *Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca*
- Conducător Științific:** Prof. Dr. Ing. Florin Dan Irimie— *Universitatea Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca*
- Prof. Dr. Ing. Dan Cașcaval— *Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi”, Iași*
- Referenți:** Prof. Dr. Ing. Peter Francisc— *Universitatea Politehnică, Timișoara*
- Prof. Dr. Gáspár Attila— *Universitatea din Debrecen*

Cluj-Napoca

2022

Cuprins

Cuprins	3
1. Introducere generala.....	4
2. Capitolul I. Sinteza diesterilor cu acizi grași ai 2,5-Bis(hidroximetil) furanului mediată de lipaze	5
2.1. Introducere. Prezentare generală a literaturii	5
2.2. Obiectivele studiului	6
2.3. Rezultate și discuții.....	7
2.3.1. Sinteza enzimatică a esterilor de BHMF cu acizi grași saturați utilizând 2-MeTHF ca mediu de reacție ...	7
2.3.2. Sinteza enzimatică a esterilor de BHMF cu acizi grași nesaturați, ulei de floarea soarelui și FAM în 2-MeTHF.....	14
2.3.3. Sinteza enzimatică a esterilor BHMF-ului cu FAM în absența solventului.....	15
2.3.4. Evaluarea indicilor de sustenabilitate	18
2.4. Concluzii.....	19
3. Capitolul II. Noi biocatalizatori cu celule întregi pentru sinteza de aciloine optic active	20
3.1. Introducere. Prezentare generală a literaturii.	20
3.1.1. α -Hidroxiketone optic active (aciloine)	20
3.1.2. Metode de obținere biocatalitice a α -hidroxiketonei optic active	21
3.1.3. Sinteza catalizată de PDC a fenilacetilcarbinolului și ai analogilor de fenilacetilcarbinol	22
3.2. Obiectivele studiului.....	24
3.3. Rezultate și discuții.....	25
3.3.1. Tulpinile de drojdie investigate	25
3.3.2. Sinteza chimică a <i>rac</i> -fenilacetilcarbinol și a <i>rac</i> -1,2-fenilpropandiol.....	25
3.3.3. Studiul preliminar a activității piruvat decarboxilaze a tulpinilor de drojdie în sinteza de (<i>R</i>)-fenilacetilcarbinol.....	26
3.3.4. Optimizarea condițiilor de reacție prin metoda experimentului factorial	28
3.3.5. Sinteza chimică a aciloinei racemice <i>rac</i> -b2-31 și a 1,2-diolilor corespunzători <i>rac</i> -d2-31	33
3.3.6. Evaluarea domeniului substrat al tulpinilor de drojdie investigate	34
3.3.7. Sinteza de (<i>R</i>)-fenilacetilcarbinol cu celule imobilizate ale tulpinilor de drojdie selectate în sistem discontinuu și continuu	41
3.4. Concluzii.....	45
4. Concluzii generale	46
6. Mulțumiri.....	47
7. Lista publicațiilor	48
8. Referințe.....	49

Cuvinte cheie: biocataliză, esterificare enzimatică; esteri cu acizi grași ai 2,5-Bis(hidroximetil) furanului; reacție fără solvent; sinteza sustenabilă; aciloine chirale; piruvat decarboxilază; drojdii neconvenționale; experiment factorial; domeniu de substrat;

1. Introducere generala

Creșterea la nivel global a necesarului de produși de sinteză, de la chimicale uzuale până la compuși cu activitate farmaceutică și combustibili, a condus la un impact negativ de lungă durată asupra mediului înconjurător. În încercarea de a reduce efectele negative ale proceselor chimice tradiționale, oamenii de știință și industriile chimice au început să dezvolte noi procese și tehnologii “green” cu un impact redus asupra mediului, totodată punând accent pe sustenabilitatea lor pe termen lung.

Având ca scop dezvoltarea unor procese mai economice și sustenabile, cataliza a fost întotdeauna una favorită a chimistului și a dus la dezvoltarea industriei chimice moderne. Luând în considerare dezavantajele catalizei clasice, biocataliza și biotransformările mediate de sisteme biologice au jucat un rol important ca alternative „green”, care au permis dezvoltarea de noi procese cu productivitate ridicată și un impact mult mai scăzut asupra mediului. Datorită avansării științifice a biotehnologiei, biocataliza este în prezent recunoscută ca o tehnologie verde și sustenabilă, rentabilă și aplicabilă la nivel industrial.

În lucrarea de față, s-a urmărit dezvoltarea de noi strategii biocatalitice de obținere a unor produși valoroși, pornind de la resurse sustenabile și utilizând biocatalizatori comerciali. În același timp, s-a urmărit studiul și dezvoltarea unor noi biocatalizatori utilizați în sinteza de compuși chirali de interes pentru industria chimică fină și cea farmaceutică.

În prima parte a tezei, *Sinteza diesterilor cu acizi grași ai 2,5-Bis(hidroximetil)furanului mediată de lipaze*, este descrisă investigarea procesului de esterificare mediată de lipaze a 2,5-bis(hidroximetil)furanului cu acizi grași din diferite surse cu scopul de a obține diesterii corespunzători, cu potențială aplicație ca aditivi pentru creșterea cifrei cetanice a biocarburanților. Datorită faptului că materiile prime provin din resurse regenerabile, s-a reușit dezvoltarea unei metodologii „green” și sustenabile, cu randamente ridicate în condiții de lucru blânde, prin utilizarea unui solvent verde sau a unui proces “solvent-free” (fără solvent).

A doua parte a tezei, *Noi biocatalizatori cu celule întregi pentru sinteza de aciloine optice active*, descrie identificarea unor noi tulpini de drojdii pentru sinteza selectivă a

(*R*)-fenilacetilcarbinolului, prin utilizarea activității piruvat decarboxilazice native a acestor celule. De asemenea, s-a urmărit explorarea sistematică a domeniului de substrat intrinsec a acestor biocatalizatori cu scopul de a obține analogi optic activi a (*R*)-fenilacetilcarbinolului. În final, s-a studiat și obținerea unor biocatalizatori în formă imobilizată reutilizabili, prin imobilizarea celulelor în matrice de sol-gel și utilizarea lor în procese continue și discontinue de sinteză a (*R*)-fenilacetilcarbinolului.

2. Capitolul I. Sinteza diesterilor cu acizi grași ai 2,5-Bis(hidroximetil) furanului mediată de lipaze

2.1. Introducere. Prezentare generală a literaturii

Compușii chimici de platformă obținuți din biomasă (Biomass-based platform chemicals) au căpătat un interes din ce în ce mai mare pentru cercetători și industrie, pornind de la producția și purificarea lor din resurse regenerabile, până la procesarea lor în compuși chimici de bază sau produse finite cu aplicabilitate imediată. În general, biomasa este considerată o resursă regenerabilă ideală ca alternativă la resursele petroliere, și a fost propusă ca o sursă durabilă de compuși organici pentru obținerea de combustibili și substanțe chimice de mare tonaj. Printre compușii chimici de platformă obținuți din surse regenerabile, 5-hidroximetilfurfuralul (HMF) și derivații săi sunt considerați intermediari chimici versatili datorită structurii lor și a posibilității obținerii lor din materii prime sustenabile cum ar fi carbohidrații,¹ cu o varietate impresionantă de derivați cu valoare adăugată și de compuși cu aplicabilitate practică, cum ar fi solvenți verzi, polimeri, rășini, etc.²

Ca derivat al HMF-ului, 2,5-bis-(hidroximetil)furanul (BHMF) reprezintă o resursă foarte importantă pentru industria chimică, având multe aplicații deja raportate în literatură precum: spume,³ polimeri,⁴⁻⁶ rășini⁷ și intermediar în produse farmaceutice.³ Datorită structurii sale simetrice și a celor două grupări funcționale hidroxil neimpedimentate steric, BHMF-ul este deosebit de interesant ca materie primă pentru obținerea de biopolimeri prin reacții de esterificare. Cu toate acestea, cercetările în domeniul esterilor de BHMF au fost puțin raportate.⁸ De asemenea, triacilglicerolii și acizii grași reprezintă o resursă atractivă datorită disponibilității lor din surse ieftine și sustenabile, cum ar fi uleiurile, dar și din materii prime bogate în acizi grași liberi (HFFA). Prin integrarea unor astfel de resurse în produse pe bază de BHMF, esterii de acizi grași ai BHMF au fost descriși anterior în literatură, cu două proceduri brevetate care au

raportat producția de diesteri ai BHMF-ului prin a) diesterificarea chemocatalitică cu acizi grași liberi și utilizarea lor ca bio-plastifianți; b) sinteza biocatalitică de monoesteri ai BHMF-ului cu acizi grași liberi, cu scopul de a dezvolta noi agenți tensioactivi neionici biodegradabili.^{9,10} Cu toate acestea, sinteza biocatalitică a diesterilor BHMF din resurse regenerabile, ca potențiali aditivi pentru biocombustibili, nu a fost investigată și reprezintă un domeniu de cercetare atrăgător, care a fost analizat în capitolul curent al acestei teze.

2.2. Obiectivele studiului

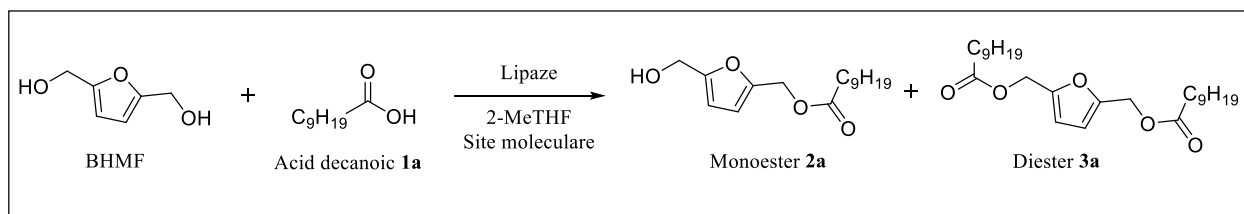
Scopul studiului prezentat în acest capitol a fost dezvoltarea unor strategii biocatalitice sustenabile pentru sinteza diesterilor cu acizi grași ai BHMF-ului, cu potențială aplicabilitate ca aditivi pentru biocombustibili, obținuți exclusiv din resurse regenerabile. Prima metodă dezvoltată s-a bazat pe diesterificarea mediată de lipază a BHMF cu acizi grași saturați disponibili comercial utilizând ca mediu de reacție un solvent organic verde. În acest scop, au fost investigate mai multe lipaze ca biocatalizatori și diferiți solvenți. Lipaza B din *Candida antarctica* imobilizată (CaL-B) și 2-MeTHF s-au dovedit a fi o combinație excelentă pentru sinteza diesterilor de acizi grași ai BHMF-ului și, prin optimizare condițiilor de reacție s-a reușit dezvoltarea unui proces eficient cu randamente ridicate. După testarea aplicabilității diesterilor ca aditivi pentru creșterea cifrei cetanice a biodieselului comercial, a doua metodă dezvoltată s-a bazat pe sinteza diesterilor de acizi grași a BHMF-ului prin utilizarea unui amestec de acizi grași, obținut prin hidroliza uleiului de floarea soarelui, ca materie primă ieftină și ușor disponibilă. Trecerea de la acizi grași saturați (solizi) la amestecuri de acizi grași (FAM) cu un conținut ridicat de acizi grași nesaturați (lichizi) a dus la o abordare complet nouă de obținere a diesterilor de BHMF. În plus, a fost investigată utilizarea FAM-ului ca sursă de acizi grași pentru a dezvolta o procedură enzimatică în condiții eterogene de reacție, fără solvenți pentru diesterificarea BHMF-ului. În cele din urmă, sustenabilitatea ambelor metode a fost evaluată prin calculul indicilor de sustenabilitate corespunzători.

2.3. Rezultate și discuții

2.3.1. Sinteza enzimatică a esterilor de BHMf cu acizi grași saturați utilizând 2-MeTHF ca mediu de reacție

2.3.1.1. Screening-ul de biocatalizatori

Pentru a dezvolta o procedură eficientă de sinteză a diesterilor de acizi grași ai BHMf-ului, a fost selectată esterificarea BHMf-ului cu acid decanoic ca reacție model. 2-MeTHF a fost selectat ca solvent verde pentru investigarea reacției de esterificare datorită aplicabilității sale ca mediu de reacție excelent pentru diverse sinteze organice¹¹ și enzimatică.¹²⁻¹⁶ În aceste condiții, s-a realizat screening-ul mai multor lipaze raportate anterior în producția de biodiesel,¹⁷ ca biocatalizatori în prezența sitelor moleculare la temperatura camerei (**Schema 2.1**).



Schema 2.1. Esterificarea mediată de lipaze a BHMf-ului cu acid decanoic în 2-MeTHF.

Deși s-au utilizat 4 echivalenți de acid decanoic (exces dublu), doar trei dintre enzimele testate au fost capabile să transforme BHMf-ul în esteri cu o conversie globală (OC) semnificativă, conform rezultatelor din **Tabelul 2.1**. Cu toate acestea, doar prin utilizarea lipazei B din *Candida antarctica* immobilizată (Novozym 435) s-a obținut o transformare completă a substratului (**Tabelul 2.1**, OC > 99%) și o conversie excelentă în diesterul corespunzător ($C_{DE} = 92,1\%$) ca produs majoritar al reacției. Pe baza acestor rezultate, pentru experimentele următoare s-a utilizat Novozym 435 ca biocatalizator.

Tabel 2.1. Rezultatele obținute pentru screening-ul de biocatalizatori în reacția de esterificare a BHMf-ului cu acid decanoic în 2-MeTHF^a

Nr. Crt.	Enzima	C_{ME} (%) ^a	C_{DE} (%) ^b	OC (%) ^c
1	Novozym 435	7.3	92.1	99.4
2	SWCNT-CaL-B	53.9	29.5	83.4
3	Lipozyme MM IM	38.5	17.6	56.1
4	Lipozyme TL IM	3.7	0.8	4.5
5	PS Amano IM	12.4	0.3	12.7
6	PS-C Amano II	10.5	0.2	10.7

^aRezultate după 24 de ore. ^bConversie în monoester C_{ME} ; ^cConversie în diester C_{DE} ; Conversia globală a BHMf-ului în esteri OC.

2.3.1.2. Investigarea solventului

Deși s-au obținut rezultate excelente cu Novozym 435 ca biocatalizator în esterificarea BHMF cu acid decanoic în 2-MeTHF, alți solvenți au fost de asemenea testați ca mediu de reacție. În mod surprinzător, s-au obținut rezultate bune până la excelente în toți solvenții testați, similar cu cele obținute la utilizarea 2-MeTHF ca solvent (**Tabelul 2.2**). Cu toate acestea, 2-MeTHF-ul a fost considerat solventul optim datorită performanței sale și ținând cont de disponibilitatea din resurse regenerabile și de natura sa benignă pentru mediul înconjurător.

Tabelul 2.2. Rezultatele obținute pentru esterificarea enzimatică a BHMF cu acid decanoic în diferiți solvenți.

Nr. Crt.	Solvent	C _{ME} (%)	C _{DE} (%)	OC (%)
1	2-MeTHF	7.3	92.1	99.4
2	THF	37.7	55.1	92.8
3	DIPE	5.9	92.5	98.4
4	MTBE	5.6	92.4	98.0
5	Acetone	7.1	91.9	98.9
6	ACN	31.1	62.8	93.9
7	1,4-Dioxane	12.0	86.8	98.8

Rezultate după 24 de ore.

2.3.1.3. Optimizarea raportului molar între BHMF și acidul gras

În continuare, după selectarea unui biocatalizator și a unui solvent adecvat, a fost efectuată optimizarea succesivă a condițiilor de reacție. Primul parametru investigat a fost raportul molar între acidul gras și BHMF, deoarece screening-ul precedent a fost efectuat cu un exces stoechiometric dublu de acid gras (acid decanoic : BHMF, raport molar 4:1). Din această perspectivă, experimentele au fost efectuate folosind diferite raporturi molare acid decanoic: BHMF între 2:1 și 6:1. Conform datelor din **Tabelul 2.3**, o cantitate stoechiometrică de acid gras a dus la o conversie globală ridicată în esteri (OC = 93,2%), dar distribuția produșilor a fost nesatisfăcătoare după 24 de ore cu C_{DE} atingând doar 64,4%. Creșterea raportului molar a furnizat un optim la un raport molar de 4:1 cu un C_{DE} ridicat de 93,2 %, în timp ce o creștere adițională a raportului molar nu a dus la creșterea cantității de diester obținută.

Tabel 2.3. Efectul raportului molar între acidul gras și BHMF în reacția de esterificare enzimatică a BHMF-ului.

Nr. Crt.	Raport molar acid decanoic/BHMF	C _{ME} (%)	C _{DE} (%)	OC (%)
1	2 : 1	28.8	64.4	93.2
2	2,5 : 1	24.8	74.0	97.5
3	3 : 1	14.3	84.8	99.1
4	3,5 : 1	12.9	86.1	99.1
5	4 : 1	6.3	93.2	99.5
6	5 : 1	6.9	92.9	99.9
7	6 : 1	5.9	93.8	99.7

Rezultate după 24 de ore.

2.3.1.4. Influența sitelor moleculare

Pentru a deplasa echilibrul reacției enzimatică înspre formarea diesterilor doriți, s-a optimizat în continuare cantitatea de site moleculare. În consecință, reacțiile au fost efectuate cu diferite cantități de site moleculare la temperatura camerei. În cazul reacției efectuate în absența sitelor moleculare, s-a observat o conversie globală nesatisfăcătoare de 60% și un conținut în monoester de trei ori mai mare decât diester după 24 de ore (**Tabel 2.4**). Adăugarea chiar și a unor cantități mici de site moleculare (25 mg) în reacție a dus la o creștere substanțială a conversiei totale (OC = 96,2%), precum și la producerea diesterului ca produs majoritar al reacției ($C_{DE} = 63,0\%$). Creșterea suplimentară a conținutului de adsorbant a îmbunătățit treptat randamentul reacției și, deși s-a realizat o conversie completă a BHMf cu site moleculare de numai 50 mg, conversia aproape cantitativă a BHMf în diesteri decanoici a fost atinsă doar prin utilizarea a 200 mg de site moleculare ($C_{DE} = 98,4\%$).

Tabelul 2.4. Influența cantității de site moleculare în reacția de esterificare enzimatică a BHMf-ului cu acid decanoic.

Nr. Crt.	Site moleculare (mg)	C_{ME} (%)	C_{DE} (%)	OC (%)
1	0	46.3	13.5	59.8
2	25	33.2	63.0	96.2
3	50	7.8	91.9	99.8
4	100	5.9	94.1	99.9
5	150	2.5	97.4	99.9
6	200	1.5	98.4	99.9

Rezultate după 24 de ore.

2.3.1.5. Optimizarea temperaturii de reacție și a reutilizării biocatalizatorului

În continuare, influența temperaturii asupra vitezei de reacție enzimatică a fost studiată la diferite temperaturi din intervalul 20-60 °C. După cum se poate observa în **Tabelul 2.5**, s-a realizat o conversie completă în esteri la toate temperaturile testate după 24 de ore de reacție, cu o conversie crescătoare în diester odată cu creșterea temperaturii, cu excepția unui minim local la aproximativ 40 °C.

Tabelul 2.5. Efectul temperaturii asupra esterificării enzimatică a BHMf cu acid decanoic.

Nr. Crt.	Temperatura (°C)	C_{ME} (%)	C_{DE} (%)	OC (%)
1	20	7.9	91.9	91.9
2	30	2.3	97.3	97.3
3	35	2.8	96.7	96.7
4	40	11.1	88.6	88.6
5	45	3.1	95.7	95.7
6	50	2.6	97.1	97.1
7	60	2.2	97.6	97.6

Rezultate după 24 de ore.

Deoarece esterificările enzimaticе au dat rezultate similare la diferite temperaturi de reacție după 24 de ore, timpul optim de reacție a fost investigat în continuare prin analiza profilului conversiei în timp al reacțiilor efectuate la 30 °C și 50 °C. Conform profilului obținut la 30 °C (**Figura 2.1 A**), s-a observat o transformare completă a BHMF-ului după 6 ore (OC > 99%), în timp ce conversia în diester a atins o conversie favorabilă de peste 96% în produsul dorit după 12 ore. În comparație, la temperatura de 50 °C (**Figura 2.1 B**) se remarcă atingerea conversiei complete a BHMF-ului în esteri în doar 2 ore, cu o conversie în diester de peste 96% după doar 6 ore de reacție.

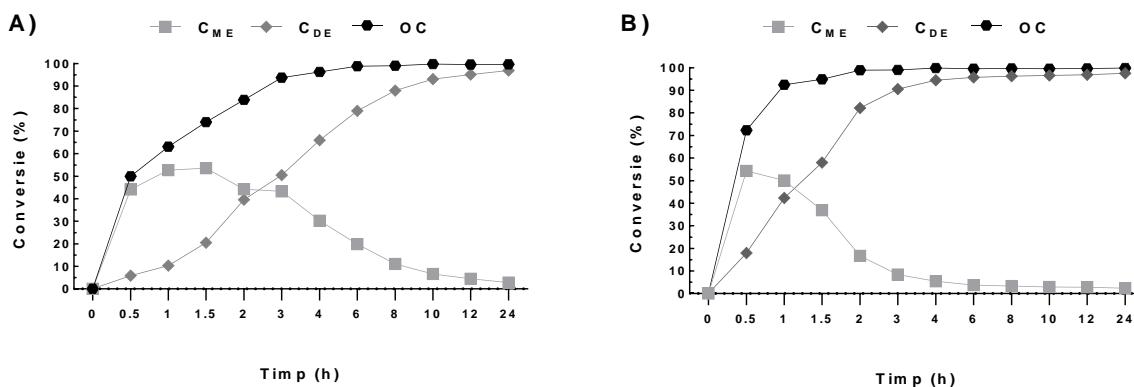


Figura 2.1. Profilul conversiei în timp a reacției de esterificare efectuată la A) 30 °C și la B) 50 °C.

Deși s-a obținut o viteză de reacție mai mare la 50 °C decât la 30 °C, temperatura optimă ar trebui selectată și pe baza influenței asupra stabilității și reutilizării biocatalizatorului. Din această perspectivă, reutilizarea enzimei a fost de asemenea testată în reacții succesive la 30 °C și 50 °C. După cum este prezentat în **Figura 2.2 B**, activitatea enzimei a scăzut treptat la 50 °C pe parcursul celor zece reutilizări, rezultând într-o scădere severă atât a conversiei globale (~35%), cât și a conversiei în diester (~75%). În comparație, s-a observat un impact redus asupra reciclabilității enzimei la 30 °C (**Figura 2.2 A**) cu o scădere de numai ~8% a conversiei globale după 10 utilizări consecutive și o scădere de numai ~25% a conversiei în diester. Astfel, ținând cont atât de reciclabilitatea biocatalizatorului, cât și de conversia substratului, s-a considerat ca optim efectuarea reacției la 30 °C timp de 12 ore, pentru a menține o stabilitate bună a catalizatorului pe parcursul mai multor reutilizări.

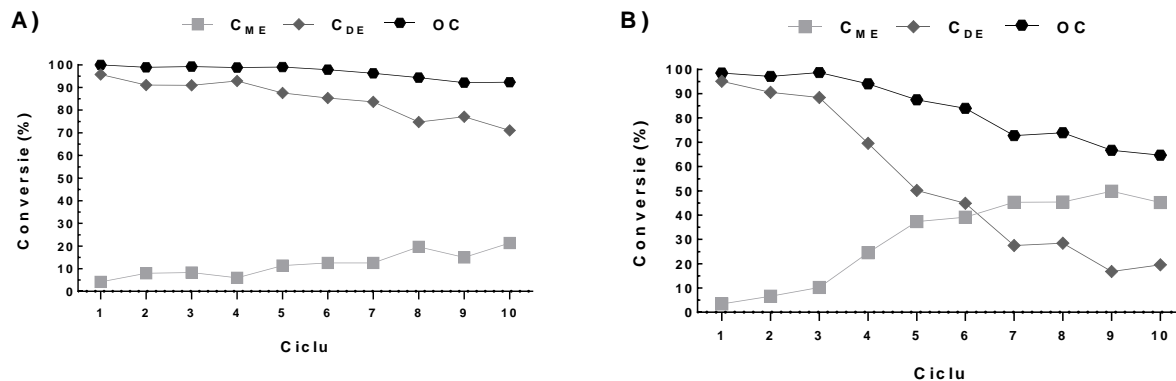


Figura 2.2. Reutilizarea biocatalizatorului Novozym 435 la **A)** 30 °C și la **B)** 50 °C , în cicluri discontinue de 12 ore.

2.3.1.6. Influența acidului gras

În condițiile optime determinate, a fost investigată în continuare posibilitatea utilizării altor acizi grași saturați și, de asemenea, influența lungimii lanțului alchil al acestor acizi. După cum este ilustrat în **Tabelul 2.6**, esterificarea BHMf-ului cu acizi grași testați a dus la conversia cantitativă a substratului în esteri, cu conversii globale $C > 99\%$ în toate cazurile. Deoarece nu s-a putut stabili o corelație între lungimea acidului gras și selectivitate enzimică, s-a ajuns la concluzia că diesterificarea enzimatică a BHMf-ului mediată de Novozym 435 decurge cu o eficiență similară indiferent de acidul gras utilizat.

Tabelul 2.6. Esterificarea enzimatică a BHMf-ului cu acizi grași **1a-e**.

Nr. Crt.	Acid gras	C _{ME} (%)	C _{DE} (%)	OC (%)
1	Acid decanoic (1a)	3.1	96.9	>99.9
2	Acid dodecanoic (1b)	4.5	95.5	>99.9
3	Acid tetradecanoic (1c)	10.7	89.3	>99.9
4	Acid hexadecanoic (1d)	1.0	99.0	>99.9
5	Acid octadecanoic (1e)	2.6	97.4	>99.9

Rezultate după 12 ore.

2.3.1.7. Optimizarea concentrației de BHMf și acid gras.

Pentru a crește productivitatea procesului de esterificare, s-a realizat optimizarea concentrației de reactanți în 2-MeTHF. Reacțiile au fost efectuate în condiții optime cu aceleași cantități de biocatalizator și de site moleculare, păstrând constant raportul molar al reactanților. După cum este prezentat în **Tabelul 2.7**, creșterea concentrației reactanților până la saturație, a rezultat în conversii globale excelente ($> 99\%$) după 12 ore de reacție, cu o conversie mai mare de 93% în diester decanoic, chiar și la o concentrație de 0,5 M de BHMf. Mai mult, evaluarea

profilului conversiei în timp a arătat o creștere a vitezei de reacție odată cu creșterea concentrației până la 0,4 M BHMF, urmată de o scădere ușoară la 0,5 M. Pe baza rezultatelor obținute, în continuare s-au efectuat reacțiile de esterificare la limita de saturație a reactanților.

Tabelul 2.7. Efectul concentrației de BHMF asupra reacției de esterificare enzimatică la un raport molar acid decanoic: BHMF de 4:1

Nr. Crt.	BHMF (M)	Acid decanoic (M)	C _{ME} (%)	C _{DE} (%)	OC (%)
1	0.05	0.2	4.5	95.1	99.6
2	0.1	0.4	4.9	94.1	99.0
3	0.2	0.8	4.7	94.8	99.4
4	0.3	1.2	4.3	95.2	99.6
5	0.4	1.6	4.9	94.8	99.7
6	0.5	2	6.2	93.4	99.6

Rezultate după 12 ore.

2.3.1.8. Optimizarea cantității de biocatalizator utilizată

În final, a fost investigată cantitatea de biocatalizator utilizată în procesul de esterificare, cu scopul de a asigura o strategie biocatalitică rentabilă din punct de vedere economic, prin utilizarea unei cantități minime de enzimă. În mod surprinzător, o conversie globală mai mare de 99% a fost atinsă după 12 ore chiar și la utilizarea unei cantități de 5 mg/mL biocatalizator. Examinând distribuția produșilor de reacție în timp, s-a observat că viteza de formare a diesterului este mai lentă pe măsură ce cantitatea de biocatalizator este redusă. Cu toate acestea, conversia în diesteri a atins o conversie adecvată doar după 12 ore de reacție, indiferent de cantitatea de enzimă utilizată, așa cum este prezentat în **Figura 2.3**.

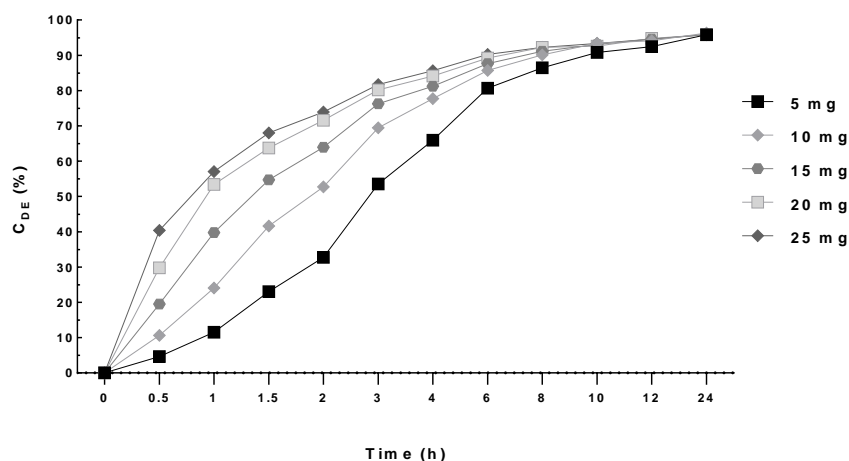


Figura 2.3. Profilul conversiei în timp a BHMF-ului în diesterul decanoic **3a** (C_{DE}), la diferite cantități de biocatalizator.

Prelungind timpul de reacție la 24 de ore, a fost detectată o ușoară creștere pentru conversiile în diester în toate cazurile. În consecință, o încărcare cu enzimă de 0,5% a fost considerată optimă și a fost utilizată în investigațiile următoare.

2.3.1.9. Esterificarea enzimatică la scară preparativă a BHMF-ului cu acizii grași 1a-e în condiții optime

Pe baza rezultatelor obținute la scară analitică în condițiile optime, au fost efectuate experimente la scară preparativă cu acizii grași **1a-e**. Cu toate acestea, deoarece solubilitatea acizilor grași în 2-MeTHF a scăzut odată cu creșterea masei moleculare a acidului gras, volumul amestecului de reacție a fost crescut în mod corespunzător pentru a dizolva complet acizii grași. Volumele și concentrațiile finale utilizate, precum și conversiile în diesteri și randamentele finale obținute sunt prezentate în **Tabelul 2.8**.

Tab 2.8. Conversiile și randamentele obținute pentru esterificarea enzimatică a BHMF-ului cu acizi grași **1a-e** la scară preparativă.

Nr. Crt.	Acid gras	Volumul masei de reacție (mL)	Concentrația de BHMF (M)	Concentrația de acid gras (M)	C _{DE} (%)	Randament (%)
1	1a	100	0.5	2	96.7	82.5
2	1b	100	0.5	2	96.8	84.4
3	1c	110	0.45	1.8	97.4	89.7
4	1d	166	0.3	1.2	99.1	91.3
5	1e	250	0.2	0.8	99.7	92.2

Rezultate după 12 ore.

2.3.1.10. Sinteza la scară largă a diesterului decanoic al BHMF-ului și evaluarea performanței ca aditiv pentru biodiesel

Pentru a evalua potențialul diesterilor obținuți ca aditivi pentru biodiesel, a fost efectuată o sinteză la scară largă pornind de la 64 g BHMF (0,5 mol) și acid decanoic în condiții identice cu cele utilizate la scară preparativă. După obținerea cu succes a diesterului decanoic pur (188,2 g, $\eta=86,2\%$), s-a preparat 3 L de biodiesel aditivat (cu 5% diester, procente masice) și s-a testat într-o unitate de analiză a biocombustibililor acreditată. Rezultatele au arătat că cifra cetanică a biodieselului aditivat a crescut cu ~ 4,5 % (**Tabelul 2.9**), în timp ce celelalte proprietăți fizico-chimice testate au avut valori apropiate de cele ale biodieselului standard.

Tabel 2.9. Rezultatele testelor de performanță ale diesterului **3a**, a biodieselului standard și a biodieselului aditivat cu diester **3a**.

Nr. Crt.	Proba	Puterea calorică brută [J/g]	Densitate la 15 °C [kg/m ³]	Punct de aprindere [°C]	Cifra cetanică
1	Diester 3a (compus pur)	34340	n.d.	n.d.	n.d.
2	Biodiesel (standard)	39645	888.4	188	54.9
3	Biodiesel aditivat (cu 5% diester 3a)	39440	891.0	220	57.4

2.3.2. Sinteza enzimatică a esterilor de BHMf cu acizi grași nesaturați, ulei de floarea soarelui și FAM în 2-MeTHF

În continuare, a fost investigat uleiul de floarea soarelui și un amestec de acizi grași (FAM) obținut prin hidroliza completă a uleiului de floarea soarelui, ca materii prime regenerabile pentru reacția de esterificare enzimatică a BHMf-ului. Acidul oleic și acidul linoleic au fost testați inițial pentru esterificarea BHMf cu Novozym 435 în 2-MeTHF pentru a verifica dacă aceștia sunt transformați în diesterii corespunzători cu o eficiență similară cu cea obținută la utilizarea acizilor grași saturați. Folosind un raport molar de 4:1 (acid gras: BHMf), s-au observat conversii cantitative (OC > 99%) după 24 de ore de reacție, așa cum este prezentat în **Tabelul 2.10**. După cum era de așteptat, prin utilizarea FAM-ului obținut prin hidroliza uleiului de floarea soarelui s-au obținut rezultate excelente cu o conversie completă a BHMf-ului și o conversie în diesteri $C_{DE} = 93,5\%$ (**Tabelul 2.10**). Alternativ, a fost testată și transesterificarea BHMf-ului cu ulei de floarea soarelui, dar s-a observat o conversie scăzută, majoritar în monoesteri corespunzători.

Tabelul 2.10. Testarea acidului oleic, acidului linoleic, uleiului de floarea soarelui și a FAM-ului ca sursă de acizi grași pentru sinteza diesterilor de BHMf.

Nr. Crt.	Sursa de acid gras	C_{ME} (%)	C_{DE} (%)	OC (%)
1	Acid oleic	8.2	91.7	99.9
2	Acid linoleic	14.9	85.0	99.9
3	Ulei de floarea soarelui	22.2	1.1	23.3
4	FAM	6.5	93.5	>99.9

*Rezultate după 24 de ore.

Pe baza rezultatelor obținute cu FAM ca sursă de acizi grași, s-a investigat și influența raportului masic între 2-MeTHF și FAM, cu scăderea cantității de solvent din amestecul de reacție de la 1 mL la 0 mL, corespunzător unui raport masic 2-MeTHF: FAM între 1,06-0,00 (m/m). În timpul preparării amestecului de reacție, s-a observat că odată cu scăderea conținutului de 2-MeTHF sub ~0,5 ml (0,53 greutate/greutate), amestecul de reacție devine eterogen datorită

suprasaturării în BHMF. Analizând amestecurile de reacție după 24 de ore, conversia totală a substratului a fost mai mare de >99% indiferent de cantitatea de solvent utilizată, în timp ce conversia în diesteri a scăzut cu ~ 2 (**Tabel 2.11**). În absența solventului, esterificarea enzimatică a decurs prin solubilizarea continuă a BHMF-ului în amestecul de reacție și s-a obținut o conversie de 68,6% în diesterii corespunzători, cu o conversie globală excelentă a substratului de 96,3% (**Tabelul 2.11**).

Tabelul 2.11. Influența conținutului de 2-MeTHF în reacția de esterificare a BHMF-ului cu FAM.

Nr. Crt.	Raport masic 2-MeTHF/FAM(m/m)	C _{ME} (%)	C _{DE} (%)	OC (%)
1	0	27.7	68.6	96.3
2	0.26	8.5	91.3	99.9
3	0.53	9.4	90.3	99.7
4	0.79	9.1	90.6	99.7
5	1.06	6.4	93.6	>99.9

*Rezultate după 24 de ore.

2.3.3. Sinteza enzimatică a esterilor BHMF-ului cu FAM în absența solventului

În continuare, cu scopul de a explora o procedură fără solvent ca alternativă pentru sinteza diesterilor BHMF-ului, mai mulți factori au fost reevaluați și optimizați pentru a dezvolta un proces eficient.

2.3.3.1 Influența temperaturii asupra esterificării enzimatică în absența solventului

În scopul creșterii eficienței reacției de esterificare enzimatică, a fost evaluată influența temperaturii pentru reacțiile efectuate în absența solventului (solvent-free). Datorită absenței solventului în amestecul de reacție, îndepărtarea apei rezultate a fost realizată folosind un vid de 15 mbar ca alternativă la sitele moleculare, iar reacțiile au fost investigate la diferite temperaturi din intervalul 30-60 °C. Rezultatele obținute sunt prezentate în **Tabelul 2.12** și s-a observat că o temperatură mai mare de 40 °C a facilitat îndepărtarea eficientă a apei din masa de reacție și a dus la obținerea unor conversii mari în diesteri între 96,9-98,7%. Evaluarea profilului conversiei în timp în intervalul 40-60 °C este reprezentată în **Figurile 2.4 A-C** și s-a observat că viteza de reacție crește cu temperatura, cu o dependență exponențială a conversiei în timp la 50 °C și 60 °C, iar la temperatura de 40 °C, conversia a arătat o dependență liniară, așa cum este prezentată în **Figura 2.4 A**. Comparând rezultatele obținute, s-a ajuns la concluzia că la temperatura de 50 °C și 60 °C, etapa determinantă de viteză a procesului este datorată procesului de esterificare enzimatică, în timp ce la temperaturi mai mici de 40 °C viteza reacției de esterificare este

controlată prin difuzia substratului sau prin solubilizarea treptată a BHMF-ului în amestecul de reacție.

Tabel 2.12. Influența temperaturii asupra reacției de esterificare a BHMF-ului cu FAM în absența solventului și sub vid.

Nr. Crt.	Temperatura (°C)	C _{ME} (%)	C _{DE} (%)	OC (%)
1	30	42.9	45.9	88.8
2	40	3.4	96.6	>99.9
3	50	1.8	98.2	>99.9
4	60	1.3	98.7	>99.9

Rezultate după 24 de ore.

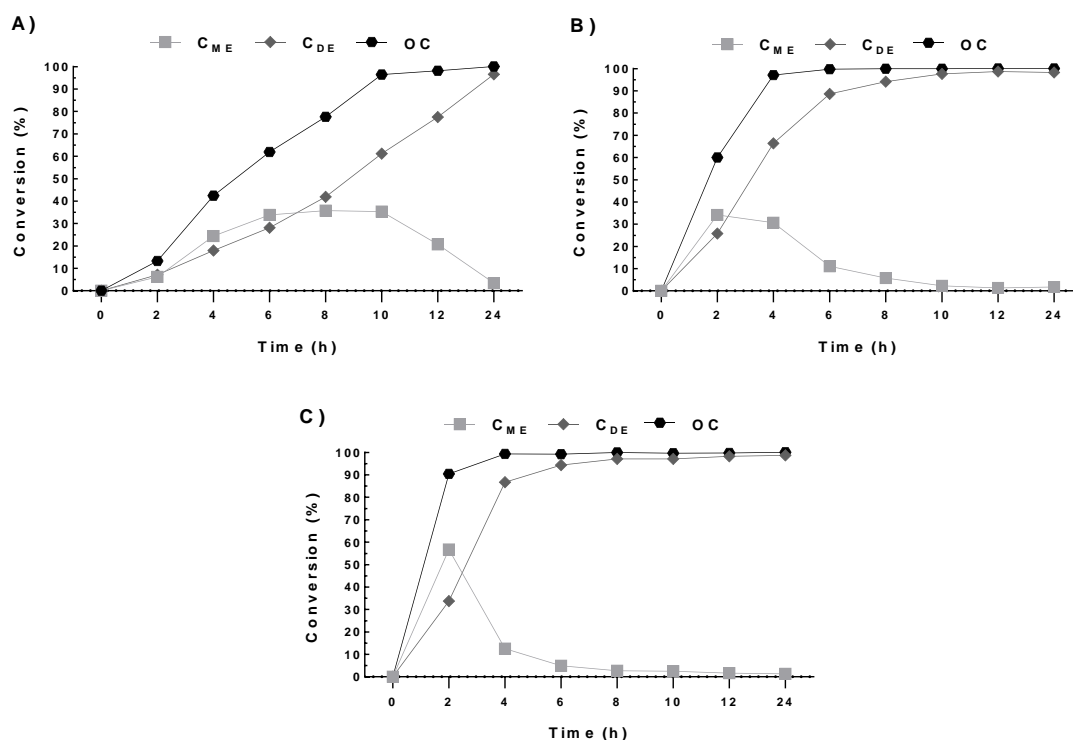


Figura 2.4. Profilul conversiei în timp pentru reacția de esterificare a BHMF cu FAM în absența solventului la A) 40 °C, B) 50 °C și C) 60 °C

2.3.3.2. Influența raportului BHMF: FAM

În continuare, influența raportului molar între FAM și BHMF a fost investigată. Reacțiile au fost efectuate cu diferiți echivalenți de FAM (la 60 °C, sub vid), scăzând cantitatea de acizi grași până la un raport aproximativ stoechiometric de FAM raportat la cantitatea de BHMF. În aceste condiții, conversia totală a atins mai mult de 99% după 12 ore utilizând un raport de 2:1,

în timp ce pentru conversia în diesteri s-a înregistrat o scădere treptată odată cu scăderea cantității de FAM (**Tabelul 2.13**). O conversie în diesteri de ~95% pentru un raport molar de aproximativ 2:1 a oferit o eficiență globală mai mare și a fost considerată optimă pentru procesul fără solvent.

Tabelul 2.13. Influența echivalenților de FAM în reacția de esterificare a BHMF în absența solventului.

Nr. Crt.	Echivalenți de FAM	C _{ME} (%)	C _{DE} (%)	OC (%)
1	2	5.1	94.6	99.7
2	2.25	3.7	96	99.7
3	2.5	2	97.6	99.5
4	3	1.8	97.9	99.7
5	4	1.6	98.2	99.7

Rezultate după 12 ore.

2.3.3.3. Influența cantității de biocatalizator

De asemenea, a fost reevaluată și cantitatea optimă de biocatalizator necesară pentru esterificarea eficientă a BHMF în diesteri în absența solventului. Experimentele la scară semi-preparativă au fost efectuate la 60 °C folosind 5 mmol de BHMF (640 mg) și o cantitate stoechiometrică de FAM, cu diferite cantități de enzimă între 0,5-2,5% (cantitatea de enzimă raportată la cantitatea de BHMF). Rezultatele obținute după 12 ore au indicat că o cantitate de enzima de 0,5% este insuficientă pentru a atinge o conversie dorită în diesteri (**Tabel 2.14**), totuși, o cantitate de 1% sau mai mare a rezultat în conversii globale mai mari de 99% și conversii excelente în diesteri. Când timpul de reacție a fost extins la 24 de ore, o conversie aproape cantitativă în diesteri a fost observată chiar și la utilizarea unei cantități de enzimă de 1% și a fost considerată optimă în acest studiu.

Tabelul 2.14. Efectul cantității de biocatalizator în reacția de esterificare enzimatică a BHMF în absența solventului.

Nr. Crt.	Masa de biocatalizator (mg)	Cantitatea de enzimă (%)	După 12 ore			După 24 ore		
			C _{ME} (%)	C _{DE} (%)	OC (%)	C _{ME} (%)	C _{DE} (%)	OC (%)
1	50	0.5 %	44.3	52.3	96.7	11.3	88.1	99.4
2	100	1 %	8.4	91.3	99.7	2.8	97.1	>99.9
3	150	1.5 %	6.9	92.9	99.8	3.1	96.9	>99.9
4	200	2 %	7	92.8	99.8	2.8	97.1	>99.9
5	250	2.5 %	5.1	94.6	99.7	3	96.9	>99.9

2.3.3.4. Sinteza enzimatică la scară preparativă a diesterilor BHMF-ului cu FAM în absența solventului

Sinteza la scară preparativă a diesterilor BHMF-ului cu FAM în absența solventului a fost efectuată utilizând condițiile optime determinate anterior (vid, 60 °C, raport molar 2:1

FAM: BHMF, 1% enzimă, 24 de ore). Masa de reacție a fost prelucrată și fracția de diesteri obținută a fost izolată cu un randament de 89,6%.

2.3.4. Evaluarea indicilor de sustenabilitate

Evaluarea cantitativă a sustenabilității a ambelor proceduri dezvoltate în acest studiu a fost efectuată în conformitate cu literatura recentă.^{18,19} Pentru a compara cele două proceduri, sinteza la scară preparativă a diesterilor BHMF-ului cu acid stearic în 2-MeTHF (Metoda A) și cu FAM în absența solventului (Metoda B) a fost luată în considerare datorită faptului că acidul stearic (284,48 g/mol) are o masă moleculară similară cu masa moleculară medie calculată pentru FAM ($\approx 280,8$ g/mol). Indicii calculați sunt ilustrați în **Tabelul 2.15** și arată că ambele metode prezintă parametri de sustenabilitate foarte buni, procesul realizat în absența solventului având indicatori superiori.

Tabel 2.15. Indicii de sustenabilitate calculați pentru cele două metode dezvoltate de esterificare a BHMF-ului cu acizi grași.

Indici de sustenabilitate						
Nr. Crt.	Metoda	Factor E	Economia de Atom	Eficiența de Atom	Intensitatea de Masă	Eficiența Masei de Reacție
1	A*	1.05	94.8	87.5	10.6	48.2
2	B**	0.11	94.8	84.9	1.9	87.4

* Esterificarea enzimatică a BHMF-ului cu acid stearic în 2-MTFH în prezența sitelor moleculare.

** Esterificarea enzimatică a BHMF-ului cu FAM în absența solventului și sub vid.

2.4. Concluzii

Studiul efectuat demonstrează valorificarea biocatalitică a 2,5-bis-(hidroximetil)furanului drept compus chimic de platformă regenerabil, prin diesterificarea mediată de lipază cu acizi grași proveniți din surse biologice, cu scopul obținerii de diesteri ai BHMF-ului cu acizi grași și utilizarea lor ca aditivi pentru biocombustibili. Investigarea mai multor lipaze immobilizate ca biocatalizatori pentru diesterificarea BHMF cu acizi grași saturați în 2-MeTHF ca solvent verde, a arătat că Novozym 435 este un catalizator adecvat, cu o compatibilitate excelentă atât cu substratul cât și cu solventul utilizat. În condiții optime (raport molar 4:1 de acizi grași: BHMF, site moleculare de 200 mg, 30 °C și o încărcare enzimatică de 0,5%), s-a obținut o conversie excelentă a substratului în diesteri chiar și la concentrații ridicate de reactanți, oferind în același timp și o reutilizare bună a biocatalizatorului. De asemenea, s-au observat o selectivitate similară și randamente ridicate pentru reacțiile de esterificare a BHMF-ului cu acizii grași utilizați la scară analitică, preparativă cât și la scară largă. Studiul descrie de asemenea și prima investigație a diesterilor de acizi grași ai BHMF-ului ca aditivi pentru creșterea cifrei cetanice al biodieselului comercial.

Ca alternativă promițătoare, utilizarea acizilor grași lichizi sau a amestecurilor lichide de acizi grași derivați din uleiul de floarea soarelui a permis dezvoltarea unei strategii de sinteza a diesterilor BHMF-ului în condiții eterogene și în absența solventului. În ciuda solubilității scăzute a BHMF-ului în FAM, s-a observat că esterificarea substratului are loc prin solubilizarea treptată în amestecul de reacție. Optimizarea procedurii în absența solventului a demonstrat că esterificarea enzimatică poate fi efectuată și în absența solventului, prin înlocuirea sitelor moleculare cu vid, totuși este necesară o temperatură minimă de 40 °C pentru îndepărtarea eficientă a apei din masa de reacție, în timp ce o temperatură de 60 °C este necesară pentru a obține un randament maxim al procesului cu o viteză mare de reacție. De asemenea, s-a obținut o eficiență superioară prin scăderea raportului molar FAM:BHMF, cu o conversie aproape cantitativă în diesteri chiar și la un raport stoechiometric între reactanți și cu o cantitate de enzimă de 1%.

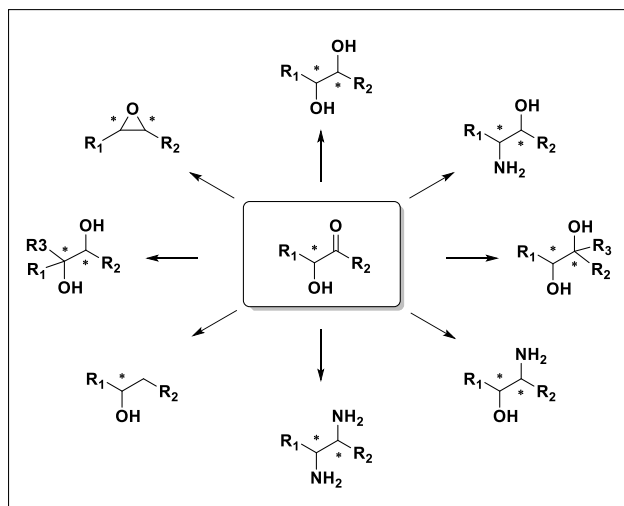
În final, s-a realizat o evaluare cantitativă a sustenabilității ambelor proceduri prin efectuarea reacțiilor de esterificare la scară preparativă cu ambele metode descrise în acest capitol. Rezultatele au demonstrat că ambele metode prezintă valori foarte bune ale indicilor de sustenabilitate, cu valori superioare în cazul procesului realizat în absența solventului.

3. Capitolul II. Noi biocatalizatori cu celule întregi pentru sinteza de aciloine optic active

3.1. Introducere. Prezentare generală a literaturii.

3.1.1. α -Hidroxicetone optic active (aciloine)

α -Hidroxicetonele (aciloine) sunt compuși chimici care conțin o grupare hidroxil atașată la un carbon α adiacent unei grupări carbonil. Din punct de vedere structural, aciloinele au în structură un atom de carbon chiral responsabil pentru activitatea lor optică (și în cele mai multe cazuri, activitatea lor biologică) și un carbon prochiral care poate fi exploatat pentru a obține un alt stereocentru, extinzând astfel foarte mult posibilele lor aplicații ca sintoni chirali. Motivul α -hidroxicetonă reprezintă un grup funcțional versatil având aplicații importante în sinteza multor precursori chirali. În consecință, acești compuși valoroși pot fi transformați în multe alte tipuri de compuși chirali (**Figura 3.1**), cum ar fi 1,2-dioli, epoxizi, amine (sau diamine), alcoolii și aminoalcoolii.²⁰



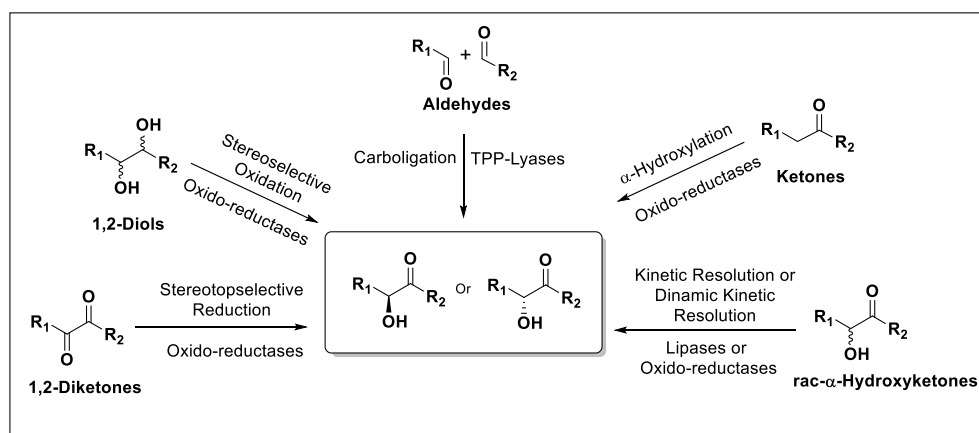
Schema 3.1. Compuși optic activi care pot fi obținuți pornind de la α -hidroxicetone ca precursori chirali.

Pe baza acestei versatilități și chiralității specifice, α -hidroxicetonele au găsit diverse aplicații în special în sectorul farmaceutic, multe exemple de aciloine active biologic sau derivați de aciloină fiind descrise în literatură.^{21,22,23,24,25} Luând în considerare importanța lor actuală și viitoare, au fost raportate numeroase strategii chimice pentru sinteza lor asimetrică și pot fi generalizate în felul următor: condensarea asimetrică a două aldehide diferite; α -hidroxilarea cetonelor (prin oxidarea enolatului); cetohidroxilarea olefinelor; oxidarea selectivă și asimetrică a 1,2-diolilor sau reducerea stereoselectivă a 1,2-dicetonelor; rezoluție cinetică sau rezoluție

cinetică dinamică prin oxidarea aciloinelor racemice etc.^{21,26} Pe lângă strategiile chimice menționate, strategiile biocatalitice pot fi folosite cu succes în sinteza aciloinelor asimetrice. Prin intermediul biocatalizei, acești compuși pot fi obținuți cu randamente relevante economic, cu chimio-, regio- și stereoselectivități ridicate, susținând în același timp principiile unei chimii ecologice și sustenabile.²⁷

3.1.2. Metode de obținere biocatalitice a α -hidroxicetonelor optice active

Datorită semnificației lor sintetice, obținerea prin mijloace biocatalitice a α -hidroxicetonelor asimetrice a primit o atenție sporită și au fost dezvoltate de-a lungul timpului mai multe strategii enzimatiche de sinteză. Din această perspectivă, multe clase de enzime au fost exploatate cu succes pentru sinteza acestor compuși precum hidrolaze, oxido-reductaze și liaze; așa cum este prezentat în **Schema 3.2**.²¹



Schema 3.2. Strategii biocatalitice generale utilizate pentru obținerea de α -hidroxicetone optice active.

Deși au fost raportate mai multe metode prin utilizarea lipazelor și oxido-reductazelor, metoda cea mai cercetată și viabilă din punct de vedere economic de obținere a α -hidroxicetonelor rămâne utilizarea liazelor tiamin-pirofosfat-dependente (TPP). Liazele TPP-dependente sunt enzime implicate într-o multitudine de căi metabolice și catalizează o mare varietate de reacții, fiind capabile să efectueze decarboxilarea oxidativă/neoxidativă, formarea de legături asimetrice (legături C-C, C-O, C-S și C-N) și rupere de legături C-C.²⁸ Pe lângă rolul lor biologic, aplicabilitatea promiscuă a enzimelor dependente de TPP a fost deja demonstrată de numeroase exemple prezentate în literatură în ultimele decenii.²⁹

TPP-liazele catalizează formarea de α -hidroxicetone îmbogățite enantiomeric printr-o formare stereoselectivă de legături C-C de tip umpolung (inversie de polaritate) între o aldehydă

și un „donor” adecvat.²⁰ Pe scurt, ciclul catalitic începe cu o adiție nucleofilă a cofactorului TPP (forma anionică) la o aldehydă „donor”. După deprotonare, se formează un carbanion enamină. Carbanionul acționează în continuare ca nucleofil și atacă carbonul carbonilic al aldehydei „acceptor”, ducând la formarea legăturii C-C. În cazul liazelor de tip decarboxilază, carbanionul de enamină este format prin decarboxilarea unui 2-cetoacid „donor”, care este atacat mai întâi de anionul TPP pentru a genera un aduct intermediar. Carbanionul enaminic format prin eliberarea dioxidului de carbon reacționează în continuare cu alhida acceptor pentru a forma α -hidroxi cetona corespunzătoare. Stereoselectivitatea reacției de formare a legăturii C-C este, ca în majoritatea reacțiilor enzimice, controlată de structura enzimei care ajută la discriminarea între cele două fețe enantiotopice ale aldehydei „acceptoare”.³⁰ Mai multe TPP-liaze au fost raportate ca biocatalizatori eficienți pentru formarea unei game largi de α -hidroxicetone, cum ar fi benzaldehidă liaza (BAL, EC 4.1.2.38), benzoilformiat decarboxilază (BFD, EC 4.1.1.7), piruvat decarboxilază (PDC, EC 4.1.1.1), fenilpiruvat decarboxilază (PhDC, EC 4.1.1.43) și indol-3-piruvat decarboxilază (InPDC, EC 4.1.1.74).^{20,31–35}

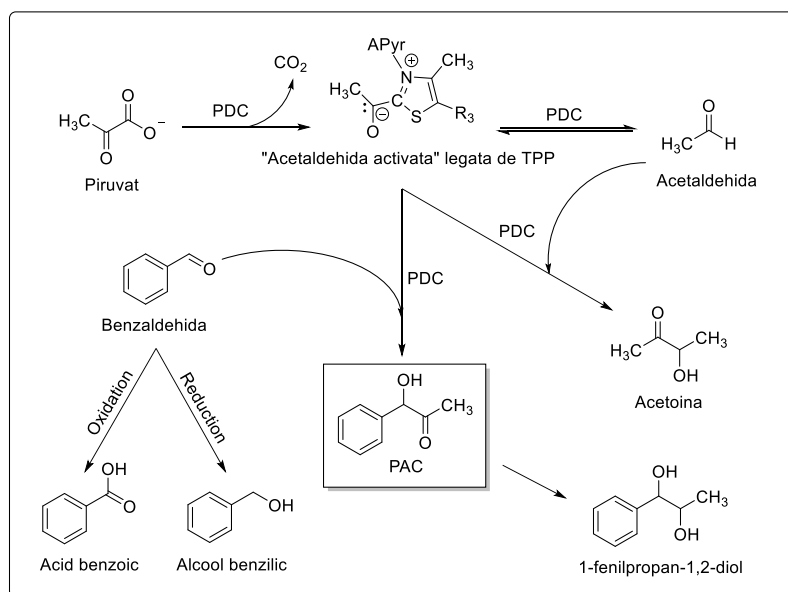
3.1.3. Sinteza catalizată de PDC a fenilacetilcarbinolului și ai analogilor de fenilacetilcarbinol

Piruvat decarboxilaza (E.C. 4.1.1.1) este prima enzimă dependentă de TPP și ioni de magneziu exploatată în sinteza α -hidroxicetonelelor chirale și, de asemenea, unul dintre cele mai vechi procese biocatalitice care a fost implementat cu succes la scară industrială. Genele care codifică enzimele PDC au fost identificate și izolate din multe organisme precum drojdiile sau ciupercii (*Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarium*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida utilis*, *Rhizopus javanicus* etc.), bacterii (*Zymomonas mobilis* și *Acetobacter pasteurianus*) și plante (orez, mazăre și tutun).^{20,36}

Pe lângă rolul său principal în glicoliză, PDC catalizează și reacția de condensare acilonică ca reacție secundară dacă este prezentă o aldehydă acceptor adecvată în mediul de reacție. Prin intermediul acestei reacții secundare, carboligarea biocatalitică a benzaldehidei a permis sinteza cu succes a (*R*)-fenilacetilcarbinol ((*R*)-PAC) de puritate optică ridicată. Reacția a fost raportată pentru prima dată de Neuberger în urmă cu aproape un secol în urmă, prin utilizarea activității PDC native a celulelor întregi de *S. cerevisiae* și a glucozei ca sursă de piruvat, care a fost dezvoltată în continuare ca etapă cheie în sinteza efedrinei și pseudoefedrinei.²¹

Piruvat decarboxilazele sunt unele dintre cele mai studiate enzime pentru sinteza aciloinelor optic active și a (*R*)-PAC-ului. Cercetările efectuate în privința PDC-urilor și a sintezei mediate de PDC a aciloinelor în ultimele decenii au fost rezumate în multe recenzii și literatură conexasă.^{20,21,41,42,31,32,34,35,37-40} Deși s-au efectuat cercetări extinse asupra PDC-ului din *S. cerevisiae*, PDC-urile din *Candida utilis*, *Zymomonas mobilis* și *Acetobacter pasteurianus* au fost, de asemenea, recunoscute ca instrumente importante pentru sinteza aciloinelor.⁴¹ Din punct de vedere structural, forma activă a PDC-ului este o holoenzimă tetramerică formată din doi dimeri identici și necesită 2-4 molecule de TPP și ioni de magneziu care, pe lângă faptul că asigură activitatea catalitică a enzimei, joacă și un rol important în stabilizarea structurii cuaternare a tetramerului.⁴³ În ciuda faptului că PDC-urile se găsesc în multe specii diferite de organisme (procariote și eucariote), structurile cuaternare ale acestor enzime sunt relativ similare, indiferent de sursa enzimei.⁴⁴ Mecanismul enzimatic al PDC-urilor a fost studiat extensiv și descris în literatură.²⁹

Indiferent de originea enzimelor PDC, există două strategii majore utilizate în sinteza PAC-ului folosind PDC: celule întregi de microorganisme (libere sau immobilizate) sau enzime purificate (libere sau immobilizate). Dezavantajul major al sintezei cu celule întregi a PAC-ului pornind de la benzaldehidă este formarea de produși nedorți, datorată reacțiilor secundare.⁴⁵ **Schema 3.3** arată sinteza PAC-ului catalizată de PDC folosind celule întregi și posibii produși secundari.



Schema 3.3. Sinteza generală a PAC-ului catalizată de PDC din celule întregi și posibile reacții și produși secundari.

În ceea ce privește promiscuitatea și domeniul de substrat al acestor enzime, s-a demonstrat că PDC-ul poate cataliza decarboxilarea nu numai a piruvatului, ci și a altor 2-oxoacizi (până la 2-oxohexanoat), a hidroxi piruvatului și chiar a α -cetoacizilor *para*-substituiți. PDC-ul nativ din *S. cerevisiae* poate cataliza, de asemenea, formarea a diferiți analogi de PAC pornind de la aldehide aromatice substituie. S-a observat, de asemenea, că benzaldehidele *orto*-substituie sunt substraturi neadecvate pentru PDC, spre deosebire de analogii substituiți în pozițiile *meta* și *para*.⁴⁶ Stereoselectivitatea enzimelor PDC native reprezintă, de asemenea, un factor important pentru aplicarea lor sintetică la scară industrială. Studiile privind formarea legăturii C-C de către PDC și alte enzime TPP-dependente au arătat că acestea sunt în mare parte *R*-selective și (*R*)-enantiomerul este de regulă produsul majoritar al reacției biocatalitice.⁴¹

3.2. Obiectivele studiului

Scopul studiului descris în acest capitol al tezei a fost investigarea diferitelor tulpini noi de drojzii neconvenționale ca biocatalizatori sub formă de celule întregi, pentru sinteza enzimatică a (*R*)-fenilacetilcarbinolului și analogilor de (*R*)-PAC. Prin screening-ul mai multor tulpini nou izolate de microorganisme sub formă de celule liofilizate, patru tulpini au arătat o activitate ridicată în condensarea aciloinică a benzaldehidei cu piruvat de sodiu. În continuare, condițiile optime au fost determinate prin optimizarea factorială a unor parametri cheie, cum ar fi temperatura, pH-ul și raportul molar al co-substratului.

Pentru a explora în continuare potențialele sintetice ale tulpinilor de drojdie identificare, a fost efectuat screening-ul unui spectru larg de aldehide aromatice substituie și a fost stabilit un domeniu de substrat preliminar. De asemenea, a fost investigată posibilitatea de a imobiliza tulpinile de drojdie selectate prin imobilizare în matrice de sol-gel „templated” și de a le utiliza în reacții de condensare aciloinică, atât în reacții conduse discontinuu cat și în sisteme de flux continuu.

3.3. Rezultate și discuții

3.3.1. Tulpinile de drojdie investigate

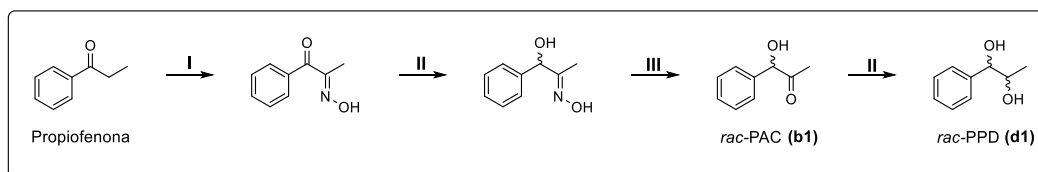
Tulpinile de drojdie investigate în studiul curent au fost primite ca celule întregi liofilizate de la compania Fermentia Microbiological Ltd (Budapesta, Ungaria) și au fost depozitate în colecția de tulpini a companiei Witaria Ltd (Budapesta, Ungaria). În ceea ce privește aplicațiile biocatalitice ale tulpinilor prezentate, aceste drojdii „neconvenționale” au fost puțin raportate în studiile anterioare și câteva exemple de aplicații sunt prezentate în **Tabelul 3.1**.

Tabel 3.1. Aplicații biocatalitice raportate anterior ale speciilor de drojdie investigate.

Nr. Crt.	Specia de drojdie	Codul de identificare	Aplicații biocatalitice
1	<i>Pichia carsonii</i>	WY-1	Bioreducerea cetonei pro-chirale ⁴⁷
2	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	WY-2	Bioreducerea cetonei pro-chirale ⁴⁷⁻⁴⁹
3	<i>Wickerhamomyces subpelliculosus</i>	WY-3 WY-13 WY-21	Bioreducerea cetonei pro-chirale ⁵⁰
4	<i>Candida norvegica</i>	WY-4	Bioreducerea cetonei pro-chirale ⁴⁷
5	<i>Cryptococcus curvatus</i>	WY-5	Reducerea stereoselectivă a analogilor de oxoester ai clofibratului ^{51,52}
6	<i>Debaryomyces hansenii</i>	WY-6	Bioreducerea cumarinei ⁵³ ; Oxidarea alcoolilor, zaharidelor, aminoacizilor și acizilor organici ⁵⁴ ; Sinteza de (R)-PAC prin reacții de condensare ⁴⁵
7	<i>Candida guilliermondii</i>	WY-7 WY-8	Esterificarea acidului oleic de către lipaze extracelulare ⁵⁵ ; Producerea acizilor α,ω -dicarboxilici cu catenă lungă ⁵⁶ ; Bioreducerea cetonei pro-chirale ⁴⁷ ; Hidroliza selectivă a nitrililor ⁵⁷ ; Monoreducerea 1-fenilpropan-1,2-dionei ⁵⁸ ; Reducerea D-xilozei la xilitol ⁵⁵
9	<i>Debaryomyces fabryi</i>	WY-11	Monoreducerea 1-fenilpropan-1,2-dionei ⁵⁸ ; Reducerea stereoselectivă a cetopantol lactonei ⁵⁹ ; Sinteza de (R)-PAC prin reacții de condensare ⁴⁵
10	<i>Candida parapsilosis</i>	WY-12	Prepararea (R)-1,3-butandiolului (BDO) prin oxido-reducere ^{47,60} ; Reducerea stereoselectivă a cetopantol lactonei ⁵⁹

3.3.2. Sinteza chimică a rac-fenilacetilcarbinol și a rac-1,2-fenilpropaniol

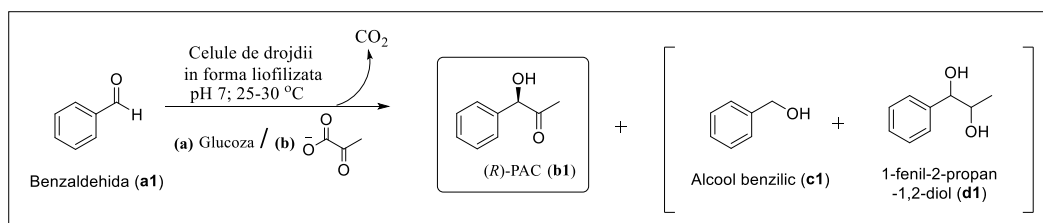
Pentru a stabili metodologia analitică necesară pentru monitorizarea activității PDC a tulpinilor investigate, a fost efectuată sinteza chimică a fenilacetilcarbinolului racemic (*rac*-PAC, **b1**) și 1-fenil-2-propan-1,2-diolului racemic (*rac*-PPD, **d1**) (**Schema 3.4**). Alcoolul benzilic (**c1**) este disponibil comercial și a fost utilizat așa cum a fost primit. Utilizând compușii de referință obținuți, s-a dezvoltat o metodă de cromatografie de gaze chirală pentru a determina conversia substratului, distribuția produsilor obținuți și excesul enantiomeric al PAC-ului rezultat.



Schema 3.4. Sinteza chimică a *rac*-PAC (**b1**) și a *rac*-PPD (**d1**): I. *n*-BuONO, CH₃OH, HCl, 0 °C; II. NaBH₄, CH₃OH, r.t.; III. CH₂O sol., HCl, reflux.

3.3.3. Studiul preliminar a activității piruvat decarboxilaze a tulpinilor de drojdie în sinteza de (*R*)-fenilacetilcarbinol

În scopul de a explora potențialul activității piruvat decarboxilazei native a acestor tulpini de drojdie, a fost efectuată o analiză preliminară la scară analitică folosind benzaldehida **a1** ca substrat model. În consecință, biotransformările cu celule întregi au fost realizate folosind celule liofilizate în condiții de reacție ambientală, utilizând glucoza sau piruvatul de sodiu cu rol de co-substrat (**Schema 3.5**). Concomitent, s-au efectuat și experimente de condensare aciloinică în absența co-substratului ca reacții de control. Activitatea biocatalitică a fost evaluată în fiecare caz folosind trei parametri: conversia totală a substratului (C), conversia substratului în produsul de carboligare PAC **b1** (C_{PAC}) și excesul enantiomeric al PAC-ului obținut (*ee*). Reacțiile au fost monitorizate prin TLC, iar conversia substratului și excesul enantiomeric a aciloinei obținute au fost determinate prin cromatografie de gaze utilizând o coloana chirală.



Schema 3.5. Screening-ul activității PDC a tulpinilor de drojdie selectate în sinteza de PAC și produșii secundari obținuți.

După cum este prezentat în **Tabelul 3.2**, efectuarea reacțiilor în absența co-substratului a rezultat în obținerea unor cantități ne semnificative de PAC chiar și după 24 de ore de reacție. Cu toate acestea, s-a observat o conversie rapidă și ridicată (76,9-99,8%) a substratului în alcool benzilic **c1** pentru drojdiile *Pichia carsonii*, *Lodderomyces elongisporus*, *Debaryomyces fabryi*, *Candida parapsilosis* și *Wickerhamomyces subpelliculosus* ssp3 după numai 4 ore de reacție. O conversie moderată a substratului (~56%) a fost observată pentru cele două specii de *Candida guilliermondii* și o conversie scăzută în PAC de ~7,5% cu stereoselectivitate moderată (*ee* de 81,8% și 79,6%). Extinderea timpului de reacție la 24 de ore nu a îmbunătățit semnificativ

conversia substratului pentru nici una dintre tulpinile testate. Adăugarea de glucoză (sursa de piruvat generată *in situ*) ca co-substrat nu a dus la obținerea unei conversii îmbunătățite a substratului în aciloină, dar s-a observat o ușoară scădere a conversiei substratului în alcool benzilic pentru majoritatea tulpinilor după 4 ore de timp de reacție (**Tabelul 3.2**).

Tabel 3.2. Screening-ul activității PDC a tulpinilor de drojdie investigate.

Nr. Crt.	Tulpina	În absența co-substratului ^a			Glucoza drept co-substrat ^b			Piruvat de sodiu drept co-substrat ^{a,c}		
		C (%)	C _{PAC} (%)	ee (%)	C (%)	C _{PAC} (%)	ee (%)	C (%)	C _{PAC} (%)	ee (%)
1	<i>Pichia carsonii</i>	89.9	0.9	n.d.	>99	0.9	n.d.	97.7	52.6	95.9
2	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	>99	1.0	n.d.	96.2	1.9	n.d.	>99	58.9	96.1
3	<i>Wickerhamomyces subpelliculosus</i> ssp1	2.2	1.3	n.d.	6.6	0.9	n.d.	10.8	4.8	59.4
4	<i>Candida norvegica</i>	14.0	1.0	n.d.	9.5	0.7	n.d.	17.5	16.7	89.2
5	<i>Cryptococcus curvatus</i>	15.5	1.3	n.d.	5.2	0.5	n.d.	14.6	10.6	78.2
6	<i>Debaryomyces hanseii</i>	1.6	1.1	n.d.	0.6	0.5	n.d.	25.1	24.5	87.8
7	<i>Candida guilliermondii</i>	56.7	7.5	81.8	42.8	4.5	88	>99	83.3	98.0
8	<i>Candida guilliermondii</i> var	55.3	7.6	79.6	57.7	4.8	90	>99	83.2	97.2
9	<i>Debaryomyces fabryi</i>	>99	0.8	n.d.	11.5	2.7	74	>99	30.8	94.9
10	<i>Candida parapsilosis</i>	>99	0.7	n.d.	>99	0.8	n.d.	>99	33.4	95.5
11	<i>Wickerhamomyces subpelliculosus</i> ssp2	9.2	1.5	n.d.	4.5	0.8	n.d.	28.7	23.6	92.6
12	<i>Wickerhamomyces subpelliculosus</i> ssp3	76.9	2.0	n.d.	47.4	0.6	n.d.	20.8	18.3	90.6

^aCondiții de reacție: 20 mg aldehydă **a1** (în 100 μ l izopropanol), 150 mg drojdie liofilizată, tampon fosfat pH 7 (5 mL) cu un conținut de 1 mM MgCl₂, 25°C-30°C, 4 h, 1000 rpm. ^bReacțiile au fost efectuate cu adaos de 68 mg de glucoză (2 echiv.). ^cReacțiile au fost efectuate cu adaos de 41,4 mg de piruvat de sodiu (2 echiv.)

Pentru reacțiile efectuate în prezența a 2 echivalenți de piruvat de sodiu drept co-substrat, s-a observat că adăugarea de piruvat a favorizat activitatea carboligazică a tuturor tulpinilor testate și a arătat o conversie crescută în PAC, în timp ce o conversie cantitativă a substratului s-a realizat după 4 ore de de reacție pentru șase dintre tulpinile testate. De asemenea, s-au obținut conversii globale cantitative (>97%) pentru tulpinile *Pichia carsonii*, *Lodderomyces elongisporus*, *Candida guilliermondii* și *Candida guilliermondii* var cu o selectivitate bună spre excelentă față de produsul de carboligare (C_{PAC} = 52,6-83,3%) și o stereoselectivitate excelentă ee > 95%. În cazul celorlalte șase tulpini testate, conversia globală a substratului nu a atins o valoare satisfăcătoare (C < 30%), chiar și după extinderea timpului de reacție la 24 de ore. De asemenea, analiza distribuției produșilor de reacție a arătat că singurul produs secundar major al

întregului proces mediat celular a fost alcoolul benzilic și doar cantități mici de 1,2-fenilpropaniol (< 1-2%) ca produs secundar minor, iar produșii de oxidare secundari (acid benzoic și 1,2-fenilpropan dicetonă) nu au fost detectați în amestecul de reacție. Pe lângă rezultatele prezentate, activitatea PDC a unora dintre tulpinile testate (*Candida norvegica*, *Debaryomyces fabryi*, *Lodderomyces elongisporus* și *Pichia carsonii*) a fost investigată și cu celule proaspăt recoltate în aceleași condiții ca în forma liofilizată.⁶¹ S-a constatat că, chiar dacă piruvatul de sodiu a fost utilizat drept co-substrat, nu s-a detectat în amestecul de reacție produsul de carboligare PAC, și substratul a fost transformat de reductazele prezente în celule doar în alcoolul **b1** corespunzător.

În continuare, s-a investigat și stereoselectivitatea piruvat decarboxilazelor native a acestor tulpini. Stereoselectivitatea reacțiilor biocatalitice și configurația absolută a produsului s-au putut stabili cu ușurința, prin măsurarea rotației optice a PAC-ului izolat și purificat din amestecurile de reacție. Ca rezultat final, toate tulpinile testate au produs (*R*)-PAC ca enantiomer majoritar. Aceste rezultate sunt, de asemenea, în conformitate cu literatura raportată care descrie majoritatea PDC-urilor provenite din drojdii ca fiind (*R*)-selective.^{41,46}

3.3.4. Optimizarea condițiilor de reacție prin metoda experimentului factorial

După verificarea cu succes a activității PDC a tulpinilor de drojdie, cele patru tulpini selectate (*Pichia carsonii*, *Lodderomyces elongisporus*, *Candida guilliermondii* și *Candida guilliermondii* var) au fost utilizate în experimentele următoare. Pe baza rezultatelor obținute, condițiile de reacție pentru acești biocatalizatori au fost investigate suplimentar pentru a îmbunătăți selectivitatea acestor drojdii și a crește conversia substratului în (*R*)-PAC. În cazul studiului prezent, condițiile de reacție luate în considerare pentru optimizare sunt pH-ul tamponului utilizat ca mediu de reacție, temperatura la care se efectuează reacțiile biocatalitice și raportul molar dintre substrat (benzaldehydă) și co-substratul utilizat în reacția de carboligare (echivalenți de piruvat). Ca metodă de optimizare s-a optat pentru experimentul factorial cu trei factori. Acest tip de experiment permite evaluarea influenței fiecărui factor, precum și posibilele interacțiuni dintre aceștia. Pentru efectuarea optimizării prin metoda proiectării experimentelor (Design of Experiments, DOE), a fost utilizat software-ul Minitab pentru a proiecta experimentul factorial utilizat și pentru analiza rezultatelor obținute. În acest scop, s-a ales utilizarea unui experiment factorial complet, cu măsurători în triplicat în punctele centrale (*Ct Pt*).⁶² Rezultatele

au fost analizate folosind software-ul Minitab⁶³, iar rezultatele obținute sunt reprezentate de ecuațiile model pentru răspunsul sistemului la variația factorilor aleși (cu termeni de interacțiune până la ordinul trei) și diagrame Pareto ale efectelor standardizate pentru fiecare experiment factorial.

Pornind de la condițiile inițiale utilizate la screening-ul preliminar ca punct central (pH = 7, T = 30 °C și 2 echiv. piruvat), a fost propus un experiment factorial complet cu 2³ experiențe, folosind 2 niveluri și 3 factori. Nivelurile superioare și inferioare au fost definite prin alegerea gradului de variație față de nivelul de bază: ΔpH=2; ΔT=10 °C și ΔEquiv.Pyr. = 1 echivalent molar. Unitățile codificate pentru factori sunt x₁ (pH), x₂ (T), x₃ (Pyr. Equiv.), iar valorile de răspuns sunt Y₁ (C) și Y₂ (C_{PAC}). Termenii de interacțiune au fost definiți ca x₁x₂(pH*T), x₁x₃ (pH*Pyr.Equiv.), x₂x₃ (T*Equiv.Pyr.) și x₁x₂x₃ (pH*T*Equiv.Pyr.). Excesul enantiomeric al (R)-PAC-ului obținut este de asemenea raportat, dar nu a fost utilizat ca răspuns al experimentului factorial. Un exemplu reprezentativ de matrice experimentală, precum și răspunsurile măsurate pentru fiecare experiment, este prezentat în **Tabelul 3.3** pentru optimizarea factorială a reacției de condensare aciloinică utilizând tulpina *Candida guilliermondii*. Ecuațiile model reprezentative pentru răspunsul procesului (Ecuațiile 1 și 2) la variația factorilor (cu termeni de interacțiune de până la al treilea ordin) și diagrama Pareto a efectelor standardizate (**Figura 3.1**) sunt prezentate în continuare.

Tabel 3.3. Matrice reprezentativă pentru prima optimizarea factorială a reacției de condensare aciloinică utilizând tulpina *Candida guilliermondii*.

Nr. Crt.	Valori necodificate						Valori codificate				
	T (°C)	pH	Pyr. Equiv.	C (%)	C _{PAC} (%)	ee _{PAC} (%)	x ₁	x ₂	x ₃	Y ₁	Y ₂
1	5	20	1	80.8	70.7	98.2	-1	-1	-1	80.8	70.7
2	9	20	1	97.9	0.4	n.d.	+1	-1	-1	97.9	0.4
3	5	40	1	59.2	58.1	92.2	-1	+1	-1	59.2	58.1
4	9	40	1	74.9	0.0	n.d.	+1	+1	-1	74.9	0.0
5	5	20	3	99.6	93.9	94.4	-1	-1	+1	99.6	93.9
6	9	20	3	97.1	0.0	n.d.	+1	-1	+1	97.1	0.0
7	5	40	3	83.0	82.5	91.6	-1	+1	+1	83.0	82.5
8	9	40	3	80.0	0.1	n.d.	+1	+1	+1	80.0	0.1
9	30	7	2	99.9	87.2	96.7	0	0	0	99.9	87.2
10	30	7	2	98.9	82.3	96.3	0	0	0	98.9	82.3
11	30	7	2	99.4	85.1	96.2	0	0	0	99.4	85.1

$$C = 84.060 + 3.413 \text{ pH} - 9.766 T + 5.867 \text{ Pyr. Equiv.} - 0.253 \text{ pH} * T - 4.781 \text{ pH} * \text{Pyr. Equiv.} + 1.359 T * \text{Pyr. Equiv.} + 0.105 \text{ pH} * T * \text{Pyr. Equiv.} + 15.324 \text{ Ct Pt} \quad (1)$$

$$C_{PAC} = 38.212 - 38.080 \text{ pH} - 3.039 T + 5.925 \text{ Pyr. Equiv.} + 2.976 \text{ pH} * T - 5.993 \text{ pH} * \text{Pyr. Equiv.} + 0.200 T * \text{Pyr. Equiv.} - 0.109 \text{ pH} * T * \text{Pyr. Equiv.} + 46.64 \text{ Ct Pt} \quad (2)$$

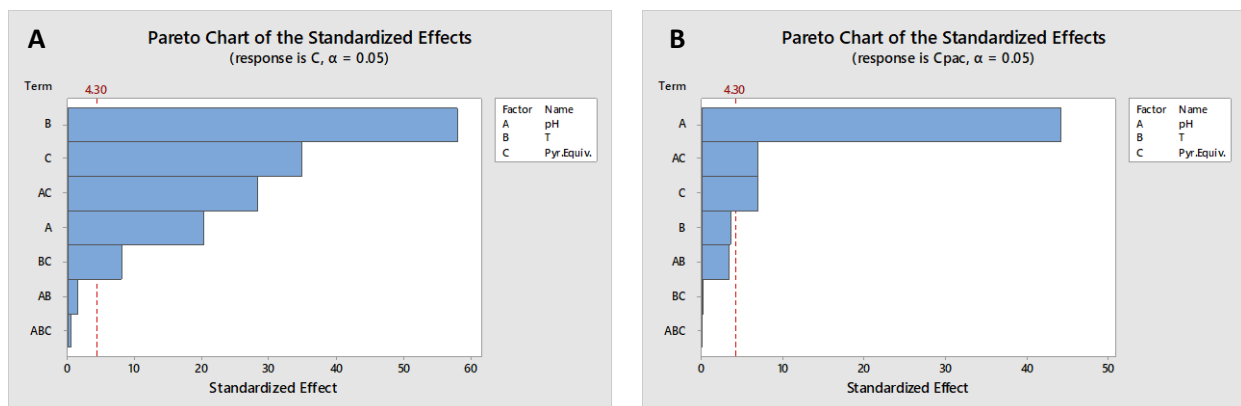


Figura 3.1. Diagrame Pareto reprezentative ale efectelor standardizate pentru activitatea PDC a tulpinii de *Candida guilliermondii* atunci când răspunsul este C (A) și C_{PAC} (B). Linia de referință (linia roșie) este trasată la un nivel de semnificație de 0,05 pentru a indica efectele semnificative.

În urma analizei datelor obținute, s-a observat că influența factorilor investigați prezintă o similitudine ridicată între tulpini, înregistrându-se doar variații reduse. De asemenea, prin interpretarea rezultatelor obținute se poate releva o imagine de ansamblu în ceea ce privește influența factorilor investigați. S-a demonstrat că toți cei trei factori au o influență semnificativă asupra activității biocatalitice a celulelor investigate, cat și asupra activității enzimice specifice a enzimei PDC. O temperatură mai mare (40 °C) și un pH alcalin (9) au rezultat într-un impact negativ asupra activității PDC a celulelor testate, conducând la conversii în PAC a substratului mai mici de 1%. Cu toate acestea, în condițiile menționate s-au observat conversii aproape cantitative în alcool benzilic, ceea ce arată că activitatea biocatalitică a reductazelor prezente în celule rămâne în mare parte neafectată. Aceste rezultate sunt, de asemenea, în acord cu datele raportate anterior privind stabilitatea și activitatea enzimelor PDC, care demonstrează disocierea completă a structurii tetramerului enzimei PDC în condiții alcaline și scăderea stabilității la temperaturi ridicate.⁴⁴ După cum era de așteptat, creșterea cantității de piruvat disponibil în mediul de reacție a arătat o creștere semnificativa a cantității de (R)-PAC formată în timpul procesului biocatalitic. Luând în considerare conversia globală a substratului, cantitatea de PAC obținuta și *ee*-ul înregistrat, cele mai bune rezultate au fost obținute la un pH = 5, T = 20 °C și 3 echivalenți de piruvat, și sunt prezentate în **Tabelul 3.4**.

Tabel 3.4. Rezultatele obținute pentru activitatea PDC a tulpinilor de drojdie studiate după primul experiment de optimizare factorială.

Nr. Crt.	Tulpina de drojdie	Piruvat de sodiu ^a		
		C %	C _{PAC} %	ee _{PAC} %
1	<i>Pichia carsonii</i>	>99	79.5	95.3
2	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	>99	77.3	95.5
3	<i>Candida guilliermondii</i>	>99	93.9	94.4
4	<i>Candida guilliermondii var</i>	97.2	94.7	95.9

^a Condiții de reacție: 20 mg benzaldehidă a1 (în 100 μ l izopropanol), 150 mg drojdie liofilizată, tampon fosfat cu un conținut de 64 mg piruvat de sodiu (3 echiv.) și 1 mM MgCl₂, pH 5 (5 mL), 20 °C, 4 ore, 1000 rpm.

În urma datelor obținute după primul experiment de optimizare factorial, a fost efectuată o a doua optimizare utilizând un experiment factorial complet cu 2² experiențe și cu un grad mai scăzut de libertate. În acest caz, s-au utilizat 2 factori și 2 niveluri pentru a evalua în continuare efectele pH-ului și a echivalenților de piruvat asupra sintezei de PAC. Temperatura a fost menținută constantă la T = 20 °C, deoarece un nivel mai scăzut de temperatură nu a putut fi investigat din cauza limitărilor tehnice și, în același timp, pentru a nu reduce foarte mult viteza reacției enzimatică de condensare aciloinică. Nivelurile de bază (punctul central) pentru cei doi factori au fost pH = 5 și 3 echiv. de piruvat. Nivelurile superioare și inferioare au fost definite prin alegerea gradului de variație față de nivelul de bază stabilit în experimentul de optimizare anterior: Δ pH = 1 și Δ Equiv.Pyr. = 1 echiv. Unitățile codificate pentru factori sunt x₁ (pH), x₂ (Pyr. Equiv.), iar valorile de răspuns sunt Y₁ (C) și Y₂ (C_{PAC}). Termenul de interacțiune a fost definit ca x₁x₂ (pH*Pyr.Equiv). Un exemplu reprezentativ de matrice experimentală, precum și răspunsurile măsurate pentru fiecare experiment, este prezentat în **Tabelul 3.5** pentru a doua optimizare factorială a reacției de condensare aciloinică utilizând tulpina *Candida guilliermondii*. Ecuțiile model reprezentative pentru răspunsul procesului (Ecuțiile 3 și 4) la variația factorilor (cu termeni de interacțiune de până la al doilea ordin) și diagrama Pareto a efectelor standardizate (**Figura 3.2**) sunt prezentate în continuare.

Tabel 3.5. Matrice reprezentativă pentru a două optimizarea factorială a reacției de condensare aciloinică utilizând tulpina *Candida guilliermondii*.

Nr. Crt.	Valori necodificate						Valori codificate			
	T (°C)	pH	Pyr. Equiv.	C (%)	C _{PAC} (%)	ee _{PAC} (%)	x ₁	x ₂	Y ₁	Y ₂
1	20	4	2	5.8	5.7	98.2	-1	-1	5.8	5.7
2		6	2	98.2	95.5	98.2	+1	-1	98.2	95.5
3		4	4	3.8	3.8	97.8	-1	+1	3.8	3.8
4		6	4	99.4	97.5	96.3	+1	+1	99.4	97.5
5		5	3	97.2	96.3	94.4	0	0	97.2	96.3
6		5	3	95.8	94.4	94.8	0	0	95.8	94.4
7		5	3	96.1	94.6	94.7	0	0	96.1	94.6

$$C = 51.804 + 46.967 \text{ pH} - 0.202 \text{ Pyr. Equiv.} + 0.801 \text{ pH} * \text{Pyr. Equiv.} + 44.558 \text{ Ct Pt} \quad (3)$$

$$C_{PAC} = 50.620 + 45.868 \text{ pH} + 0.022 \text{ Pyr. Equiv.} + 1.015 \text{ pH} * \text{Pyr. Equiv.} + 44.481 \text{ Ct Pt} \quad (4)$$

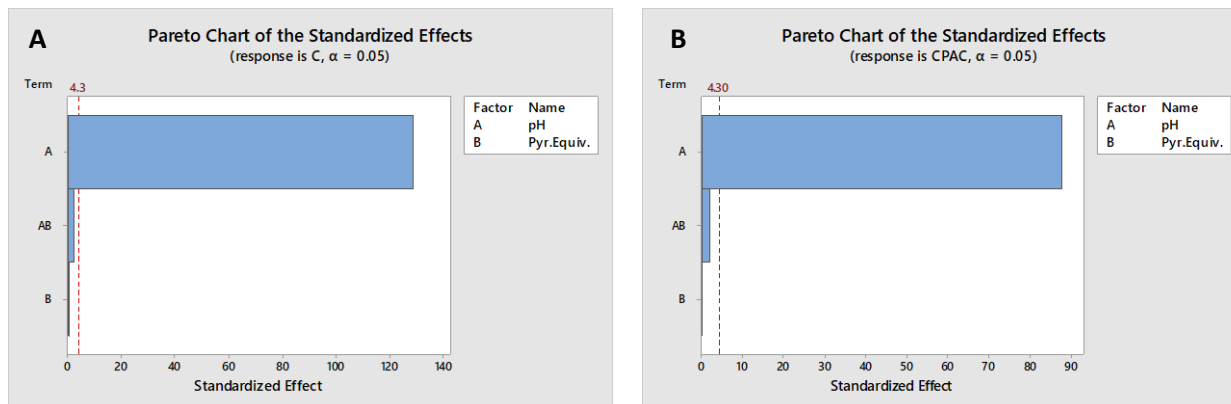


Figura 3.2. Diagrame Pareto reprezentative ale efectelor standardizate pentru activitatea PDC a tulpinii de *Candida guilliermondii* atunci când răspunsul este C (A) și C_{PAC} (B). Linia de referință (linia roșie) este trasată la un nivel de semnificație de 0,05 pentru a indica efectele semnificative.

Pe baza analizei răspunsurilor C și C_{PAC}, procesul biocatalitic a arătat un model similar pentru toate cele patru tulpini de drojdie studiate. pH-ul mediului de reacție a fost singurul factor semnificativ și are un efect pozitiv. În general, creșterea pH-ului (pH = 6) a dus la o conversie ușor (~1-3%) mai mare a benzaldehidei în PAC, în timp ce scăderea pH-ului sub punctul central (pH = 4) a dus la conversii globale foarte scăzute și conversie în produsul aciloină. Creșterea raportului molar dintre benzaldehidă și piruvat nu a dus la o îmbunătățire semnificativă pentru a justifica adăugarea de piruvat suplimentar la reacție. În cele din urmă, s-a observat, de asemenea, că ee-ul produsului (R)-PAC a fost ușor mai mare la un pH de 6 și când s-au adăugat doar 2 echivalenți de piruvat de sodiu drept co-substrat. Condițiile optime finale (Tabelul 3.6) au fost selectate pe baza rezultatelor experimentale obținute în urma celui de-al doilea set de

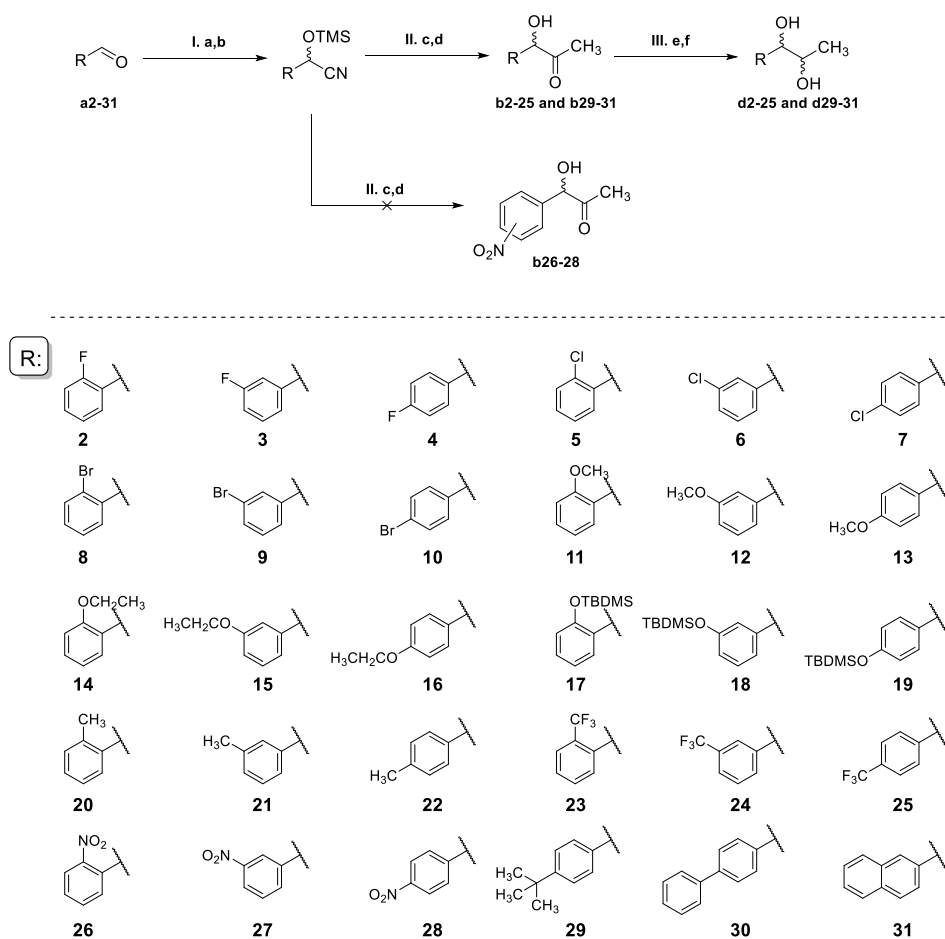
experimente, ținând cont de faptul că au fost observate doar diferențe minore pentru conversia globală a benzaldehidei și conversia în produsul de condensare C_{PAC} .

Tabel 3.6. Rezultatele obținute pentru activitatea PDC a tulpinilor de drojdie studiate după al doilea experiment de optimizare factorială (condiții optime).

Nr. Crt.	Tulpina de drojdie	Piruvat de sodiu ^a		
		C %	C_{PAC} %	ee_{PAC} %
1	<i>Pichia carsonii</i>	>99	79.7	97.6
2	<i>Lodderomyces elongisporus</i>	>99	79.5	98.1
3	<i>Candida guilliermondii</i>	98.2	95.5	98.2
4	<i>Candida guilliermondii</i> var	98.1	93.5	98.3

^a Condiții de reacție: 20 mg aldehydă **a1** (în 100 μ l izopropanol), 150 mg drojdie liofilizată, tampon fosfat cu un conținut de 42 mg piruvat de sodiu (2 echiv.) și 1 mM $MgCl_2$, pH 6 (5 mL), 20°C, 4 ore, 1000 rpm.

3.3.5. Sinteza chimică a aciloinelor racemice *rac*-b2-31 și a 1,2-diolilor corespunzători *rac*-d2-31

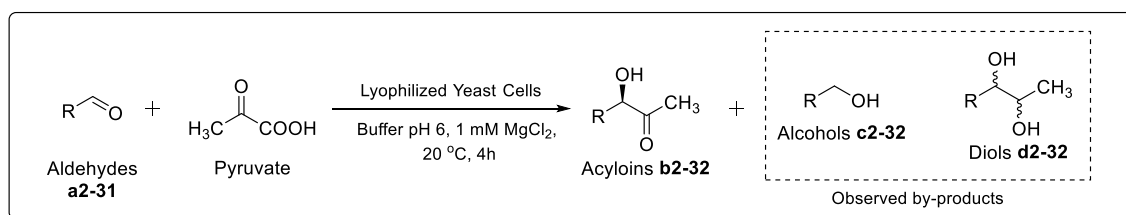


Schema 3.6. Sinteza chimică a aciloinelor *rac*-b2–31 și a 1,2-diolilor *rac*-d2-31. Condițiile de reacție: I. a) $TMSCN$, $LiCl/THF$, 25 °C, b) *n*-Hexan/1M Na_2CO_3 sol.; II. c) $MeMgI/Et_2O$, 25 °C, d) 5% HCl sol./ 0 °C; III. e) $NaBH_4$, metanol/0 °C; f) $NaCl$ sol. sat.

Pentru a investiga în continuare domeniul de substrat al PDC-urilor prezente în tulpinile de drojdie studiate, au fost propuse ca substrat mai multe benzaldehide *orto*-, *meta*- și *para*-substituite **a2-29**, precum și bifenil (**a30**) și naftil (**a31**) aldehide. În consecință, a fost efectuată sinteza chimică a aciloinelor racemice și a 1,2-diolilor corespunzători, iar metoda de sinteză este prezentată în **Schema 3.6**. Pentru aldehidele substituie cu grupări nitro **a26-28**, metoda de sinteză propusă nu a putut fi aplicabilă din cauza efectelor electronice ale grupării nitro și, prin urmare, aciloinelne racemice **b26-28** și 1,2-dioli **d26-28** nu au putut fi obținute. Pentru aceste substraturi s-au utilizat date spectrale ¹H-RMN raportate anterior în literatură, pentru a evalua conversiile în cazul reacțiilor biocatalitice. Aciloinelne racemice și 1,2-dioli obținute au fost utilizați în continuare pentru a stabili metode HPLC de separare chirală cu scopul determinării excesul enantiomeric al aciloinelne obținute, precum și o metodă bazată pe măsurători ¹H-RMN pentru monitorizarea conversiilor obținute în urma reacțiilor biocatalitice.

3.3.6. Evaluarea domeniului substrat al tulpinilor de drojdie investigate

Pe baza datelor obținute din studiul activității PDC a celor patru tulpini de drojdie liofilizate, domeniul de aplicare al substratului acestor enzime a fost investigat în continuare prin testarea activității lor biocatalitice utilizând ca substrat benzaldehide *orto*-, *meta*- și *para*-substituite **a2-29**, precum și bifenil-4-carboxaldehida **a30** respectiv 2-naftaldehida **a31** ca substraturi voluminoase. Reacțiile au fost efectuate la scară analitică în condițiile optime stabilite anterior pentru reacțiile de condensare aciloinică a benzaldehidei **a1** (**Schema 3.7**). Reacțiile au fost oprite prin centrifugarea biomasei și prelucrate prin extracție în solvent organic, urmata de analiza prin ¹H-RMN și HPLC. După cum s-a menționat anterior, rezultatul reacțiilor biocatalitice a fost monitorizat printr-o metodă ¹H-RMN așa cum este descrisă în literatura recentă^{45,64} și excesul enantiomeric al aciloinelne obținute a fost determinat pe baza analizelor HPLC.



Schema 3.7. Investigarea domeniului de substrat al PDC-urilor din celulele de drojdie liofilizate, în condiții optime. Condiții de reacție: 75 mg celule liofilizate, 0,1 mmoli aldehydă **a2-32** în 50 μL izopropanol, 0,2 mmoli piruvat de sodiu (2 echiv.), 50 mM tampon fosfat, 20 °C, 4 h, 1000 rpm.

Aldehidele testate au fost selectate pentru a avea atât substituenți electronodonori (substraturile **a11-16** și **a20-22**) ca și substituenți electronoatragatori (**a2-10** și **a23-38**), precum și unele substraturi voluminoase impiedimentate steric (**a17-19** și **a29-31**). Rezultatele obținute sunt prezentate în **Figurile 3.3-3.5**, iar pentru comparație, datele sunt prezentate simultan pentru toate cele 4 tulpini investigate pe fiecare substrat testat.

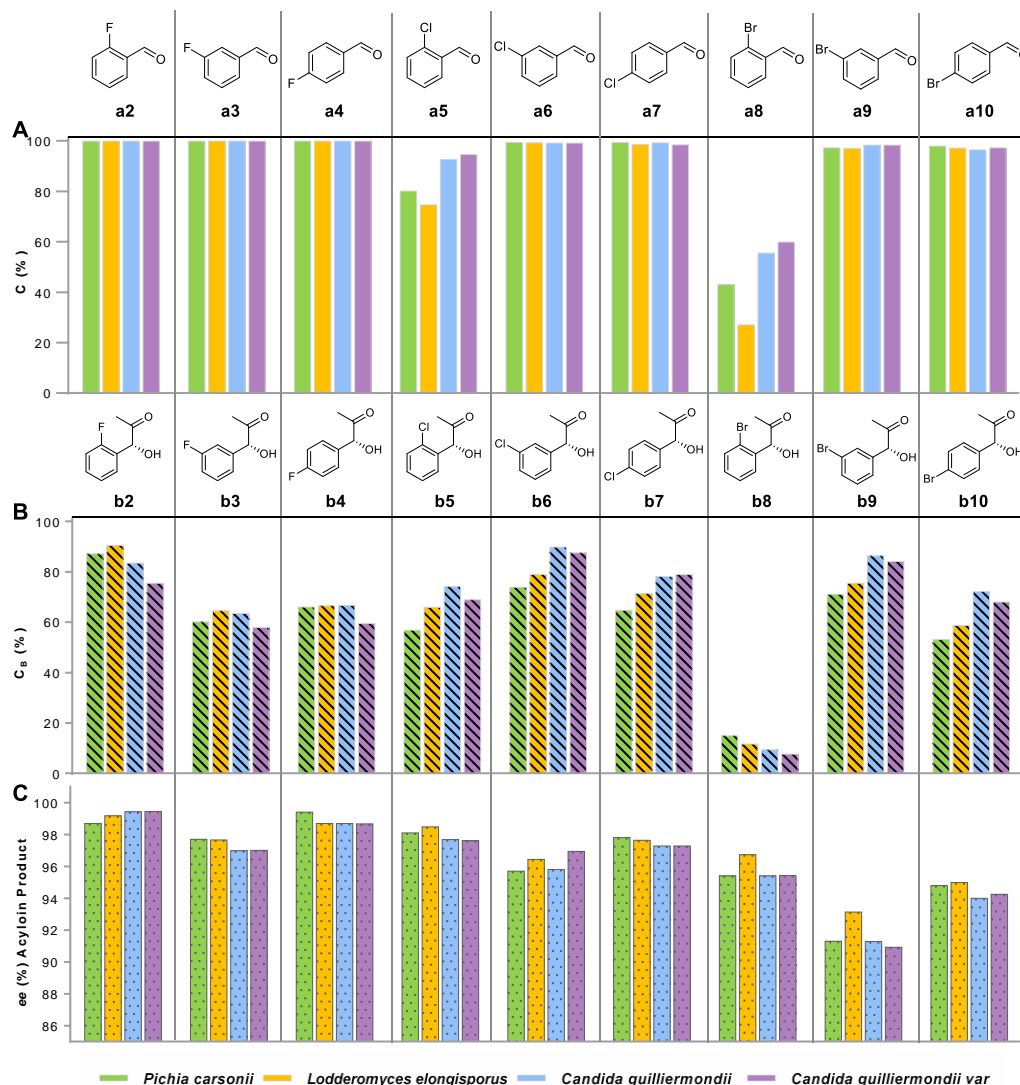


Figura 3.3. Rezultatele obținute pentru tulpinile de drojdie de *P. carsonii*, *L. elongisporus*, *C. guilliermondii* și *C. guilliermondii* var în reacțiile de condensarea aciloinică a aldehydelor substituite **a2-10** în condiții optime: **A)** Conversia totală a substratului C (%); **B)** Conversia în aciloină C_B (%); **C)** Excesul enantiomeric a aciloinei obținute ee (%).

După cum este prezentat în **Figura 3.3 A**, toate cele patru tulpini de drojdie au arătat rezultate similare pe substraturile substituite cu atomi de halogen **a2-10**. S-au observat conversii globale excelente de 96-99,9% pentru toate substraturile halogenate, similar cu cele obținute

pentru benzaldehida nesubstituita, cu excepția celor substituie cu *o*-Cl (**a5**, C = 74-94%) și *o*-Br (**a6**, C = 26-60%). Activitatea PDC a arătat în general o scădere semnificativă în comparație cu rezultatele obținute pentru benzaldehidă (C > 99). După cum se poate observa în **Figura 3.3 B**, s-au observat conversii bune spre excelente în produșii aciloinei (C_B = 53-91 %) pentru substraturile substituie cu halogen, cu excepția benzaldehidei *o*-Br (C_B = 7-15 %). Puritatea optică a aciloinei obținute (**Figura 3.3 C**) a fost de asemenea bună spre excelentă (*ee* = 90-99,5%), în raport cu valorile excesului enantiomeric obținute pentru benzaldehidă cu cele patru tulpini.

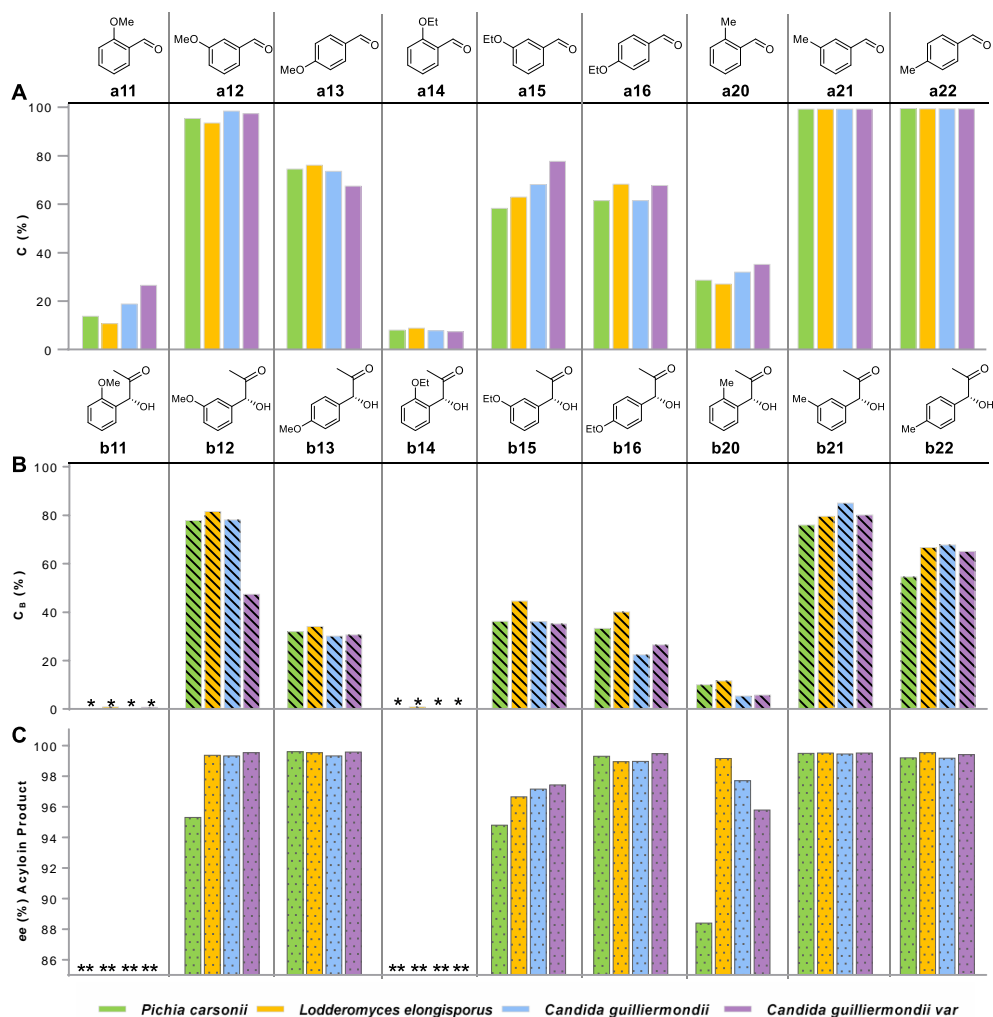


Figura 3.4. Rezultatele obținute pentru tulpinile de drojdie de *P. carsonii*, *L. elongisporus*, *C. guilliermondii* și *C. guilliermondii var* în reacțiile de condensarea aciloinică a aldehydelor substituie **a11-16** și **a20-21** în condiții optime: **A**) Conversia totală a substratului C (%); **B**) Conversie în aciloină C_B (%); **C**) Excesul enantiomeric a aciloinei obținute *ee* (%). * Nu s-a detectat produs aciloinic (sau <1%). ** Nedeterminat.

Pentru benzaldehidele substituie cu grupări alcoxi și metil, tulpinile testate au furnizat cantități bune până la moderate de aciloine pentru substraturile substituie în pozițiile *meta* și

para ($C_B = 26-85\%$), conform datelor prezentate în **Figura 3.4**. Benzaldehidele substituie cu grupări *o*-metoxi (**a11**) și *o*-etoxi (**a14**) au fost transformate cu o conversie globală scăzută în alcoolii benzilici corespunzători, nedetectându-se produși de condensare aciloinică. Purițiile optice ale produșilor de condensare au fost în general mai mari decât cele obținute pentru substraturile substituie cu grupării halogen, după cum se poate observa în **Figura 3.4 C**.

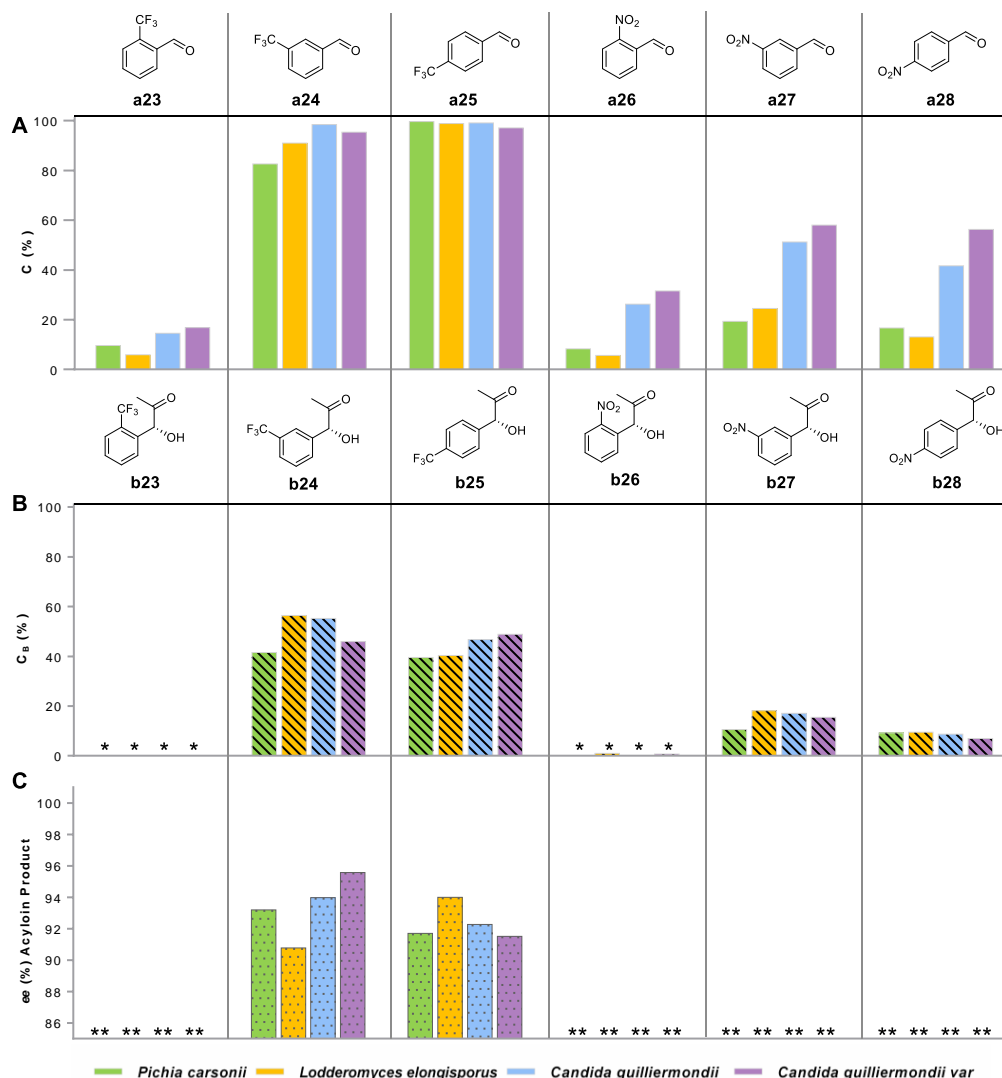


Figura 3.5. Rezultate obținute pentru tulpinile de drojdie de *P. carsonii*, *L. elongisporus*, *C. guilliermondii* și *C. guilliermondii* var în reacțiile de condensarea aciloinică a aldehydelor substituie **a23-28** în condiții optime: **A**) Conversia totală a substratului C (%); **B**) Conversie în aciloină C_B (%); **C**) Excesul enantiomeric a aciloiniei obținute *ee* (%). *Nu s-a detectat produs aciloinic (sau <1%). ** Nedeterminat.

În continuare, benzaldehidele substituie cu grupării nitro și trifluormetil au fost, de asemenea, testate ca substraturi. Similar cu celelalte substraturi *orto*-substituie testate, benzaldehidele substituie în poziția *orto* cu grupării CF_3 (**a23**) și NO_2 (**a26**) au fost transformate

cu conversii globale scăzute (**Figura 3.5 A**), iar produșii de condensare nu au putut fi detectați în amestecul de reacție. Conversii globale excelente ($C > 80\%$) au fost obținute pentru substraturile substituie cu *m*-CF₃ (**a24**) și *p*-CF₃ (**a25**) (conversii între 39-57% și purități optice peste 90%). Pentru substraturile *m*-NO₂ (**a27**) și *p*-NO₂ (**a28**), conversia totală a aldehidelor a fost mai mică decât pentru cele substituie cu gruparea trifluorometil ($C = 13-58\%$), iar conversia în aciloinele corespunzătoare nu a depășit un procent de 20%, conform datelor prezentate în **Figura 3.5 B**. Puritatea optică pentru aciloinele nitro-substituie nu a putut fi determinată.

În cele din urmă, substraturi voluminoase, cum ar fi *tert*-butildimetilsililhidroxi benzaldehyde protejate (**a17-a19**), *p*-*tert*-butil benzaldehyda (**a29**), precum și bifenil (**a30**) și naftil (**a31**) aldehyde au fost testate ca substraturi folosind cele patru tulpini de drojdie. După cum era de așteptat, substraturile cu grupări hidroxi protejate au fost substraturi neadecvate pentru reacțiile de condensare catalizate de PDC și nici măcar alcoolii corespunzători nu s-au format în urma procesului biocatalitic. Benzaldehyda **a29** substituie cu o grupare *p-tert*-butil a prezentat conversii moderate cu toate tulpinile testate ($C = 48-63\%$) și o conversie scăzută în produsul aciloinic ($C_B = 5-8\%$, $ee = 94-99,5\%$). Bifenil-4-carboxaldehyda **a30** și 2-naftaldehyda **a31** au furnizat conversii globale și mai mici ($C = 9-22\%$) decât substratul **a29**, cu conversii mici în produșii de condensare ($C_B < 10\%$ și $ee = 94-99\%$).

Analizând datele obținute după testarea celor patru tulpini de drojdie pe un spectru divers de substrat, pot fi elaborate câteva discuții cu privire la un scop preliminar al substratului PDC prezent în aceste celule. Au fost observate variații scăzute între tulpini în ceea ce privește cantitatea de aciloină produsă și excesul enantiomer, cu excepția unor cazuri localizate pentru anumite substraturi. Toate tulpinile testate au arătat o activitate și selectivitate excelentă pentru substraturile substituie cu atomi de halogen **a2-a10**, cu conversii bune spre excelente în aciloinele corespunzătoare, cu excepția *o*-Br-benzaldehydei **a8**. În comparație, derivații *o*-alcoxi nu au fost transformați de celulele de drojdie în aciloinele corespunzătoare și doar alcoolii corespunzători au fost observați ca produși de reacție, exceptând cazul *o*-metil benzaldehydei. Benzaldehydele *para*- și *meta*-substituie cu grupări alcoxi și metil, au fost transformate cu conversii moderate spre excelente, în funcție de poziția și tipul substituentului. Rezultate similare au fost observate și pentru benzaldehydele substituie cu grupări trifluorometil (**a23-a25**) și nitro (**a26-29**), unde doar alcoolii corespunzători au fost detectați în cantități mici pentru derivații substituie în poziția *orto*, în timp ce substraturile substituie în *meta* și *para* au fost acceptate ca

substraturi de către PDC-ul prezent în celule , detectându-se cantități mici până la moderate de aciloină în amestecul de reacție. În final, substraturile voluminoase nu au fost acceptate ca substraturi de către decarbozilazele prezente în celule. Hidroxialdehidele protejate cu TBDMS nu au fost transformate deloc de celule, observându-se doar o cantitate mică de alcool și aciloină pentru substratul *para*-substituit **a19**. Deși s-au obținut rezultate mai bune pentru celelalte substraturi impeditate steric, conversia în produșii de condensare aciloinică a fost nesatisfăcătoare.

Ca observație generală privind influența poziției substituentului pe inelul aromatic, benzaldehydele *orto*-substituie s-au dovedit a fi substraturi inadecvate pentru PDC-ul acestor tulpini, nedetectându-se produși de condensare în amestecul de reacție (sau < 1%) în majoritatea cazurilor, cu excepția derivaților substituiți cu atomi de halogen și gruparea metil. Conform rezultatelor prezentate în **Figura 3.6 A** pentru reacțiile mediate de *C. guilliermondii* (ca tulpină reprezentativă) pe substraturi *orto*-substituie, cantitatea de aciloină obținută în urma reacției biocatalizate scade drastic pe măsură ce volumul substituentului crește. Principalul motiv pentru această reactivitate scăzută constă în impedimentarea sterică datorată acestor substituenți, care pot împiedica atacul nucleofil al „aldehidei activate” legate de TPP. Se poate observa că în majoritatea experimentelor efectuate, derivații substituiți cu aceeași grupare au fost acceptați ca substrat dacă substituentul s-a aflat în pozițiile *meta* sau *para*., Această impedimentare sterică poate împiedica, de asemenea, accesul substratului în situsul activ al enzimei. Cu toate acestea, cantitatea de aciloină obținută pentru substraturile substituie în pozițiile *meta* și *para* a fost comparabilă și în general, s-au observat conversii mai mari în produsul de condensare ($C_B\%$) pentru substraturile substituie în poziția *meta* decât cele în poziția *para*, conform datelor prezentate în **Figurile 3.6 B și C**.

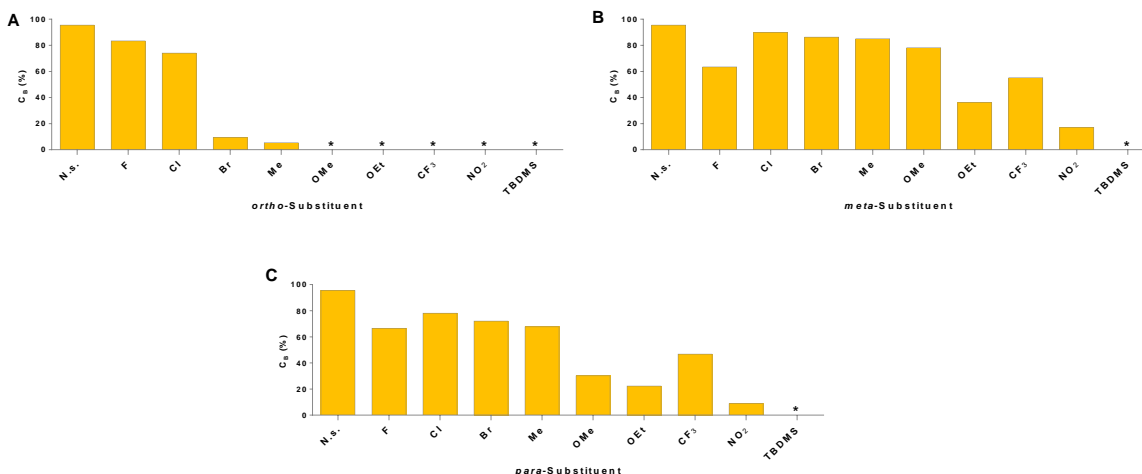


Figura 3.6. Influența poziției și tipului de substituent asupra reacțiilor de condensare a aciloinii mediate de celule întregi de *C. guilliermondii*. A) Conversii în aciloină (C_B) obținute pentru substraturi *ortho*-substituie; B) Conversii în aciloină (C_B) obținute pentru substraturi *meta*-substituie; C) Conversii în aciloină (C_B) obținute pentru substraturi *para*-substituie. * Nu s-a detectat produs aciloinic (sau <1%). N.s.- fără substituent.

Luând în considerare efectele electronice ale substituenților, se poate presupune că atât substituenții electronoatragatori, cât și substituenții electronodonori au, de asemenea, un anumit grad de influență asupra activității PDC-ului pe substraturile testate. Cu toate acestea, conversia în produs aciloină pentru substraturile *para*- și *meta*-substituie nu arată o corelație clară între efectul electronic și cantitatea gradul de transformare a substratului în produsul de condensare aciloinică.

În ceea ce privește puritatea optică a aciloinelor obținute folosind cele patru tulpini de drojdie ca biocatalizatori, excesul enantiomeric a fost ridicat (90-98%) pentru toate aciloinile obținute, totuși o corelație directă între enantioselectivități și tipul de substrat/substituent nu se poate determina pe baza datelor obținute, conform rezultatelor prezentate în **Figura 3.7**. De asemenea, se poate presupune că enantiopreferința PDC-ului prezent în tulpinile investigate nu se schimbă atunci când sunt folosite ca substraturi aldehidele substituie în loc de benzaldehidă. Din această perspectivă, se poate afirma că enantiomerul *R* a fost produsul majoritar pentru toate substraturile investigate. Această concluzie este susținută și de literatura publicată până în prezent.^{35,65}

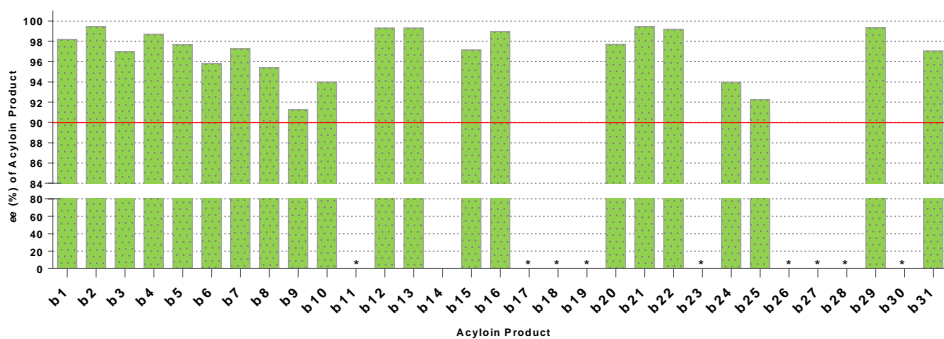


Figura 3.7. Puritatea optică (*ee*%) a aciloinelor obținute **b1-31** prin reacții de condensare biocatalitice mediate de celule întregi liofilizate de *C. guilliermondii*. *Nu s-a detectat produs de condensare sau nedeterminat.

3.3.7. Sinteza de (*R*)-fenilacetilcarbinol cu celule immobilizate ale tulpinilor de drojdie selectate în sistem discontinuu și continuu

Pe lângă activitatea și stereoselectivitatea tulpinilor de drojdie testate, un alt aspect important al utilizării lor ca potențiali biocatalizatori constă în reutilizabilitatea și stabilitatea lor la depozitare. Prin urmare, pe lângă investigațiile descrise anterior, a fost investigată și posibilitatea de a utiliza două dintre tulpinile de drojdie testate, *Pichia carsonii* și *Lodderomyces elongisporus*, în formă immobilizată pentru a produce (*R*)-PAC prin reacții de condensare aciloinică, atât în sistem discontinuu cât și continuu. Ca tehnică de immobilizare, a fost utilizată o metodă de immobilizare în sol-gel de generația a II-a (**Figura 3.8**), cu microsferă de silice MAT540 ca suport pentru immobilizare.⁶⁶

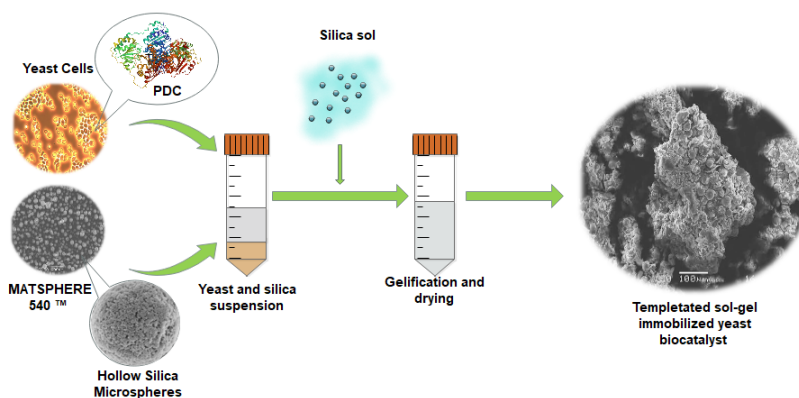


Figura 3.8. Immobilizarea celulelor de drojdie în matrice de sol-gel de generația a II-a.

Forma immobilizată a celulelor de *Pichia carsonii* și *Lodderomyces elongisporus* a fost testată mai întâi în reacții de condensare aciloinică folosind benzaldehidă ca substrat. Reacțiile biocatalitice au fost efectuate folosind celulele de drojdie în formă immobilizată, iar prelucrarea și analiza amestecului de reacție au fost efectuate în mod identic cu cea descrisă pentru reacțiile cu

celule liofilizate. După cum era de așteptat, rezultatele prezentate în **Tabelul 3.7** au arătat că activitatea PDC a celulelor de drojdie imobilizate a scăzut în comparație cu cea observată pentru forma liofilizată a celulelor. S-a constatat, de asemenea, că pentru biocatalizatorul imobilizat de *L. elongisporus*, conversia globală și cantitatea de aciloină au scăzut ușor (de la 59 la 44%), activitatea piruvat decarboxilazică a tulpinii de *P. carsonii* a suferit o scădere semnificativă și s-a observat doar o conversie minoră în aciloină.

Tabel 3.7. Rezultatele obținute pentru reacția de condensare aciloinică a benzaldehidei cu celulele de *L. elongisporus* și *P. carsonii*, în forma liofilizată și imobilizată.

Biocatalizator ^a	C (%)	C _{PAC} (%)	ee _{(R)-PAC} (%)
Celule liofilizate de <i>L. elongisporus</i>	>99	59	96
Celule liofilizate de <i>P. carsonii</i>	98	53	96
Celule imobilizate de <i>L. elongisporus</i>	92	44	93
Celule imobilizate de <i>P. carsonii</i>	>99	5	92

^aCondiții de reacție: biocatalizator (150 mg), tampon citrat (2,5 mL, pH = 5, 100 mM, cu un conținut de 1 mM MgCl₂) și piruvat de sodiu (3 echiv.) drept co-substrat; benzaldehidă (40 mM în 100 uL izopropanol), 750 rpm, 25 °C, 3 ore.

Pe urma, reutilizarea biocatalizatorului a fost investigată, testând în reacții discontinue de condensare aciloinică tulpina de *L. elongisporus* în forma liofilizată și în forma imobilizată, în aceleași condiții de reacție (**Tabelul 3.8**). S-a observat că activitatea biocatalizatorului imobilizat a scăzut cu ~10% la a doua utilizare, în timp ce pentru celulele liofilizate s-a observat o pierdere substanțială a activității. Din rezultatele obținute, s-a observat că forma imobilizată a celulelor de drojdie ajută la conservarea activității piruvat decarboxilazice a celulelor testate, în comparație cu forma liofilizată.

Tabel 3.8. Studiul reutilizării celulelor întregi de *L. elongisporus* în forma imobilizată și liofilizată, în reacția de condensare aciloinică a benzaldehidei.

Biocatalizator	Prima utilizare			A doua utilizare		
	C (%)	C _{PAC} (%)	ee _{(R)-PAC} (%)	C (%)	C _{PAC} (%)	ee _{(R)-PAC} (%)
Celule liofilizate de <i>L. elongisporus</i>	>99	58	96	63	5	92
Celule imobilizate de <i>L. elongisporus</i>	92	44	93	82	35	94

Deși biocatalizatorii în forma imobilizată au prezentat activității modeste, s-au efectuat studii suplimentare privind activitatea acestora și în sisteme de flux continuu. Așadar, a fost conceput un sistem de reacție în flux continuu, iar reacția de condensare aciloinică a benzaldehidei a fost studiată folosind același biocatalizator la două debite de alimentare a reactorului (**Figura 3.9**). În cazul experimentelor efectuate în flux continuu, s-au adăugat cantități mici de TPP în amestecul de reacție pentru a compensa un fenomen de „spălare” treptată, a cofactorului.

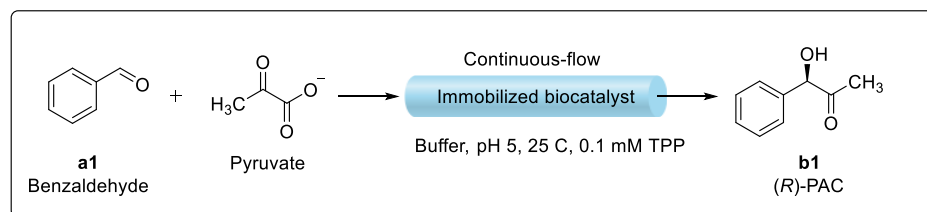


Figura 3.9. Reacția biocatalitică de condensare aciloinică în flux continuu cu celule de drojdie imobilizate.

În flux continuu, s-a observat o conversie mai mare în (R)-PAC pentru ambii biocatalizatori testați la un debit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, măsurată după ce sistemul s-a stabilizat și a atins o faza staționară (conform datelor prezentate în **Tabelul 3.9**). Creșterea debitului de alimentare la 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ a dus la o viteză de reacție specifică în flux mai mare, dar în același timp a dus și la o scădere a conversiei globale a substratului, precum și a cantității de (R)-PAC obținută.

Tabel 3.9. Rezultatele obținute în reacția de condensarea aciloinică a benzaldehidei în flux continuu cu biocatalizatori imobilizați.

Biocatalizator	Debit* ($\mu\text{L}/\text{min}$)	C (%)	C _{PAC} (%)	ee _{(R)-PAC} (%)	r _{flow}
Celule imobilizate de <i>L. elongisporus</i>	50	98	51	96	1.2
	100	81	37	94	1.8
Celule imobilizate de <i>P. carsonii</i>	50	69	19	90	0.5
	100	59	15	91	0.7

Condiții de reacție: benzaldehidă (20 mM), piruvat de sodiu (60 mM), TPP (0,2 mM), MgCl_2 (1,0 mM) și 2-propanol (2 v/v%) în soluție tampon (100 mM, pH 5,0), masa biocatalizatorului introdus în reactor: 410 ± 13 mg, temperatură: 25 °C, debit: 50 și 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. *Viteza de reacție specifică în flux continuu (r_{flow}) conform următoarei ecuații: $r_{\text{flow}} = ([P] \times f) / m_b$, unde [P] – concentrația produsului ($\mu\text{mol}/\text{mL}$), f – debitul (mL/min), m_b – masa biocatalizatorului aplicat (g).

Deși s-au obținut doar conversii modeste în (R)-PAC chiar și în condiții de flux continuu, s-a observat că stabilitatea operațională a biocatalizatorului a fost excelentă și a putut fi menținută timp de 24 de ore, fără o pierdere semnificativă a activității enzimatică sau a purității optice a aciloinei obținute (**Figura 3.10**).

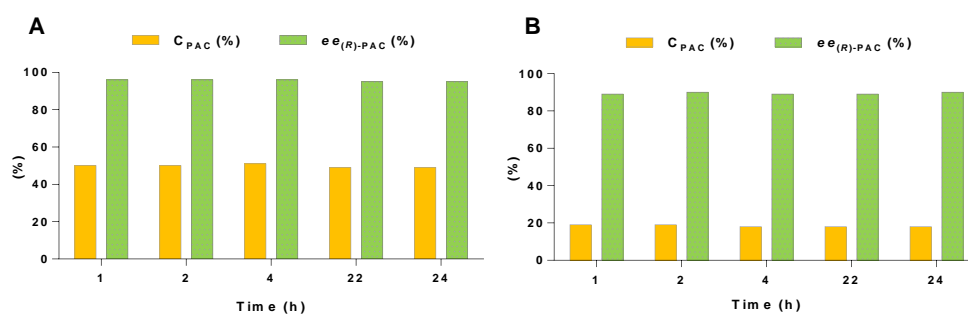


Figura 3.10. Productivitatea și stabilitatea operațională a celulelor de *L. elongisporus* (A) și *P. carsonii* (B) în forma imobilizată, în reacțiile de condensare aciloinică efectuate în regim de flux continuu. Condiții de reacție: benzaldehidă (20 mM), piruvat de sodiu (60 mM), TPP (0,2 mM), MgCl_2 (1,0 mM) și 2-propanol (2 v/v%) în soluție tampon (100 mM, pH 5,0), masa biocatalizatorului introdus în reactor: 410 ± 13 mg, temperatura: 25 °C, debit: 50 $\mu\text{L}/\text{min}$].

Pe baza datelor prezentate, biocatalizatorii rezultați prin imobilizarea celor două tulpini de drojdii în matrice de sol-gel au oferit rezultate modeste în ceea ce privește cantitatea de (*R*)-PAC obținută în timpul reacțiilor biocatalitice. În perspectivă, studii suplimentare pot fi efectuate pentru îmbunătățirea rezultatelor prin imobilizarea altor celule de drojdie cu activitate PDC superioară folosind aceeași tehnică de imobilizare, sau prin optimizarea condițiilor de reacție pentru procesul în flux continuu. Cu toate acestea, biocatalizatorii obținuți au prezentat o bună reutilizare în reacțiile efectuate în regim discontinuu și o stabilitate operațională remarcabilă atunci când reacția biocatalitică a fost efectuată în regim de flux continuu.

3.4. Concluzii

În concluzie, obiectivele propuse, de a studia noile tulpini selecționate de drojdie, au fost atinse cu succes. În urma screening-ului celor douăsprezece drojdii neconvenționale, s-au identificat patru tulpini care au prezentat rezultate excelente în ceea ce privește activitatea piruvat decarboxilazică, în reacția de condensare aciloinică a benzaldehidei pentru sinteza (*R*)-fenilacetilcarbinolului ($C_{PAC} > 50\%$). De asemenea, s-a demonstrat ca aceste tulpini de drojdie neconvenționale conțin piruvat decarboxilaze (*R*)-selective, capabile să medieze sinteza (*R*)-PAC-ului corespunzător cu puritate optică ridicată. Condițiile de reacție selectate au fost optimizate cu succes pentru cele patru tulpini selectate prin utilizarea experimentului factorial complet. În condiții optime, s-au obținut conversii cantitative ($>98\%$) ale benzaldehidei și conversii mari ($>80\%$) în produsul dorit (*R*)-PAC, cu purități optice excelente ($ee > 97\%$). De asemenea, a fost determinat un domeniu preliminar de substrat al enzimelor PDC prezente în drojdiile studiate și s-a constatat că aceste enzimele pot accepta o gamă largă de substraturi nenaturale. Cu excepția unor diferențe locale, spectrul de substrat al enzimelor PDC native ale drojdiilor nu a prezentat variații mari pentru reacțiile care implică același substrat. S-a observat o activitate și selectivitate PDC biocatalitică excelentă pentru o gamă variată de aldehide, iar aciloinele obținute în urma reacțiilor biocatalitice au prezentat o puritate optică ridicată pentru toate substraturile care au fost acceptate de PDC-urile prezente în celule.

În final, aplicabilitatea biocatalitică a tulpinilor de *P. carsonii* și *L. elongisporus* în formă imobilizată a fost de asemenea investigată, prin imobilizarea celulelor în matrice de sol-gel și microparticule de silice. După imobilizare, s-a demonstrat că tulpinile investigate ar putea fi utilizate cu succes ca biocatalizatori reutilizabili pentru sinteza (*R*)-PAC-ului atât în procese discontinue cât și în procese de flux continuu, dar o scădere a activității a fost observată în acest caz. De asemenea, s-a demonstrat că biocatalizatorii dezvoltați prezintă o stabilitate operațională excelentă și pot fi utilizați în procese de flux continuu timp de 24 de ore fără pierderi semnificative a activității PDC-ului.

4. Concluzii generale

Prezenta teză tratează două subiecte relevante în biocataliză, în conformitate cu cele două capitole discutate.

Primul obiectiv al tezei a fost de a stabili o procedură biocatalitică pentru sinteza sustenabilă a diesterilor 2,5-bis(hidroximetil)furan-ului cu acizi grași ca produși cu valoare adăugată, pornind din materii prime regenerabile. Studiul a demonstrat că diesterii cu acizi grași ai BHMF-ului pot fi sintetizați cu succes prin diesterificarea mediată de Novozym 435 a 2,5-bis(hidroximetil)furanului cu acizi grași în 2-MeTHF ca solvent verde, cu randamente și selectivități ridicate. Efectuarea reacției la o scară de 100 g a permis sinteza unei cantități suficient de mare de diester, care a fost testat și confirmat în continuare ca un potențial aditiv pentru creșterea cifrei cetanice a biodieselului comercial. Ca proces biocatalitic alternativ, acizii grași lichizi sau amestecurile lichide de acizi grași derivate din uleiul de floarea soarelui au permis sinteza biocatalitică a diesterilor de BHMF în absența solventului și în condiții de reacție eterogene. În final, ambele procese biocatalitice prezintă valori foarte bune ale indicilor calculați care susțin sustenabilitatea generală a metodelor dezvoltate.

Al doilea obiectiv al tezei a fost investigarea de noi tulpini de drojdie neconvenționale ca biocatalizatori pentru sinteza aciloinelor optice active. Studiul a raportat screening-ul mai multor tulpini de drojdie în formă liofilizată pentru sinteza (*R*)-fenilacetilcarbinolului. După o selecție preliminară bazată pe activitatea PDC observată, patru tulpini de *P. carsonii*, *L. elongisporus*, *C. guilliermondii* și *C. guilliermondii* var au fost identificate ca și biocatalizatori cu o activitate enzimatică PDC ridicată. În condiții optime, domeniul de substrat al enzimelor PDC prezente în celulele investigate a fost investigat în continuare. S-a descoperit că tulpinile de drojdie identificate pot efectua condensarea aciloinică a unei game largi de substraturi nenaturale. De asemenea, tulpinile de *P. carsonii* și *L. elongisporus* au fost investigate ca biocatalizatori în reacția de condensare aciloinică și în formă imobilizată. Biocatalizatorii obținuți au prezentat rezultate modeste în sinteza enzimatică a (*R*)-PAC-ului atât în reacții discontinue, cât și în flux continuu, dar în același timp s-a observat o stabilitate operațională excelentă a biocatalizatorilor obținuți.

6. Mulțumiri

Lucrarea experimentală prezentată în teză a fost efectuată în laboratoarele Centrului de Cercetare în Biocataliză și Biotransformări, Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică a Universității Babeș-Bolyai.

În primul rând, aș dori să-mi exprim sincera recunoștință conducătorului meu științific Prof. Emerit Dr. Ing. Florin Dan Irimie pentru tot ajutorul, răbdarea și sfaturile oferite, și pentru că m-a supravegheat pe parcursul activității mele de cercetare. Pe lângă supravegherea sa în timpul doctoratului, aș dori să îi mulțumesc domnului profesor Irimie pentru că m-a primit în grupul său de cercetare în urmă cu doisprezece ani, permițându-mi să cresc sub îndrumarea sa și, de asemenea, pentru că si-a asumat rolul de a-mi fi îndrumător pe parcursul studiilor la nivel licența și de masterat.

Mulțumiri deosebite doamnei Prof. Habil. Dr. Ing. Monica Ioana Toșa și domnului prof. Habil. Dr. Ing. Paizs Csaba pentru tot sprijinul oferit, pentru toate discuțiile științifice și personale purtate, pentru toate sfaturile și compasiunea oferită.

Mulțumirea mea sinceră pentru seniorii centrului de cercetare: Lect. Dr. László Csaba Bencze, Lect. Dr. Róbert Tóth, Lect. Dr. Ing. Mădălina Elena Moisă, Conf. Dr. Gabriel Katona și Lect. Dr. Paula Veronica Podea, pentru ajutorul acordat pe parcursul studiilor doctorale.

Totodată, aș dori să le mulțumesc colegilor mei pentru ajutorul și prietenia oferită: Asist. Dr. Andrea Varga, Asist. Dr. Alina Filip, Asist. Dr. Melinda Emese László, Asist. Ing. Souad-Diana Tork, Dr. Hajnal Vári-Bartha, Dr. Ing. Botond Nagy, Dr. Ing. Mara Ana Naghi, Ing. Laura-Edit Barabás, Cristian Andrei Gál, Monica Jipa, Ing. Cristina Spelmezan, Ing. Ioan Bodea, Ibolya Varga. În plus, aș dori să-i ofer cele mai calde mulțumiri lui Ing. Adrian Ioan Dudu, care a fost studentul și colegul meu, și cel mai drag prieten de-a lungul acestor ani.

Aș dori să-mi exprim recunoștința domnului Prof. László Poppe și grupului său de cercetare din cadrul Universității de Tehnologie și Economie din Budapesta, pentru sprijinul, discuțiile și colaborarea lor în cadrul proiectelor noastre comune.

Lucrarea din cadrul acestei teze a fost susținută de Ministerului Educației și Cercetării din România (prin proiectul PN-II-PT-PCCA-2013) și a Autorității Naționale pentru Cercetare Științifică și Inovare (prin proiectul ID P_37_273, codSMIS 103413).

Mulțumesc sincer familiei mele: părinților mei și fratelui meu; și tuturor prietenilor mei pentru dragostea și sprijinul lor. Sunt foarte norocos să vă am pe toți în viața mea.

Nu în ultimul rând, îi ofer toată recunoștința viitoarei mele soții Diana-Monica Bordea pentru înțelegerea, sprijinul și pentru că m-a iubit în fiecare zi în toți acești ani. Fără ea, probabil că nu aș fi aici acum.

7. Lista publicațiilor

Prezenta teză se bazează pe următoarele publicații.

Publicații științifice:

1. Lăcătuș, M.A., Bencze, L.C., Toșa, M.I., Paizs, C. and Irimie, F.D., **2018**. Eco-friendly enzymatic production of 2, 5-bis (hydroxymethyl) furan fatty acid diesters, potential biodiesel additives. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(9), pp.11353-11359.
2. Lăcătuș, M.A., Dudu, A.I., Bencze, L.C., Katona, G., Irimie, F.D., Paizs, C. and Toșa, M.I., **2020**. Solvent-free biocatalytic synthesis of 2, 5-bis-(hydroxymethyl) furan fatty acid diesters from renewable resources. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(3), pp.1611-1617.
3. Nagy-Győr, L., Lăcătuș, M., Balogh-Weiser, D., Csuka, P., Bódai, V., Erdélyi, B., Molnár, Z., Hornyánszky, G., Paizs, C. and Poppe, L., **2019**. How to Turn Yeast Cells into a Sustainable and Switchable Biocatalyst? On-Demand Catalysis of Ketone Bioreduction or Acyloin Condensation. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(24), pp.19375-19383.
4. Nagy-Győr, L., Farkas, E., Lăcătuș, M., Tóth, G., Incze, D., Hornyánszky, G., Bódai, V., Paizs, C., Poppe, L. and Balogh-Weiser, D., **2020**. Conservation of the Biocatalytic Activity of Whole Yeast Cells by Supported Sol-Gel Entrapment for Efficient Acyloin Condensation. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 64(2), pp.153-161.

Alte publicații care au rezultat în timpul studiilor de doctorat cu subiecte complementare:

5. Dudu, A.I., Lăcătuș, M.A., Bencze, L.C., Paizs, C. and Toșa, M.I., **2021**. Green Process for the Enzymatic Synthesis of Aroma Compounds Mediated by Lipases Entrapped in Tailored Sol-Gel Matrices. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9(15), pp.5461-5469.

Conferințe:

1. Lăcătuș M., Bódai V., Toșa M. I., Paizs C., Poppe L., Irimie F.D., Investigation of new biocatalysts with carbonylase activity for the synthesis of chiral aromatic 2-hydroxyketones. National Conference of Doctoral Schools from the University Consortium - Chemistry Section, Iasi (Romania), **2018**
2. Lăcătuș M., Toșa M. I., Paizs C., Irimie F.D., An eco-friendly enzymatic approach for the production of 2,5-bis(hydroxymethyl)furan fatty acid esters, International Conference Young Researchers in Sciences, Cluj-Napoca (Romania), **2017**
3. Lăcătuș M., Bencze L.C., Paizs C., Irimie F.D., Potential of some yeast strains in the stereoselective biosynthesis of acyloins, 3rd Symposium Biotransformations, Warsaw (Poland), **2016**
4. Lăcătuș M., Nagy-Győr² L., Bencze L.C., Paizs C., Poppe L., Irimie F.D., Biocatalytic stereoselective acyloin condensations by new yeast strains, Young Researchers' International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (YRICCCE I), Cluj-Napoca (Romania), **2016**

8. Referințe

- (1) Mika, L. T.; Cséfalvay, E.; Németh, Á. Catalytic Conversion of Carbohydrates to Initial Platform Chemicals: Chemistry and Sustainability. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (2), 505–613, DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00395.
- (2) Hu, L.; Lin, L.; Wu, Z.; Zhou, S.; Liu, S. Recent Advances in Catalytic Transformation of Biomass-Derived 5-Hydroxymethylfurfural into the Innovative Fuels and Chemicals. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017, pp 230–257, DOI: 10.1016/j.rser.2017.02.042.
- (3) Gelmini, A.; Albonetti, S.; Cavani, F.; Cesari, C.; Lolli, A.; Zanotti, V.; Mazzoni, R. Oxidant Free One-Pot Transformation of Bio-Based 2,5-Bis-Hydroxymethylfuran into α -6-Hydroxy-6-Methyl-4-Enyl-2H-Pyran-3-One in Water. *Appl. Catal. B Environ.* **2016**, *180*, 38–43, DOI: 10.1016/j.apcatb.2015.06.003.
- (4) Jiang, Y.; Loos, K. Enzymatic Synthesis of Biobased Polyesters and Polyamides. *Polymers (Basel)*. **2016**, *8* (7), DOI: 10.3390/polym8070243.
- (5) Maniar, D.; Jiang, Y.; Woortman, A. J. J.; van Dijken, J.; Loos, K. Furan-Based Copolyesters from Renewable Resources: Enzymatic Synthesis and Properties. *ChemSusChem* **2019**, *12* (5), 990–999, 10.1002/cssc.201802867.
- (6) Gandini, A.; Lacerda, T. M.; Carvalho, A. J. F.; Trovatti, E. Progress of Polymers from Renewable Resources: Furans, Vegetable Oils, and Polysaccharides. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (3), 1637–1669, DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00264.
- (7) Moreau, C.; Belgacem, M. N.; Gandini, A. Recent Catalytic Advances in the Chemistry of Substituted Furans from Carbohydrates and in the Ensuing Polymers. *Top. Catal.* **2004**, *27* (1), 11–30, DOI: 10.1023/B:TOCA.0000013537.13540.0e.
- (8) Domínguez de María, P.; Guajardo, N. Biocatalytic Valorization of Furans: Opportunities for Inherently Unstable Substrates. *ChemSusChem* **2017**, *10* (21), 4123–4134, DOI: 10.1002/cssc.201701583.
- (9) Boday, D. J.; Kuczynski, J.; Wertz, J. T.; Zhang, J. Bioderived Based Plasticizers, May 29, **2018**, Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- (10) Stensrud, K.; Wicklund, L. Synthesis of Non-Ionic Surfactants from 5-Hydroxymethyl-2-Furfural, Furan-2,5-Dimethanol and Bis-2,5-Dihydroxymethyltetrahydrofurans, August 10, **2017**, Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- (11) Pace, V.; Hoyos, P.; Castoldi, L.; Domínguez de María, P.; Alcántara, A. R. 2-Methyltetrahydrofuran (2-MeTHF): A Biomass-Derived Solvent with Broad Application in Organic Chemistry. *ChemSusChem* **2012**, *5* (8), 1369–1379, DOI: 10.1002/cssc.201100780.
- (12) Belafriekh, A.; Secundo, F.; Serra, S.; Djeghaba, Z. Enantioselective Enzymatic Resolution of Racemic Alcohols by Lipases in Green Organic Solvents. *Tetrahedron: Asymmetry* **2017**, *28* (3), 473–478, DOI: 10.1016/j.tetasy.2017.02.004.
- (13) Chen, Z.-G.; Zhang, D.-N.; Cao, L.; Han, Y.-B. Highly Efficient and Regioselective Acylation of Pharmacologically Interesting Cordycepin Catalyzed by Lipase in the Eco-Friendly Solvent 2-Methyltetrahydrofuran. *Bioresour. Technol.* **2013**, *133*, 82–86, DOI: 10.1016/j.biortech.2013.01.117.
- (14) Simeó, Y.; Sinisterra, J. V.; Alcántara, A. R. Regioselective Enzymatic Acylation of Pharmacologically Interesting Nucleosides in 2-Methyltetrahydrofuran, a Greener Substitute for THF. *Green Chem.* **2009**, *11* (6), 855–862, DOI: 10.1039/B818992G.
- (15) Shanmuganathan, S.; Natalia, D.; van den Wittenboer, A.; Kohlmann, C.; Greiner, L.; Domínguez de María, P. Enzyme-Catalyzed C–C Bond Formation Using 2-Methyltetrahydrofuran (2-MTHF) as (Co)Solvent: Efficient and Bio-Based Alternative to DMSO and MTBE. *Green Chem.* **2010**, *12* (12), 2240–2245, DOI: 10.1039/C0GC00590H.
- (16) Qin, Y. Z.; Zong, M. H.; Lou, W. Y.; Li, N. Biocatalytic Upgrading of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) with Levulinic Acid to HMF Levulinate in Biomass-Derived Solvents. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4* (7), 4050–4054, DOI: 10.1021/acssuschemeng.6b00996.
- (17) 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, DOI: 10.1016/j.renene.2011.08.007.
- (18) Constable, D. J. C.; Curzons, A. D.; Cunningham, V. L. Metrics to “green” Chemistry - Which Are the Best? *Green Chem.* **2002**, *4* (6), 521–527, DOI: 10.1039/b206169b.
- (19) Martínez-Guerra, E.; Gude, V. Assessment of Sustainability Indicators for Biodiesel Production. *Appl. Sci.* **2017**, *7* (9), 869, DOI: 10.3390/app7090869.
- (20) Brovetto, M.; Gamnara, D.; Saenz Méndez, P.; Seoane, G. A. C-C Bond-Forming Lyases in Organic

- Synthesis. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (7), 4346–4403, DOI: 10.1021/cr100299p.
- (21) Hoyos, P.; Sinisterra, J. V.; Molinari, F.; Alcántara, A. R.; De María, P. D. Biocatalytic Strategies for the Asymmetric Synthesis of α -Hydroxy Ketones. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43* (2), 288–299, DOI: 10.1021/ar900196n.
 - (22) Lingham, R. B.; Singh, S. B. Farnesyl-Protein Transferase: A New Paradigm for Cancer Chemotherapy, Advances in Discovery and Development of Natural Product Inhibitors. In *Bioactive Natural Products (Part E)*; Atta-ur-Rahman, B. T.-S. in N. P. C., Ed.; Elsevier, **2000**; Vol. 24, pp 403–472, DOI: 10.1016/S1572-5995(00)80050-2.
 - (23) Schieferdecker, S.; Shabuer, G.; Letzel, A. C.; Urbansky, B.; Ishida-Ito, M.; Ishida, K.; Cyrulies, M.; Dahse, H. M.; Pidot, S.; Hertweck, C. Biosynthesis of Diverse Antimicrobial and Antiproliferative Acyloins in Anaerobic Bacteria. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14* (7), 1490–1497, DOI: 10.1021/acscchembio.9b00228.
 - (24) Neuser, F.; Zorn, H.; Berger, R. G. Generation of Odorous Acyloins by Yeast Pyruvate Decarboxylases and Their Occurrence in Sherry and Soy Sauce. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (12), 6191–6195, DOI: 10.1021/jf000535b.
 - (25) Puigmartí, M.; Bosch, M. P.; Coll, J.; Guerrero, A. New and Convenient Chemoenzymatic Syntheses of (S)-2-Hydroxy-3-Octanone, the Major Pheromone Component of *Xylotrechus* Spp., and Its R-Enantiomer. *Synthesis (Stuttg.)* **2017**, *49* (07), 1561–1568, DOI: 10.1055/s-0036-1588666.
 - (26) Scheidt, K. A.; O'Bryan, E. A. *Acyloin Coupling Reactions*; Elsevier Ltd., **2014**; Vol. 3, DOI: 10.1016/B978-0-08-097742-3.00317-7.
 - (27) Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (2), 801–838, DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00203.
 - (28) Loschonsky, S.; Waltzer, S.; Fraas, S.; Wacker, T.; Andrade, S. L. A.; Kroneck, P. M. H.; Müller, M. Catalytic Scope of the Thiamine-Dependent Multifunctional Enzyme Cyclohexane-1,2-Dione Hydrolase. *ChemBioChem* **2014**, *15* (3), 389–392, DOI: 10.1002/cbic.201300673.
 - (29) Wechsler, C. Intermediates in the Carboligation of the ThDP-Dependent Pyruvate Decarboxylase: Tailor-Made Enzyme Catalysts for Industrial Applications; Cuvillier Verlag, **2014**.
 - (30) Clapés, P. Enzymatic C-C Bond Formation. In *Organic Synthesis Using Biocatalysis*. Academic Press, 2016, pp 285–337, DOI: 10.1016/B978-0-12-411518-7.00010-X.
 - (31) Demir, A. S.; Ayhan, P.; Betül Sopaci, S. Thiamine Pyrophosphate Dependent Enzyme Catalyzed Reactions: Stereoselective C-C Bond Formations in Water. *Clean - Soil, Air, Water* **2007**, *35* (5), 406–412, DOI: 10.1002/clen.200720003.
 - (32) Schmidt, N. G.; Eger, E.; Kroutil, W. Building Bridges: Biocatalytic C-C-Bond Formation toward Multifunctional Products. *ACS Catal.* **2016**, *6* (7), 4286–4311, DOI: 10.1021/acscatal.6b00758.
 - (33) Samland, A. K.; Sprenger, G. A. Microbial Aldolases as C-C Bonding Enzymes - Unknown Treasures and New Developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *71* (3), 253–264, DOI: 10.1007/s00253-006-0422-6.
 - (34) Demir, A. S.; Pohl, M.; Janzen, E.; Müller, M. Enantioselective Synthesis of Hydroxy Ketones through Cleavage and Formation of Acyloin Linkage. Enzymatic Kinetic Resolution via C–C Bond Cleavage. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2001**, *7*, 633–635, DOI: 10.1039/b100341k.
 - (35) Hailles, H. C.; Rother, D.; Müller, M.; Westphal, R.; Ward, J. M.; Pleiss, J.; Vogel, C.; Pohl, M. Engineering Stereoselectivity of ThDP-Dependent Enzymes. *FEBS J.* **2013**, *280* (24), 6374–6394, DOI: 10.1111/febs.12496.
 - (36) De María, P. D.; Pohl, M.; Gocke, D.; Gröger, H.; Trauthwein, H.; Stillger, T.; Walter, L.; Müller, M. Asymmetric Synthesis of Aliphatic 2-Hydroxy Ketones by Enzymatic Carboligation of Aldehydes. *European J. Org. Chem.* **2007**, *18*, 2940–2944, DOI: 10.1002/ejoc.200600876.
 - (37) Resch, V.; Schrittwieser, J. H.; Sirola, E.; Kroutil, W. Novel Carbon-Carbon Bond Formations for Biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011, pp 793–799, DOI: 10.1016/j.copbio.2011.02.002.
 - (38) Müller, M.; Gocke, D.; Pohl, M. Thiamin Diphosphate in Biological Chemistry: Exploitation of Diverse Thiamin Diphosphate-Dependent Enzymes for Asymmetric Chemoenzymatic Synthesis. *FEBS J.* **2009**, *276* (11), 2894–2904, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07017.x.
 - (39) Buchholz, P. C. F.; Ferrario, V.; Pohl, M.; Gardossi, L.; Pleiss, J. Navigating within Thiamine Diphosphate-Dependent Decarboxylases: Sequences, Structures, Functional Positions, and Binding Sites. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2019**, *87* (9), 774–785, DOI: 10.1002/prot.25706.
 - (40) Martins, R. S.; Zampieri, D. S.; Rodrigues, J. A. R.; Carvalho, P. O.; Moran, P. J. S. Stereoselective Oxidation of 1-Phenyl-1,2-Propanediol Mediated by Microorganisms. *ChemCatChem* **2011**, *3* (9), 1469–1473, DOI: 10.1002/cctc.201100145.
 - (41) Clapés, P. *Enzymatic C-C Bond Formation*; Elsevier Inc., **2016**, DOI: 10.1016/B978-0-12-411518-7.00010-X.

- (42) Ward, O. P.; Singh, A. Enzymatic Asymmetric Synthesis by Decarboxylases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11* (6), 520–526, DOI: 10.1016/S0958-1669(00)00139-7.
- (43) Kutter, S.; Weiss, M. S.; Wille, G.; Golbik, R.; Spinka, M.; König, S. Covalently Bound Substrate at the Regulatory Site of Yeast Pyruvate Decarboxylases Triggers Allosteric Enzyme Activation. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (18), 12136–12144, DOI: 10.1074/jbc.M806228200.
- (44) Pohl, M. Protein Design on Pyruvate Decarboxylase (PDC) by Site-Directed Mutagenesis BT - New Enzymes for Organic Synthesis: Screening, Supply and Engineering; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **1997**; 15–43, DOI: 10.1007/BFb0103301.
- (45) Andreu, C.; lí del Olmo, M. Biotransformation Using Halotolerant Yeast in Seawater: A Sustainable Strategy to Produce *R*-(–)-Phenylacetylcarbinol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102* (11), 4717–4727, DOI: 10.1007/s00253-018-8945-1.
- (46) Ward, O. Singh, A. In *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*, Patel, R. N. Ed.; CRC press, CRC Press: Boca Raton, FL; **2006**, pp. 626–630, DOI: 10.1201/9781420019377.
- (47) Csuka, P.; Nagy-Győr, L.; Molnár, Z.; Paizs, C.; Bódai, V.; Poppe, L. Characterization of Yeast Strains with Ketoreductase Activity for Bioreduction of Ketones. *Period. Polytech. Chem. Eng.* **2021**, *65* (3), 299–307, DOI: 10.3311/PPCh.17429.
- (48) Ning, C.; Su, E.; Wei, D. Characterization and Identification of Three Novel Aldo–Keto Reductases from *Lodderomyces Elongisporus* for Reducing Ethyl 4-Chloroacetoacetate. *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, *564*, 219–228, DOI: 10.1016/j.abb.2014.10.007.
- (49) Pei, R.; Wu, W.; Zhang, Y.; Tian, L.; Jiang, W.; Zhou, S. F. Characterization and Catalytic-Site-Analysis of an Aldo-Keto Reductase with Excellent Solvent Tolerance. *Catalysts* **2020**, *10* (10), 1–12, DOI: 10.3390/catal10101121.
- (50) Bódai, V.; Nagy-Győr, L.; Örkényi, R.; Molnár, Z.; Kohári, S.; Erdélyi, B.; Nagymáté, Z.; Romsics, C.; Paizs, C.; Poppe, L.; et al. *Wickerhamomyces Subpelliculosus* as Whole-Cell Biocatalyst for Stereoselective Bioreduction of Ketones. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2016**, *134*, 206–214, DOI: 10.1016/j.molcatb.2016.11.003.
- (51) Perrone, M. G.; Santandrea, E.; Scilimati, A.; Sylđatk, C.; Tortorella, V. Screening Yeasts for the Stereoselective Reduction of Oxoester Clofibrate Analogues. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16* (8), 1473–1477, DOI: 10.1016/j.tetasy.2005.02.010.
- (52) Perrone, M. G.; Santandrea, E.; Scilimati, A.; Sylđatk, C.; Tortorella, V.; Capitelli, F.; Bertolasi, V. Diastereo- and Enantioselective Bioreduction of Ethyl 2-(4-Chlorophenoxy)-3-Oxobutanoate Clofibrate Analogues by *Kluyveromyces Marxianus* and Other Whole Cell Biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15* (22), 3511–3517, DOI: 10.1016/j.tetasy.2004.08.028.
- (53) Serra, S.; Castagna, A.; Valentino, M. Biocatalytic Synthesis of Natural Dihydrocoumarin by Microbial Reduction of Coumarin. *Catalysts* **2019**, *9* (8), DOI: 10.3390/catal9080665.
- (54) Ponamoreva, O. N.; Afonina, E. L.; Kamanina, O. A.; Lavrova, D. G.; Arlyapov, V. A.; Alferov, V. A.; Boronin, A. M. Yeast *Debaryomyces Hansenii* within ORMOSIL Shells as a Heterogeneous Biocatalyst. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2018**, *54* (7), 736–742, DOI: 10.1134/S0003683818070062.
- (55) Cortez, D. V.; Roberto, I. C. Optimization of D-Xylose to Xylitol Biotransformation by *Candida Guilliermondii* Cells Permeabilized with Triton X-100. *Biocatal. Biotransformation* **2014**, *32* (1), 34–38, DOI: 10.3109/10242422.2013.870558.
- (56) Werner, N.; Dreyer, M.; Wagner, W.; Papon, N.; Rupp, S.; Zibek, S. *Candida Guilliermondii* as a Potential Biocatalyst for the Production of Long-Chain α,ω -Dicarboxylic Acids. *Biotechnol. Lett.* **2017**, *39* (3), 429–438, DOI: 10.1007/s10529-016-2264-3.
- (57) Serra, I.; Capusoni, C.; Molinari, F.; Musso, L.; Pellegrino, L.; Compagno, C. Marine Microorganisms for Biocatalysis: Selective Hydrolysis of Nitriles with a Salt-Resistant Strain of *Meyerozyma Guilliermondii*. *Mar. Biotechnol.* **2019**, *21* (2), 229–239, DOI: 10.1007/s10126-019-09875-0.
- (58) Andreu, C.; del Olmo, M. Whole-Cell Biocatalysis in Seawater: New Halotolerant Yeast Strains for the Regio- and Stereoselectivity Reduction of 1-Phenylpropane-1,2-Dione in Saline-Rich Media. *ChemBioChem* **2020**, *21* (11), 1621–1628, DOI: 10.1002/cbic.202000023.
- (59) Wang, J.; Cheng, P.; Wu, Y.; Wang, A.; Liu, F.; Pei, X. Discovery of a New NADPH-Dependent Aldo-Keto Reductase from *Candida Orthopsilosis* Catalyzing the Stereospecific Synthesis of (R)-Pantolactone by Genome Mining. *J. Biotechnol.* **2019**, *291*, 26–34, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.12.011.
- (60) Matsuyama, A.; Yamamoto, H.; Kawada, N.; Kobayashi, Y. Industrial Production of (R)-1,3-Butanediol by New Biocatalysts. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2001**, *11* (4), 513–521, DOI: 10.1016/S1381-1177(00)00032-1.
- (61) Nagy-Győr, L.; Farkas, E.; Lăcătuș, M.; Tóth, G.; Inceze, D.; Hornyánszky, G.; Bódai, V.; Paizs, C.; Poppe, L.; Balogh-Weiser, D. Conservation of the Biocatalytic Activity of Whole Yeast Cells by Supported Sol –

- Gel Entrapment for Efficient Acyloin Condensation. *Period. Polytech. Chem. Eng.* **2020**, *64* (2), 153–161, DOI: 10.3311/PPch.14645.
- (62) Kevin Dunn. Pid: Process Improvement Using Data. **2015**, Available online at: <https://learnche.org/pid/> (Accessed on 20.09.2021)
- (63) Minitab 17 Statistical Software (2010), State College, PA: Minitab, Inc. Available online at: <https://www.minitab.com/en-us/products/minitab/> (Accessed on 10.11.2021).
- (64) Andreu, C.; Del Olmo, M. L. Potential of Some Yeast Strains in the Stereoselective Synthesis of (R)-(-)-Phenylacetylcarbinol and (S)-(+)-Phenylacetylcarbinol and Their Reduced 1,2-Dialcohol Derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98* (13), 5901–5913, DOI: 10.1007/s00253-014-5635-5.
- (65) Sehl, T.; Bock, S.; Marx, L.; Maugeri, Z.; Walter, L.; Westphal, R.; Vogel, C.; Menyes, U.; Erhardt, M.; Müller, M.; et al. Asymmetric Synthesis of (S)-Phenylacetylcarbinol-Closing a Gap in C-C Bond Formation. *Green Chem.* **2017**, *19* (2), DOI: 380–384, 10.1039/c6gc01803c.
- (66) Nagy-Győr, L.; Abaházi, E.; Bódai, V.; Sátorhelyi, P.; Erdélyi, B.; Balogh-Weiser, D.; Paizs, C.; Hornyánszky, G.; Poppe, L. Co-Immobilized Whole Cells with ω -Transaminase and Ketoreductase Activities for Continuous-Flow Cascade Reactions. *ChemBioChem* **2018**, *19* (17), 1845–1848, DOI: 10.1002/cbic.201800286.