



UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI DIN CLUJ NAPOCA
FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE

Încapsularea lipazei B din *Candida antarctica* în matrice de sol-gel cu aplicații biocatalitice

Abstractul tezei de doctorat

Student doctorand: **Ing. Adrian-Ioan Dudu**

Membrii comisiei:

Președinte: Acad. Prof. Dr. Cristian Silvestru

Conducător de doctorat: **Prof. Habil. Dr. Ing. Monica-Ioana Toșa**

Referenți: Prof. Dr. Ing. Francisc Peter, Universitatea Politehnică din
Timișoara

Prof. Dr. Francisc Dulf, Universitatea Agronomie și Medicină
Veterinară din Cluj Napoca

Conf. Anamaria-Elena Terec, Universitatea Babeș-Bolyai din
Cluj Napoca

Susținere publică: 14 Iunie 2022

Cluj Napoca

2022

Cuprins

Capitolul 1. Introducere generală.....	4
Capitolul 2. Studiu de literatură (date din literatură).....	7
Capitolul 3. Scopul tezei de doctorat.....	7
Capitolul 4. Contribuție personală.....	9
4.1. Obținerea biocatalitică a compușilor aromatici utilizând lipaza B din <i>Candida antarctica</i>	9
4.1.1. Sinteza enzimatică a propionatului de anisil mediată de lipaza B din <i>Candida antarctica</i>	9
4.1.1.1. Introducere (date din literatură).....	9
4.1.1.2. Rezultate și discuții	9
4.1.1.2.1. Screening de solvent	10
4.1.1.2.2. Screening de concentrație de substrat	10
4.1.1.2.3. Influența cantității de sită moleculară asupra formării propionatului de anisil	11
4.1.1.2.4. Screening de temperatură	12
4.1.1.2.5. Scalarea procesului în condițiile optime	13
4.1.1.3. Concluzii	15
4.1.2. Sinteza esterilor de aromă cu lanț scurt într-un sistem fără solvent	15
4.1.2.1. Introducere (date din literatură).....	15
4.1.2.2. Rezultate și discuții	15
4.1.2.2.1. Imobilizarea lipazei prin entrapare în sol-gel	15
4.1.2.2.2. Experimente inițiale	17
4.1.2.2.3. Optimizarea sistemului de reacție	17
4.1.2.2.3.1. Efectul raportului masic alcool: lipază	17
4.1.2.2.3.2. Efectul raportului molar alcool: acid	19
4.1.2.2.3.3. Efectul temperaturii	20

4.1.2.2.4. <i>Sinteza enzimatică a esterilor de aromă naturali într-un sistem fără solvent</i>	22
4.1.2.2.5. <i>Profilul în timp a reacției de esterificare a acidului butiric cu 1-hexanol</i>	24
4.1.2.2.6. <i>Studii de reutilizare</i>	24
4.1.2.2.7. <i>Esterificarea enzimatică a 1-hexanolului cu acid butiric la scală preparativă și evaluarea indicilor de sustenabilitate</i>	26
4.1.2.3. <i>Concluzii</i>	27
4.2. Solvenți eutectici ca și aditivi în încapsularea lipazei B din <i>Candida antarctica</i>	28
4.2.1. Introducere (date din literatură)	28
4.2.2. Rezultate și discuții	28
4.2.2.1. <i>Imobilizarea lipazei prin încapsulare prin metoda sol-gel</i>	28
4.2.2.2. <i>Optimizarea parametrilor de reacție</i>	29
4.2.2.2.1. <i>Screening de solvent</i>	29
4.2.2.2.2. <i>Screening de raport masic substrat: enzimă</i>	30
4.2.2.2.3. <i>Screening raport molar substrat: donor de acil</i>	31
4.2.2.2.4. <i>Screening de temperatură</i>	32
4.2.2.2.5. <i>Screening de donor de acil</i>	33
4.2.2.3. <i>Studii de reutilizare</i>	34
4.2.2.4. <i>Screening de concentrație de substrat în condiții optime</i>	35
4.2.2.5. <i>Efectul sinergic al aditivilor în cazul biocatalizatorului optim</i> ...	36
4.2.2.6. <i>Diversificarea domeniului de substrat al biocatalizatorului optim</i>	38
4.2.3. Concluzii	39
Chapter 5. Materiale și metode (date experimentale)	39
Chapter 6. Concluzii generale	39
Bibliografie	41

Cuvinte cheie: biocataliză, rezoluție cinetică enzimatică, esterificare enzimatică, transesterificare enzimatică, lipază, imobilizare în sol-gel, sinteză fără solvent, chimie verde, separare cromatografică

Capitolul 1. Introducere generală

Biocataliza reprezintă un domeniu de interes în viața științifică din zilele noastre. Consumatorii prezintă din ce în ce mai multe rezervări în ceea ce privește utilizarea produselor obținute prin metode clasice de sinteză chimică, în special produsele utilizate în industriile farmaceutice, alimentare și cosmetice. Metoda de obținere a aromelor alimentare aplicată la scară largă în momentul actual în industrie este extracția din surse naturale, dar această metodă prezintă randamente scăzute de extracție. Pentru a putea rezolva punctele slabe ale celor două metode menționate anterior aplicate la nivel industrial, se observă un interes crescut în metode alternative biocatalitice, după cum reiese din creșterea numărului de publicații științifice pe acest subiect.

Procesele biocatalitice utilizează ca și catalizatori fie enzime izolate fie celule întregi. Aplicarea enzimelor în procese industriale depinde de activitatea catalitică și de selectivitatea acestora și depinde de asemenea de stabilitatea și de gradul de reutilizare a enzimelor. Stabilitatea și gradul de reutilizare al unei enzime influențează în mod direct productivitatea unui proces, deci fezabilitatea economică a unui proces este puternic dependentă de acești doi factori. Pentru a crește stabilitatea și gradul de reciclare al unei enzime eforturi semnificative au fost depuse pentru a găsi metoda optimă de imobilizare. Prin imobilizare activitatea unei enzime poate fi modificată. Pentru a menține stabilitatea unei enzime, niște aditivi pot fi adăugați în etapa de imobilizare.

Esterii cu lanț scurt având structuri alifatică sau aromatică sunt o clasă de compuși utilizați cu precădere ca și compuși de aromă în industria alimentară. Acești compuși pot fi obținuți prin esterificarea directă a unui acid gras cu lanț scurt cu un alcool. Produsul secundar al reacției de esterificare este apa, care poate îndrepta echilibrul reacției înspre regenerarea substratului în cazul în care nu este înlăturată eficient din sistemul de reacție. În vederea înlăturării apei formate în sistem, mai multe metode de uscare pot fi aplicate, cum ar fi utilizarea sitelor moleculare sau aplicarea vidului (dacă procesul este unul lipsit de solvent).

Cei doi enantiomeri ai unui compus chiral pot avea activități biologice diferite când e vorba de industria farmaceutică sau diferite proprietăți organoleptice când vorbim despre industria alimentară. Enzimele pot fi utilizate în diferite procese din care se obțin compuși optic puri prin rezoluții cinetice enzimatică sau rezoluții cinetice dinamice. Selectivitatea unei enzime este un factor extrem de important în acest caz, deoarece enantiopreferința unei enzime influențează puritatea optică a compusului obținut. Un alt aspect important care este demn de menționat este metoda folosită pentru extracția produsului din reacție, care trebuie aleasă cu grijă astfel încât produsul să fie recuperat cu un randament cât mai mare.

Teza de doctorat de față adresează diverse aspecte în ceea ce privește utilizarea CaL-B pentru a obține esteri de aromă cu lanț scurt folosiți ca și aditivi în industria alimentară în sisteme fără solvent și utilizarea DES ca și aditivi în încapsularea CaL-B prin tehnica sol-gel și aplicarea acestora în procese EKR pentru a obține compuși chirali enantiopuri utilizați în industria farmaceutică.

Prima parte a capitolului 4 (Contribuții personale), **Obținerea biocatalitică a compușilor aromatici utilizând lipaza B din *Candida antarctica***, descrie utilizarea a două forme imobilizate a CaL-B, una obținută

prin adsorbție pe o rășină macroporoasă (disponibilă comercial sub denumirea Novozym 435) și a doua obținută prin încapsularea CaL-B-ului într-o matrice sol-gel pentru a obține compuși de aromă cu structuri aromatice și alifatic. Un proces verde și sustenabil utilizat pentru obținerea acestor compuși este descris în aceasta parte a capitolului 4.

A doua parte a capitolului 4, **Solvenți eutectici utilizați ca și aditivi în încapsularea lipazei B din *Candida antarctica***, descrie utilizarea pentru prima dată a solvenților eutectici ca și aditivi în încapsularea CaL-B prin tehnica sol-gel în comparație cu mai des utilizatele lichide ionice. Biocatalizatorii nou obținuți au fost utilizați cu succes în transesterificarea 1-feniletanolului racemic, care este un compus de interes pentru industria farmaceutică.

Capitolul 2. Studiu de literatură (date din literatură)

Capitolul 3. Scopul tezei de doctorat

- formare de biocatalizatori eficienți și robuști obținuți prin entraparea lipazei B din *Candida antarctica* în matrice de siliciu prin metoda sol-gel;

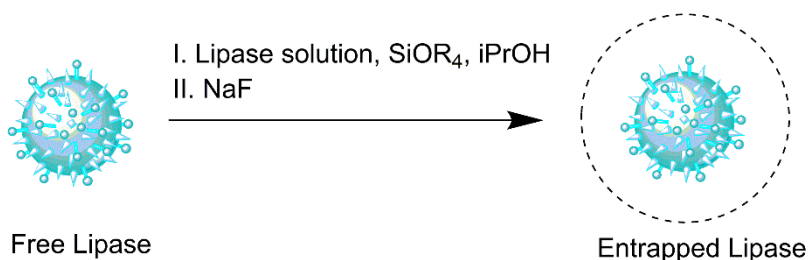


Figura 1. Entraparea unei lipaze prin tehnica sol-gel.

- dezvoltarea unui proces verde și sustenabil pentru sinteza esterilor de aromă atât cu structură aromatică cât și alifatică prin esterificarea directă a diverși alcoolii cu diferiți acizi, având ca și catalizator CaL-B încapsulat în matrice de sol-gel;

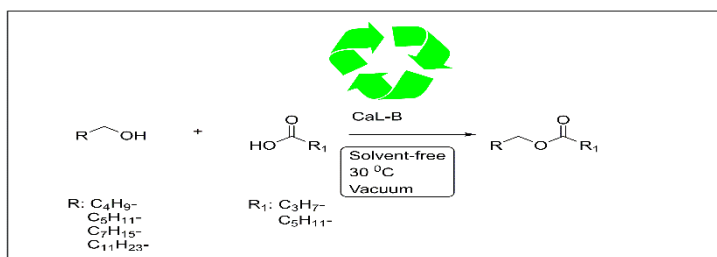


Figura 2. Proces verde pentru sinteza esterilor de aromă cu structură alifatică.

- demonstrarea utilizării eficiente a biocatalizatorilor obținuți prin încapsularea CaL-B prin metoda sol-gel utilizând solvenți eutectici ca și aditivi în timpul procesului de imobilizare în transesterificarea 1-feniletanolului racemic, un compus chiral de interes pentru industria farmaceutică.

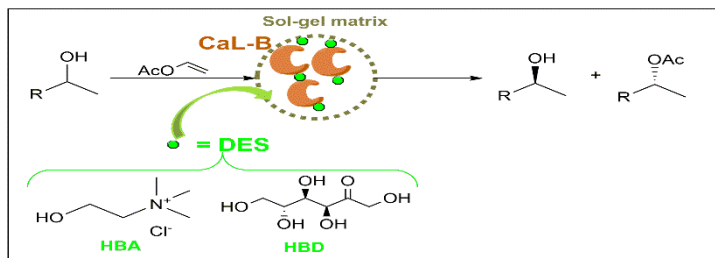


Figure 3. Transesterificarea 1-feniletanolului racemic mediată de CaL-B încapsulată într-o matrice sol-gel utilizând DES ca și aditivi.

Esterii de aromă achirali au fost aleși ca și compuși țintă datorită utilizării acestora ca și arome în industria alimentară. Unii dintre compușii sintetizați sunt de asemenea utilizați ca și esențe în industria cosmetică. Transesterificarea 1-feniletanolului racemic a fost aleasă ca și reacție model pentru testarea biocatalizatorilor nou obținuți datorită faptului că acest compus este unul de mare interes pentru industria farmaceutică, dar și datorită utilizării sale ca esență în industria cosmetică.

Capitolul 4. Contribuție personală

4.1. Obținerea biocatalitică a compușilor aromatici utilizând lipaza B din *Candida antarctica*

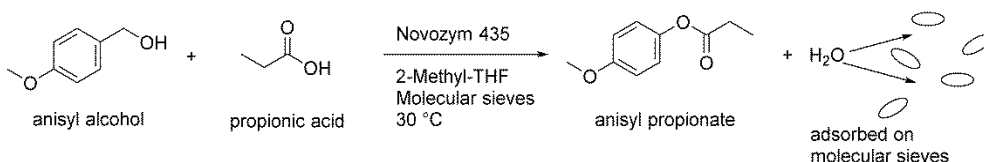
4.1.1. Sinteza enzimatică a propionatului de anisil mediată de lipaza B din *Candida antarctica*

Acest capitol din teză descrie utilizarea unui biocatalizator disponibil comercial (Novozym 435) într-un bioproces pentru sinteza anisil propionatului care este unde agent de aromă și esență utilizat în industriile cosmetice și alimentare.

4.1.1.1. Introducere (date din literatură)

4.1.1.2. Rezultate și discuții

Experimente la scală analitică au fost realizate în vederea optimizării parametrilor pentru reacția de esterificare a alcoolului anisilic cu acid propionic. În urma rezultatelor obținute, experimente suplimentare au fost realizate în vederea maximizării productivității procesului. Pentru a se obține conversia totală a alcoolului anisilic în compusul de interes (propionatul de anisil) echilibrul reacției a trebuit să fie îndreptat înspre formare de produși, iar pentru a realiza asta au fost utilizate site moleculare pentru a înlătura eficient apa formată în sistem, după cum poate fi văzut în **Schema 1**.



Schema 1. Sinteza enzimatică a propionatului de anisil prin esterificarea directă a alcoolului anisilic cu acid propionic în 2-Metil-THF proces mediat de Novozym 435 în prezență de site moleculare.

4.1.1.2.1. *Screening de solvent*

Pentru a găsi solventul optim pentru sinteza propionatului de anisil, cinci solvenți cu polarități diferite au fost testați, descris în **Figura 4**.

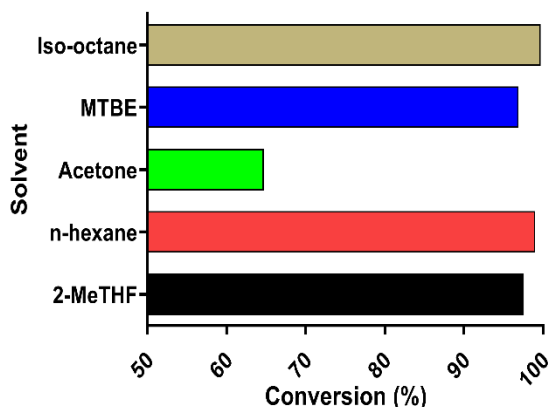


Figura 4. Screening de solvent pentru sinteza propionatului de anisil. Condiții de reacție: 10 mM alcool anisilic, 2 echiv. acid propionic, 25 mg Novozym 435, 1 mL solvent, 50 mg site moleculare, 800 rpm, 30 °C, 12 ore.

Activitate enzimatică ridicată a fost găsită în *n*-hexan și *iso*-octan (peste 98%) precum și în solvenții eterici (MTBE și 2-Metil-THF, ~96%). Când acetona a fost utilizată ca și solvent valoarea conversiei a fost una destul de scăzută (~65%). Luând în considerare clasificarea acestuia ca și solvent verde și faptul că a fost obținută o valoare mare a conversiei când a fost utilizat pentru obținerea propionatului de anisil, 2-Metil-THF a fost ales ca și solvent optim și a fost utilizat pentru optimizările ulterioare.

4.1.1.2.2. *Screening de concentrație de substrat*

Productivitatea unui proces este direct dependentă de concentrația de substrat, iar pentru asta concentrația de substrat a fost variată (10-50 mM) și influența

acesteia asupra valorii conversiei a fost evaluată. Alți parametri ai reacției precum raportul molar alcool: acid (1:2), Novozym 435 (25 mg/mL) și sitele moleculare (50 mg/mL) au fost menținuți constanți.

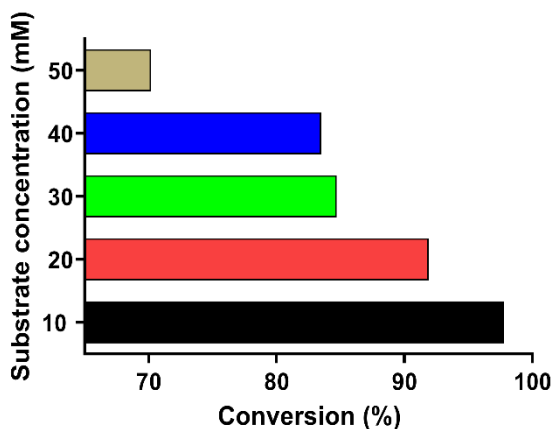


Figura 5. Influența concentrației de alcool anisilic asupra valorii conversiei. Condiții de reacție: diferite concentrații de alcool anisilic (10-50 mM), 2 echiv. acid propionic, 25 mg biocatalizator, 1 mL 2-Metil-THF, 50 mg site moleculare, 800 rpm, 30 °C, 12 ore.

Cum este descris în **Figura 5** creșterea concentrației substratului conduce la o scădere a conversiei, deoarece o conversie de 97.8% a fost observată la o concentrație de alcool anisilic de 10 mM și o valoare a conversiei de doar 70.2% când a fost utilizată o concentrație de substrat de 50 mM. Pornind de la o cantitate mai mare de substrat conduce la formarea unei cantități mai mari de apă și astfel se poate concluziona că scăderea valorii conversiei este datorată cantității insuficiente de site moleculare (50 mg/mL) utilizate în mediul de reacție.

4.1.1.2.3. Influența cantității de sită moleculară asupra formării propionatului de anisil

Influența cantității de sită moleculară asupra formării propionatului de anisil a fost evaluată utilizând o concentrație constantă de 50 mM alcool anisilic și 100 mM acid propionic, după cum este descris în **Figura 6**.

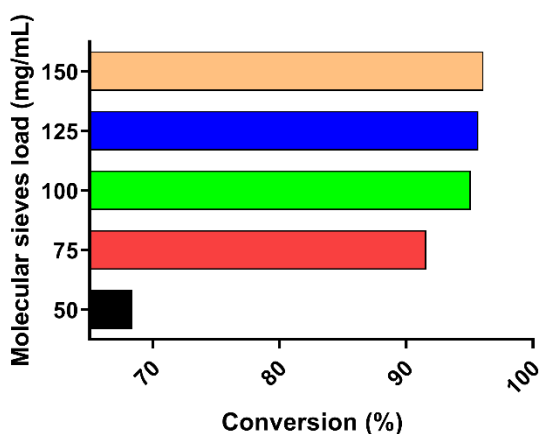


Figura 6. Influența cantității de site moleculare asupra formării propionatului de anisil.
 Condiții de reacție: 1 mL 2-Metil-THF, 50 mM alcool anisilic, 2 echiv. acid propionic, 25 mg Novozym 435, 800 rpm, 30 °C, 12 ore.

Prin adăugarea suplimentară de agent de uscare, valoarea conversiei a fost îmbunătățită semnificativ până la 95.1% când au fost adăugate 100 mg/mL site moleculare de la 68.4% când a fost utilizat doar 50 mg/mL agent de uscare. Adăugarea suplimentară de site moleculare (125 and 150 mg/mL) a îmbunătățit valoarea conversiei cu doar 1%, deci cantitatea optimă de site moleculare a fost aleasă ca fiind 100 mg/mL și a fost utilizată în experimentele ulterioare.

4.1.1.2.4. Screening de temperatură

Cinetica unei reacții este influențată semnificativ de temperatura mediului de reacție. În vederea stabilirii influenței temperaturii asupra activității și stabilității Novozym 435 reacții au fost pregătite utilizând parametri optimi stabiliți anterior, iar acestea au fost incubate la temperaturi diferite (30, 40, 50 și 60 °C), iar probe au fost prelevate din 2 în 2 ore.

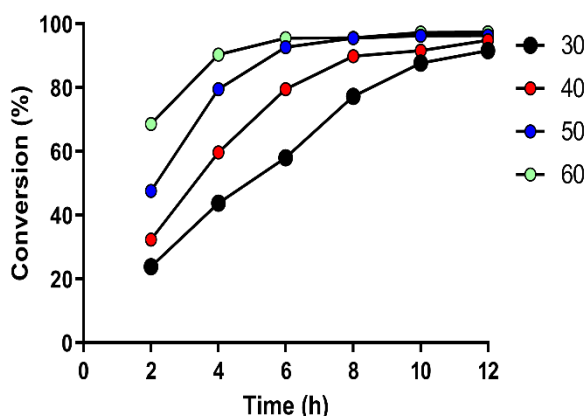


Figura 7. Evoluția în timp a valorii conversiei pentru reacția de formare a propionatului de anisil. Condiții de reacție: 50 mM alcool anisilic, 2 echiv. acid propionic, 1 mL 2-Metil-THF, 25 mg Novozym 435, 100 mg site moleculare, 800 rpm.

Novozym 435 s-a dovedit a fi un biocatalizator activ și stabil chiar și la 60 °C. După cum se poate vedea în **Figura 7**, la 60 °C conversia reacției a atins un maxim de ~96% după doar 6 ore, ceea ce reprezintă jumătate din timpul necesar atingerii acestei valori a conversiei la 30 °C. În consecință, temperatura optimă care a fost utilizată la experimentele de scalare a fost aleasă ca fiind 60 °C, deoarece un timp mai scurt de reacție este necesar atingerii transformării aproape în totalitate a substratului.

4.1.1.2.5. Scalarea procesului în condițiile optime

După ce optimizarea parametrilor de reacție a fost realizată la scală analitică, pasul următor în acest studiu a fost scalarea procesului. Utilizând parametrii optimi de reacție (25 mg/mL biocatalizator, 100 mg/mL site moleculare, 2 echiv. exces de acid propionic, 6 ore timp de reacție și 2-Metil-THF ca solvent) în vederea îmbunătățirii productivității procesului concentrația de substrat (alcool anisilic) a fost crescută cu câte 10 unități în domeniul 60-100 mM. Rezultatele obținute au fost încurajatoare, deoarece până la o concentrație de alcool anisilic de 100 mM performanța procesului propus a rămas

neschimbată, valoarea conversiei crescând de la 88% la o concentrație de substrat de 60 mM la 95% la o concentrație de 100 mM alcool anisilic, experimente ulterioare au fost efectuate la concentrații mult mai mari de substrat (200, 300, 500 and 1000 mM), după cum este prezentat în **Figura 8**.

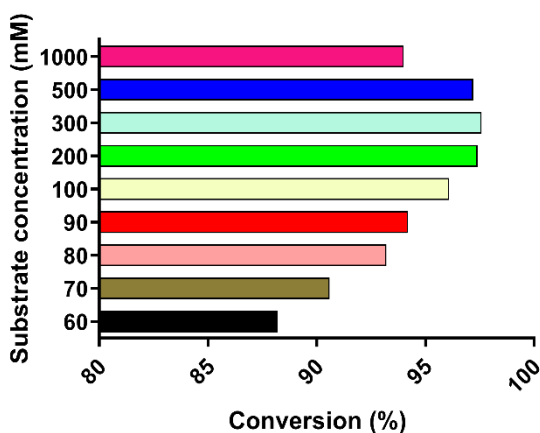


Figura 8. Scalare procesului de obținere a propionatului de anisil. Condiții de reacție: 60-1000 mM alcool anisilic, 2 echiv. acid propionic, 1 mL 2-Metil-THF, 25 mg Novozym 435, 100 mg site moleculare, 800 rpm, 60 °C, 6 ore.

Rezultatele exprimate grafic în **Figura 8** pot fi explicate prin dependența vitezei de reacție asupra concentrației materiilor prime și în același timp, pe baza rezultatelor obținute se poate spune că nu apar inhibiții de substrat sau produs în procesul dezvoltat. O valoare excelentă a conversiei a fost observată la o concentrație de substrat de 1000 mM deoarece după doar 6 ore 95% din cantitatea inițială de substrat a fost transformată. Reacția care a pornit dintr-o concentrație de alcool anisilic de 1000 mM a fost prelucrată, iar produsul (propionatul de anisil) a fost izolat. După purificare, propionatul de anisil a fost obținut cu un randament de 92% iar structura acestuia a fost confirmată prin spectroscopie RMN (^1H -RMN and ^{13}C -RMN).

4.1.1.3. Concluzii

Propionatul de anisil a fost sintetizat cu succes prin esterificarea directă a alcoolului anisilic cu acid propionic într-un solvent verde (2-Metil-THF) reacție mediată de Novozym 435 utilizând site moleculare pentru îndepărtarea eficientă a apei formate. După optimizarea procesului, propionatul de anisil a fost izolat cu un randament de 92% pornind de la o concentrație de substrat de 1000 mM. Luând în considerare aceste aspecte, procesul dezvoltat poate fi considerat un candidat pentru o potențială scalare industrială.

4.1.2. Sinteza esterilor de aromă cu lanț scurt într-un sistem fără solvent

În această secțiune a tezei de doctorat o procedură fără solvent a fost dezvoltată în vederea sintezei eficiente a esterilor cu lanț scurt prin esterificare directă mediată de CaL-B încapsulată în matrice de sol-gel.

4.1.2.1. Introducere (date din literatură)

4.1.2.2. Rezultate și discuții

4.1.2.2.1. Imobilizarea lipazei prin entrapare în sol-gel

Lista lungă de precursori silanici disponibili face ca încapsularea enzimelor prin tehnica sol-gel să fie o metodă de imobilizare extrem de versatilă care permite controlul eficient al porozității și hidrofobicității/ hidrofilicității matricei. În plus, în timpul etapei de gelifiere se pot adăuga aditivi care pot modifica stabilitatea enzimei (prin oferirea unui strat protector) și activitatea (prin modificarea conformației biomolecului). În acest studiu un nou suport pe bază de silice a fost dezvoltat prin amestecarea unui alcoxi-silan conținând grupări funcționale etoxi (OTEOS) cu doi alcoxi-silani care conțin gruări metoxi (*n*-PTMOS și TMOS). Niște aditivi au fost adăugați în timpul procesului de imobilizare și activitatea sintetică a noilor biocatalizatori a fost evaluată precum și activitatea recuperată, rezultatele fiind tabelate în **Tabelul 1**.

Tabel 1. Biocatalizatori obținuți prin utilizarea unui amestec ternar de OTEOS: *n*-PTMOS: TMOS în raport molar de 1.6:0.4:1.

Entry	Sol-gel code	Additive ^a	Enzyme load [$\mu\text{g}_{\text{enzyme}}/\text{mg}_{\text{biocatalyst}}$] ^b	Synthetic activity [$\text{mmol}/\text{min} \cdot \text{g}_{\text{enzyme}}$]	Recovered activity [%] ^c
1	SG-1	β -cyclodextrin	6	13.89 \pm 0.01	100.12
2	SG-2	PVA	7.6	15.28 \pm 0.12	110.04
3	SG-3	Glycerol	7.7	10.63 \pm 0.06	76.72
4	SG-4	-	8.4	13.77 \pm 0.07	69.16

^a200 μL soluție apoasă de 4%; ^bÎncărcarea enzimatică a fost determinată prin raportarea cantității de lipază din biocatalizator (cantitatea inițială de enzimă care a fost încapsulată deoarece nu au fost detectate urme de enzimă neimobilizată în apele de spălare) la cantitatea totală de biocatalizator obținut; ^cActivitatea recuperată a fost calculată prin raportarea activității sintetice a fiecărui biocatalizator la activitatea sintetică a soluției inițiale de lipază¹.

Cei trei aditivi utilizați în cadrul acestui studiu au fost aleși pe baza structurii lor, deoarece grupările hidroxil sunt capabile să modifice situsul catalitic al enzimei prin înlocuirea unor molecule de apă care sunt mai mici în comparație cu compușii polihidroxilici selectați, prin urmare modificând activitatea enzimei. Activitatea sintetică a noilor biocatalizatori a fost evaluată în comparație cu activitatea sintetică a soluției inițiale de lipază (care a fost supusă încapsulării prin tehnica sol-gel, 13.77 $\text{mmol}/\text{min} \cdot \text{g}_{\text{enzimă}}$). După cum se poate observa în **Tabelul 1** SG-4 a fost preparat fără adăugarea suplimentară a vreunui aditiv și a fost observată o activitate recuperată de doar 69.16% care înseamnă că o pierdere a activității enzimatică a survenit datorită imobilizării, o scădere a activității ce poate fi observată și în cazul SG-3 la utilizarea glicerolului ca și aditiv (76.72% activitate reziduală, rândul 3). La utilizarea PVA ca și aditiv (SG-2, rândul 2) activitatea reziduală de 110.04% arată o creștere a activității enzimatică prin imobilizare, deci se poate spune că PVA adăugat în timpul procesului de imobilizare ajută enzima să adopte o

conformație mai activă. La utilizarea β -ciclodextrinei ca și aditiv (SG-1, rândul 1) activitatea sintetică a enzimei rămâne neschimbată după procesul de imobilizare.

4.1.2.2.2. Experimente inițiale

Reacția model aleasă pentru acest studiu a fost esterificarea directă a acidului butiric cu 1-hexanol într-un sistem lipsit de solvent. Rezultatele preliminare au fost destul de modeste deoarece după 4 ore de reacție o conversie mică în butiratul de hexil a fost obținută la utilizarea celor 3 noi biocatalizatori (20.9% în cazul SG-1, 18.2% în cazul SG-2 și 21.3% în cazul SG-3). O formă disponibilă comercial a CaL-B-ului (Novozym 435) a fost de asemenea testată pe același substrat în condiții similare de reacție și butiratul de hexil a fost obținut cu o conversie de 91.2%. În vederea îmbunătățirii valorii conversiei în esterul de interes sistemul de reacție a fost optimizat prin alterarea a 3 factori cu influență majoră asupra bioprocesului: raportul masic alcool: lipază, raportul molar alcool: acid și temperatura.

4.1.2.2.3. Optimizarea sistemului de reacție

4.1.2.2.3.1. Efectul raportului masic alcool: lipază

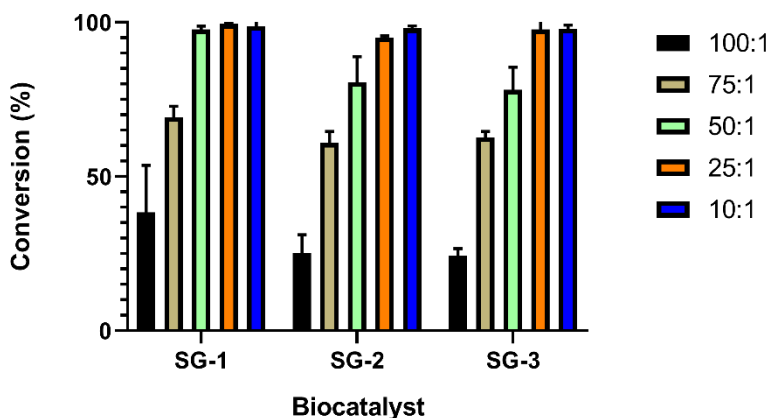


Figura 9. Influența raportului masic alcool: lipază asupra valorii conversiei. Condiții de reacție: 0.2 mmol hexan-1-ol, 4 echiv. acid butiric, raporturi masice alcool: lipază de 100:1, 75:1, 50:1, 25:1 și 10:1, 50 °C, vid de 20 mbar, 4 ore.

După așteptări, raportul alcool: lipază are o influență majoră asupra formării butiratului de hexil deoarece odată cu scăderea raportului (implicit creșterea cantității de enzimă) valoarea conversiei a crescut. Deși raportul alcool: lipază de 50:1 oferă rezultate excelente în cazul reacției mediate de SG-1 valoarea optimă a raportului a fost aleasă ca fiind de 25:1, deoarece conversii crescute au fost obținute în cazul tuturor celor trei noi biocatalizatori (>94%). Sustenabilitatea procesului a fost de asemenea luată în discuție deoarece raportul alcool: lipază de 10:1 nu a îmbunătățit semnificativ valoarea conversiei, deci o utilizarea unei cantități atât de mari de biocatalizatori nu ar fi justificată.

4.1.2.2.3.2. Efectul raportului molar alcool: acid

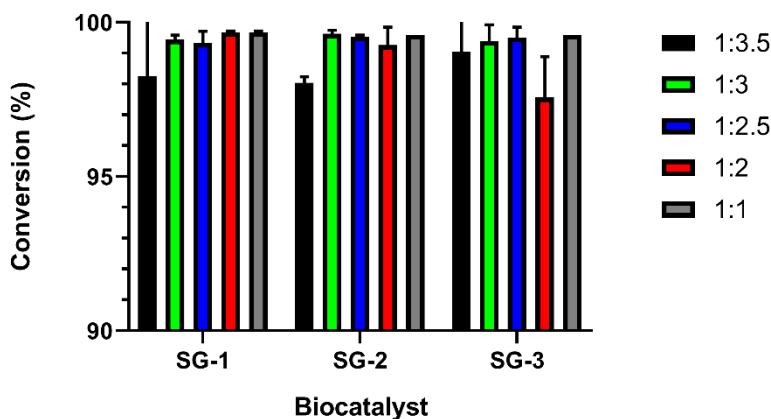


Figura 10. Influența raportului molar alcool: acid asupra valorii conversiei. Condiții de reacție: rapoarte molare alcool: acid de 1:3.5, 1:3, 1:2.5, 1:2, 1:1, raport masic alcool: lipază de 25:1, 50 °C, vid de 20 mbari, 4 ore.

Un parametru de reacție extrem de important este raportul reactanților, o valoare optimă pentru acest parametru fiind undeva aproape de stoichiometric. Pentru asta, raportul alcool: acid a fost scăzut gradual prin creșterea cantității inițiale de alcool iar pentru menținerea raportului masic alcool: lipază de 25:1 cantitatea de enzimă adăugată a fost crescută corespunzător. După cum se poate vedea în **Figura 10**, prin scăderea raportului molar alcool: acid o ușoară creștere a valorii conversiei a fost observată pentru SG-1 and SG-2, în timp ce o ușoară scădere a valorii conversiei (~2%) a fost observată în cazul SG-3 pentru un raport molar alcool: acid de 1:2. Pentru alegerea valorii ideale a unui parametru de reacție toate aspectele ar trebui să fie luate în calcul, în acest caz un aspect important ar fi posibilitatea de recuperare și reutilizare a compușilor nereacționați (în cazul de față acidul butiric). Acidul netransformat poate fi tratat cu o bază și recuperat sub formă de sare (mai facil de izolat din mediul de reacție), iar mai apoi poate fi reutilizat într-o nouă șarjă, ceea ce ar fi extrem de important

pentru ca un proces nou dezvoltat să fie considerat un proces verde și sustenabil. Un alt aspect important ar fi prețul reactanților. Pentru alegerea corectă a valorii optime pentru raportul molar alcool: acid s-a trasat evoluția în timp a unor reacții catalizate de cei trei noi biocatalizatori utilizând rapoarte molare alcool: acid de 1:2 și 1:1.

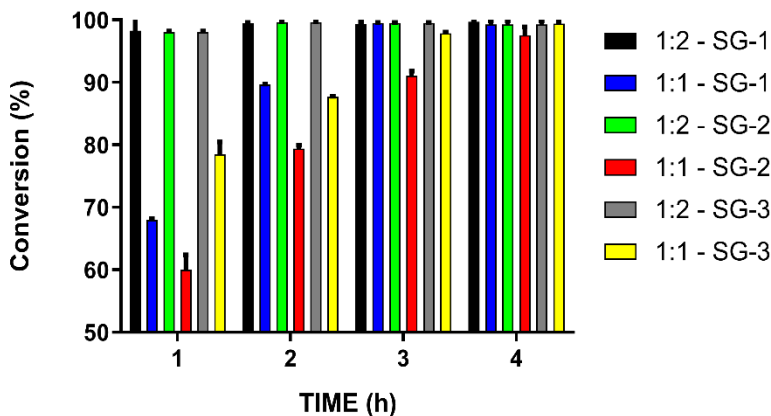


Figura 11. Influența raportului molar alcool: acid asupra vitezei inițiale de reacție. Condiții de reacție: rapoarte molare alcool: acid de 1:2, 1:1, raport masic alcool: lipază de 25:1, 50 °C, vid de 20 mbari, 1, 2, 3 și 4 ore.

O analiză mai în detaliu asupra influenței raportului molar alcool: acid în formarea butiratului de hexil a relevat faptul că în cazul utilizării unui raport molar de 1:2 conversia maximă este atinsă după o oră de reacție în cazul celor trei biocatalizatori. Pe de altă parte, în cazul utilizării unui raport echimolar conversia maximă este atinsă după 3 ore (în cazul SG-1 și SG-3) sau 4 ore (în cazul SG-2). În consecință, optimizarea procesului a fost continuată utilizând un raport molar optim alcool: acid de 1:2 deoarece se obțin conversii excelente (>95%) în cazul celor trei noi biocatalizatori.

4.1.2.3.3. Efectul temperaturii

Pentru a putea evalua influența temperaturii mediului de reacție asupra valorii conversiei, reacții similare au fost perfectate la diferite temperaturi (30, 40, 50

°C) utilizând condițiile optime de reacție determinate anterior obținând valori similare ale conversiei (>98.5%) pentru toți biocatalizatorii la toate temperaturile. O analiză mai în detaliu a valorii conversiei la diferite momente în timp a relevat faptul că valori identice ale conversiei au fost observate în cazul noilor biocatalizatori la diferite temperaturi (~93% după 1 oră, ~95% după 2 ore și ~98% după 3) demonstrând faptul că temperatura mediului de reacție nu prezintă o influență semnificativă asupra procesului. Deoarece randamentul procesului de esterificare a crescut puțin odată cu creșterea temperaturii se poate spune că procesul dezvoltat este un proces endotermic și controlat termodinamic². Luând în considerare faptul că atunci când temperatura mediului de reacție a fost 30 °C valori excelente ale conversiei au fost obținute, acest fapt ar putea încuraja o scădere mai amplă a temperaturii, dar niște aspecte ar trebui fi luate în considerare. Eficiența cu care este îndepărtată apa din mediul de reacție este influențată în mod direct de temperatură. Prin utilizarea aceleași valori ale vidului aplicat la o temperatură mai joasă, eficiența îndepărtării apei formate scade, iar ca și consecință echilibrul reacției s-ar deplasa înspre regenerarea substratului. Pe de altă parte, dacă temperatura mediului de reacție ar fi fost scăzută, iar concomitent vidul aplicat ar fi fost crescut atunci ar fi crescut riscul ca reactanții sau produsul de interes să fie distilați conducând la obținerea unor rezultate eronate, valoarea vidului aplicat fiind aleasă cu grijă de la începutul studiului ca un compromis între îndepărtarea eficientă a apei formate în același timp evitând distilarea reactanților sau a produșilor. Într-un proces verde și sustenabil consumul de energie ar trebui să fie menținut la o valoare minimă, iar ca rezultat, temperatura optimă a mediului de reacție a fost aleasă ca fiind 30 °C.

4.1.2.2.4. Sinteza enzimatică a esterilor de aromă naturali într-un sistem fără solvent

Diverși alcooli primari cu lanț scurt (1-pentanol, 1-hexanol, 1-octanol, 1-dodecanol) au fost utilizați în reacții de esterificare a acizilor naturali (acid butiric sau hexanoic) pentru a putea evalua aplicabilitatea noilor biocatalizatori în condițiile de reacție ideale determinate anterior (**Tabelul 2**).

Tabel 2. Valorile conversiei pentru reacții de esterificare catalizate de cei trei noi biocatalizatori în condiții optime.

Entry	Biocatalyst	Alcohol	Acid	Product	Conversion [%]
1	SG-1	1-Pentanol	Butyric	Pentyl butyrate	98.0 ± 3.4
2		1-Octanol		Octyl butyrate	99.3 ± 0.4
3		1-Dodecanol		Dodecyl butyrate	99.6 ± 0.2
4		1-Pentanol	Hexanoic	Pentyl hexanoate	99.9 ± 0.0
5		1-Hexanol		Hexyl hexanoate	99.8 ± 0.2
6		1-Octanol		Octyl hexanoate	99.9 ± 0.0
7	SG-2	1-Pentanol	Butyric	Pentyl butyrate	99.8 ± 0.2
8		1-Octanol		Octyl butyrate	99.3 ± 0.1
9		1-Dodecanol		Dodecyl butyrate	99.6 ± 0.2
10		1-Pentanol	Hexanoic	Pentyl hexanoate	99.9 ± 0.0
11		1-Hexanol		Hexyl hexanoate	98.9 ± 0.1
12		1-Octanol		Octyl hexanoate	99.5 ± 0.2
13	SG-3	1-Pentanol	Butyric	Pentyl butyrate	99.2 ± 1.0
14		1-Octanol		Octyl butyrate	99.2 ± 0.3
15		1-Dodecanol	Butyric	Dodecyl butyrate	99.5 ± 0.2
16	SG-3	1-Pentanol	Hexanoic	Pentyl hexanoate	99.9 ± 0.1
17		1-Hexanol		Hexyl hexanoate	99.7 ± 0.1
18		1-Octanol		Octyl hexanoate	99.7 ± 0.1

* Condiții de reacție: raport masic alcool: lipază de 25:1; raport molar alcool: acid de 1:2; temperatura mediului de reacție de 30 °C; vid de 20 mbari; 4 ore timp de reacție.

Rezultatele excelente care au fost obținute recomandă procesul enzimatic dezvoltat la scalare la nivel industrial ca o alternativă a metodei clasice de

izolare a esterilor de aromă alifatici cu lanț scurt din surse naturale. Punctele forte ale acestei metodologii sunt: conversie mare în produs în timp scurt de reacție, izolarea facilă a produsului și consum redus de energie.

4.1.2.2.5. Profilul în timp a reacției de esterificare a acidului butiric cu 1-hexanol

Pentru a putea determina timpul ideal de reacție în vederea efectuării studiului de reutilizare a celor trei noi biocatalizatori, reacția de esterificare dintre acid butiric și 1-hexanol a fost urmărită în timp.

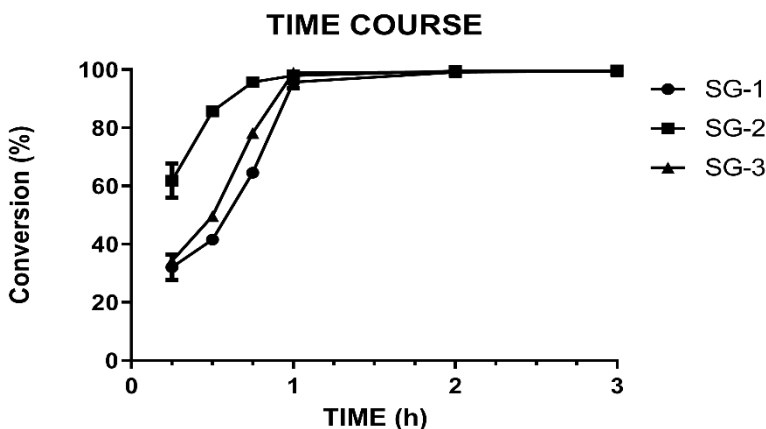


Figura 12. Profilul în timp a reacției de esterificare dintre acid butiric și 1-hexanol mediată de SG-1, SG-2 și SG-3. Condiții de reacție: 0.4 mmol 1-hexanol, 2 echiv. acid butiric, 1.6 mg lipază, 30 °C, vid de 20 mbari.

După cum se poate observa în **Figura 12** valori excelente ale conversiei au fost obținute în cazul celor trei biocatalizatori după 1 oră de reacție (>98%), în consecință timpul de reacție pentru studiul de reutilizare a fost ales ca fiind 1 oră.

4.1.2.2.6. Studii de reutilizare

Gradul de reutilizare a unui biocatalizator este un aspect important al biocatalizei aplicate deoarece acesta influențează în mod direct costurile de producție. Gradul de reciclabilitate a celor trei noi biocatalizatori a fost

evaluată comparativ cu cel al unui biocatalizator disponibil comercial (Novozym 435) în reacția dintre acid butiric și 1-hexanol. După cum este prezentat în **Figura 13**, toți cei trei noi biocatalizatori prezintă o stabilitate operațională ridicată, deoarece chiar și după opt cicluri de reacție activitatea enzimatică a rămas intactă în cazul SG-2 și SG-3 în timp ce o ușoară scădere în activitate poate fi observată în cazul SG-1 care poate fi datorată degradării β -ciclodextrinei datorită condițiilor ușor acide (valori ale pH-ului cuprinse între 4.5-6)³.

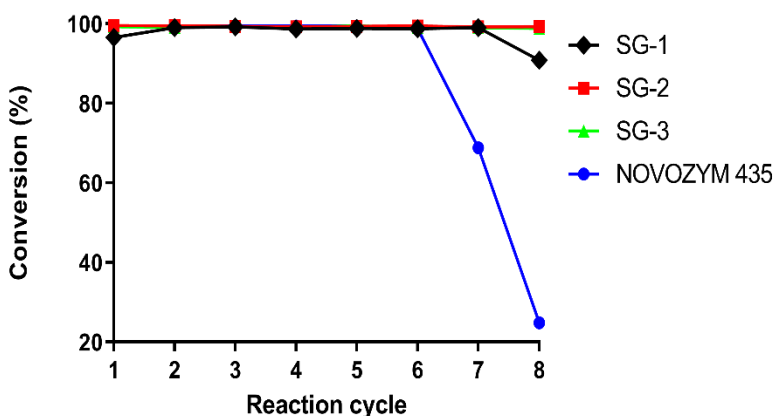


Figura 13. Studiul gradului de reutilizare a celor trei noi biocatalizatori în comparație cu Novozym 435 în reacția de esterificare a acidului butiric cu 1-hexanol. Condiții de reacție: 0.4 mmol 1-hexanol, 2 echiv. acid butiric, 1.6 mg lipază, 30 °C, vid de 20 mbari, 1 oră.

Novozym 435 a arătat o scădere bruscă a activității după al șaselea ciclu de reacție, pierzând 25% din activitatea inițială după al șaptelea ciclu de reacție și aproape toată activitatea inițială după al optulea ciclu de reacție. Cea mai probabilă cauză pentru această scădere a activității o reprezintă sonicările repetate (în vederea spălării biocatalizatorului între ciclurile de reacție) afectând în acest mod rășina. Un alt motiv pentru scăderea bruscă a activității ar putea fi hidrofilicitatea rășinii care ar putea conduce la acumularea unui strat de molecule de apă pe suprafața suportului.⁴ Pe baza rezultatelor obținute în

studiul de reciclabilitate se poate spune că biocatalizatorii SG-2 and SG-3 sunt biocatalizatori robuști care își mențin 100% din activitatea inițială chiar și după 8 cicluri de reacție, aspect care îi recomandă pentru o potențială scalare la nivel industrial.

4.1.2.2.7. Esterificarea enzimatică a 1-hexanolului cu acid butiric la scală preparativă și evaluarea indicilor de sustenabilitate

Condițiile optime de reacție determinate anterior cu ajutorul unor reacții la scală analitică au fost aplicate cu succes în două esterificări directe la scală preparativă a 1 g de 1-hexanol (9.8 mmol) cu acid butiric sau hexanoic. Reacțiile la scală preparativă au fost utilizate pentru evaluarea indicilor de sustenabilitate pentru cele două procese. În termeni de economie de atomi, ambele reacții prezintă valori similare pentru acest indice, după cum se poate vedea în **Tabelul 3**, dar o mică diferență poate fi observată în valoarea eficienței atomice; o valoare mai mare a acestui indice apărând în cazul hexanoatului de hexil deoarece acesta a fost obținut cu un randament mai mare (98.5% în hexanoat de hexil în comparație cu 97.6% butirat de hexil). Procesul care urmărește obținerea hexanoatului de hexil generează mai puține deșeuri/kg de produs, prin urmare, valoarea factorului E este puțin mai scăzută în comparație cu valoarea factorului pentru procesul de obținere a butiratului de hexil. Pe de altă parte, valorile factorului E sunt destul de mari pentru ambele procese și se datorează îndepărtării acizilor nereacționați cu carbonat de sodiu. Mergând mai departe, utilizarea carbonatului de sodiu pentru neutralizarea acizilor și utilizarea acizilor în exces de 2 echivalenți se reflectă în valori crescute ale indicelui de intensificare a masei (18.58 kg/kg respectiv 16.07 kg/kg), procesul de obținere a hexanoatului de hexil având o valoare a acestui indice mai aproape de valoarea ideală (1 kg/kg). Valorile pentru indicele de eficiență a masei de reacție sunt extrem de similare pentru ambele cazuri datorită utilizării acidului în exces de 2 echivalenți. Pe baza rezultatelor

obținute se poate spune că, în termeni de sustenabilitate, metoda enzimatică nou dezvoltată pentru sinteza butiratului de hexil cât și a hexanoatului de hexil într-un sistem lipsit de solvent este superioară celei raportate anterior care este o metodă de sinteză în mediu apos a acetatului de cinamil⁵, care este de asemenea un ester de aromă cu lanț scurt.

Table 3. Indicii de sustenabilitate pentru sinteza enzimatică a butiratului de hexil și hexanoatului de hexil în comparație cu sinteza în mediu apos a acetatului de cinamil.

Sustainability metric	Product		
	Hexyl butyrate ^a	Hexyl hexanoate ^b	Cinnamyl acetate ^c
E-factor	17.22	14.77	48.07
Atom Economy (AE)	90.53	91.76	79.27
Atom Efficiency	88.36	90.38	73.72
Mass intensity	18.58	16.07	35.48
Reaction mass efficiency	60.07	58.84	34.17

^aEsterificarea enzimatică a acidului butiric cu 1-hexanol într-un sistem fără solvent;

^bEsterificarea enzimatică a acidului hexanoic cu 1-hexanol într-un sistem fără solvent;

^cTransesterificarea enzimatică a alcoolului cinamic cu acetat de etil în mediu apos (tampon fosfat)⁵.

4.1.2.3. Concluzii

Șapte esteri de aromă naturali cu lanț scurt au fost preparați cu succes printr-o metodă nouă enzimatică, o esterificare directă într-un mediu lipsit de solvent, reacție catalizată de trei noi biocatalizatori conținând lipaza B din *Candida antarctica* inclusă într-o matrice de sol-gel care s-au dovedit a fi biocatalizatori extrem de activi și robuști. Conform Regulamentului No. 1334/2008 a Parlamentului și Consiliului European compușii de aromă obținuți prin această metodă pot fi clasificați ca și “naturali” deoarece aceștia sunt obținuți din substraturi de origine naturală și procesul utilizează o enzimă ca și catalizator. Superioritatea metodei nou dezvoltate este susținută de evaluarea indicilor de

sustenabilitate în comparație cu o altă metodă descrisă recent în literatura de specialitate. Pentru a concluziona, pe baza conversiilor excelente în produs, timp scurt de reacție, înlăturarea eficientă a apei formate și izolarea facilă a produsului, această metodă poate fi clasificată ca o metodă verde și sustenabilă, materiile prime fiind disponibile din resurse regenerabile.

4.2. Solvenți eutectici ca și aditivi în încapsularea lipazei B din *Candida antarctica*

4.2.1. Introducere (date din literatură)

4.2.2. Rezultate și discuții

4.2.2.1. Imobilizarea lipazei prin încapsulare prin metoda sol-gel

Șapte biocatalizatori au fost preparați: unul în lipsa vreunui aditiv, doi utilizând lichide ionice ca și aditivi și patru biocatalizatori utilizând solvenți eutectici la încapsularea CaL-B prin tehnica sol-gel. Când discutăm de încărcare enzimatică, cel mai bun rezultat a fost obținut pentru SG-6 (**Tabelul 4**, rândul 2), dar în termeni de activități sintetice și hidrolitice, cele mai bune rezultate au fost obținute în cazul SG-10 and SG-11 care au fost preparați prin adăugare de lichide ionice (1-metil-3-octil-imidazolium-tetrafluoroborat-OMIMBF₄ respectiv 1-etil-3-metilimidazolium clorid- EMIC). SG-7, SG-8 și SG-9 au arătat rezultate promițătoare (**Tabelul 4**, rândurile 3-5). Deoarece scopul acestui studiu a fost oferirea de alternative în termeni de aditivi la imobilizarea prin sol-gel la lichidele ionice, experimente de optimizare au fost efectuate pentru toți biocatalizatorii preparați, utilizând ca și reacție model acilarea 1-feniletanolului racemic.

Tabel 4. Biocatalizatorii preparați utilizând un amestec ternar de precursori silanici OTEOS/*n*-PTMOS/TMOS. Aditivii utilizați, încărcările enzimatică și activitățile hidrolitice și sintetice sunt prezentate.

Sol-gel code	Additive	Enzyme loading [$\mu\text{g}_{\text{enzyme}}/\text{mg biocatalyst}$]	Hydrolytic activity [U]	Synthetic activity [$\text{mmol}/\text{min}/\text{g}_{\text{enzyme}}$]
SG-5	-	11.3 ± 2.1	2.76 ± 0.04	11.72 ± 0.07
SG-6	ChCl:Fructose 1:1 20% H ₂ O	16.0 ± 1.7	5.10 ± 0.07	13.06 ± 0.12
SG-7	ChCl:Fructose 1:1 30% H ₂ O	12.3 ± 0.7	6.49 ± 0.05	14.42 ± 0.15
SG-8	ChCl:Glycerol 1:2	15.1 ± 1.1	5.66 ± 0.09	13.34 ± 0.02
SG-9	ChCl:Acetic acid 1:2	7.1 ± 0.3	1.23 ± 0.11	13.26 ± 0.08
SG-10	OMIMBF ₄	12.3 ± 1.3	6.29 ± 0.08	14.62 ± 0.12
SG-11	EMIC	8.4 ± 0.5	9.42 ± 0.14	15.84 ± 0.17

4.2.2.2. Optimizarea parametrilor de reacție

4.2.2.2.1. Screening de solvent

Patru solvenți cu polarități diferite (*n*-hexan, MTBE, DIPE și 2-Metil-THF) au fost testați în vederea găsirii solventului optim pentru reacția de acilare a 1-feniletanolului racemic (**Figura 14**). Solvenții au fost aleși pe baza volatilității lor ridicate, punctele de fierbere joase și de asemenea, pe baza solubilității reactanților (1-feniletanol și acetat de vinil) în acești solvenți. Importanța utilizării unui aditiv adecvat în timpul încapsulării este dovedită în acest studiu deoarece valori mici ale conversiei (sub 20%) au fost obținute pentru SG-5 și SG-8 în *n*-hexan (SG-5 a fost preparat în lipsa vreunui aditiv, iar SG-8 conține un solvent eutectic format prin amestecarea clorurii de colină cu glicerol care poate afecta activitatea enzimei în solvenți organici), iar pe de altă parte în

cazul celorlalți biocatalizatori rezultate excelente au fost obținute (valori ale conversiei de peste 40%). Valori bune ale conversiei au fost obținute de asemenea în cazul reacțiilor în care MTBE și DIPE au fost utilizați ca solvenți, în timp ce activitatea enzimatică a lipsit aproape în totalitate în cazul utilizării 2-Metil-THF ca solvent. Pe baza rezultatelor obținute, *n*-hexan a fost ales ca solvent optim, iar SG-5 și SG-8 au fost abandonate.

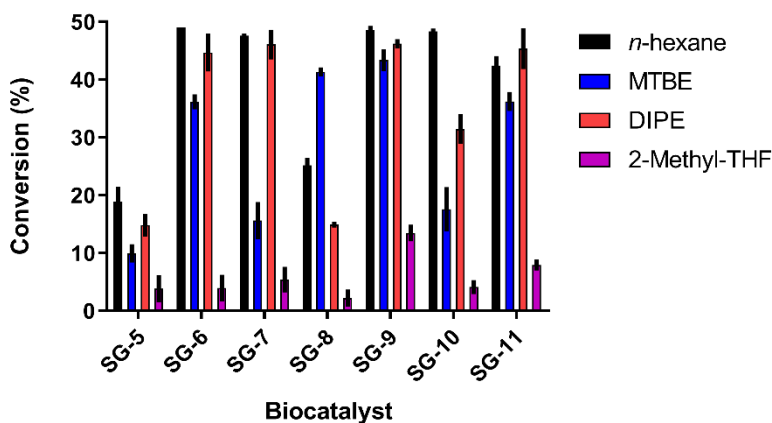


Figura 14. Screening de solvent pentru transesterificarea 1-feniletanolului racemic. Condiții de reacție: vas de sticlă de 1.5 mL, 8 μmol 1-feniletanol racemic, 2 echiv. acetat de vinil, 25 μg lipază, 500 μL solvent, 3 ore, 40 °C, 1000 rpm.

4.2.2.2.2. Screening de raport masic substrat: enzimă

Următorul pas în optimizarea procesului a fost evaluarea influenței raportului masic substrat: enzimă. Încărcarea enzimatică a unui proces este un parametru extrem de important, deoarece o încărcare enzimatică ridicată conduce la prezența unui număr mai ridicat de molecule de enzimă capabile să transforme substratul și influențează în mod direct valoarea conversiei procesului. După cum se poate vedea în **Figura 15**, cea mai mare valoare a conversiei a fost observată la utilizarea unui raport masic substrat: enzimă de 20:1, în timp ce valoarea minimă a conversiei a fost obținută la utilizarea unui raport masic

substrat: enzimă de 100:1, deci raportul masic optim substrat: enzimă a fost ales ca fiind 20:1.

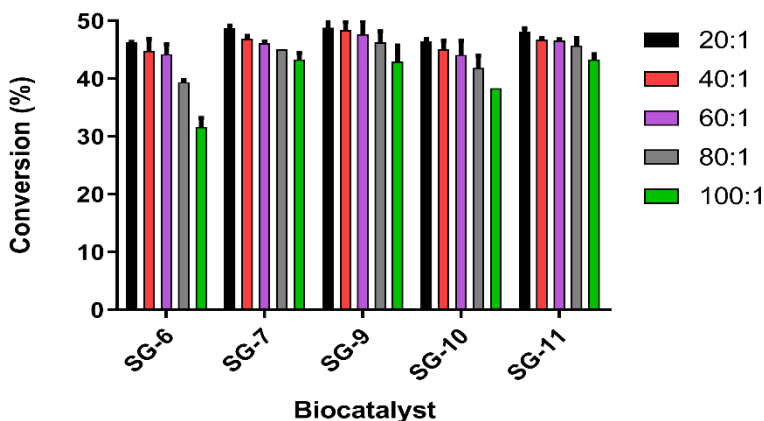


Figura 15. Screening-ul raportului masic substrat: enzimă. Condiții de reacție: vas de sticlă de 1.5 mL, 16 μmol 1-feniletanol racemic, 2 echiv. acetat de vinil, 1 mL *n*-hexan, 40 °C, 1000 rpm, 3 ore.

4.2.2.2.3. Screening raport molar substrat: donor de acil

Raportul molar substrat: donor de acil este un parametru important a unui bioproces care poate influența semnificativ viteza unei reacții. În vederea evaluării influenței acestui parametru asupra transformării 1-feniletanolului 4 raporturi molare au fost testate (1:1, 1:2, 1:3 și 1:4, reprezentate grafic în **Figura 16**).

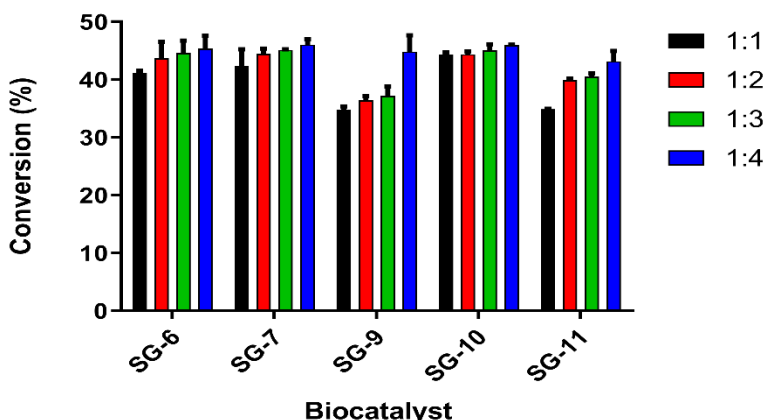


Figura 16. Influența diferitelor rapoarte molare substrat: donor de acil asupra transesterificării 1-feniletanolului racemic. Condiții de reacție: vas de sticlă de 1.5 mL, 16 μ mol 1-feniletanol racemic, 1 mL *n*-hexan, 100 μ g lipază, 40 °C, 1000 rpm, 3 ore.

Cele mai bune rezultate au fost obținute la utilizarea unui raport molar substrat: donor de acil de 1:2 (~40 % conversie), iar o creștere a excesului de donor de acil (până la 4 echiv.) nu a condus la o îmbunătățire a valorilor conversiei pentru reacțiile mediate de SG-7 și SG-10, care au fost cele mai active în aceste condiții. Deoarece au fost mai puțin performante în aceste condiții, SG-6, SG-9 și SG-11 au fost abandonate, iar un raport molar substrat: donor de acil de 1:2 a fost ales ca și optim pentru cei doi biocatalizatori rămași (SG-7 și SG-10).

4.2.2.2.4. Screening de temperatură

SG-7 și SG-10 au fost testați la diferite temperaturi utilizând condițiile optime determinate anterior în vederea evaluării influenței temperaturii mediului de reacție asupra valorii conversiei.

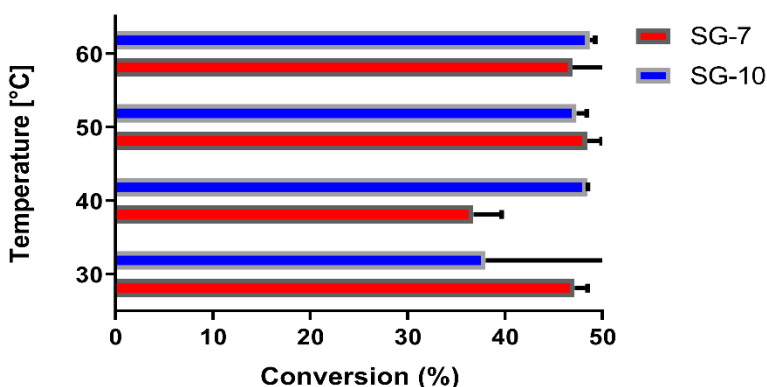


Figura 17. Screening de temperatură pentru acilarea 1-feniletanolului racemic cu acetat de vinil la diferite temperaturi (30, 40, 50 și 60 °C). Condiții de reacție: vas de sticlă de 1.5 mL, 16 μmol 1-feniletanol racemic, 2 echiv. acetat de vinil, 100 μg CaL-B, 1 mL *n*-hexan, 1000 rpm, 3 ore.

După cum se poate observa în **Figura 17** valori excelente ale conversiei (~50%) au fost obținute după 3 ore în reacția catalizată de SG-7 la 30 °C. Între timp, reacția catalizată de SG-10 a condus la obținerea unei valori mai mici a conversiei (~40%) după 3 ore la 30 °C și de asemenea o deviație standard mare poate fi observată. Valorile scăzute ale conversiei, respectiv a reproductibilității în cazul lui SG-10 la 30 °C este datorată, cel mai probabil, vâscozității ridicate a aditivului utilizat (OMIMBF₄) la temperaturi mai scăzute, în timp ce la testarea la temperaturi mai ridicate SG-10 atinge valori ale conversiei mai ridicate decât SG-7 în aceleași condiții. Luând în considerare fezabilitatea economică, prețul materialelor și consumul energetic, SG-7 a fost ales ca și biocatalizator optim pentru procesul optimizat, iar SG-10 a fost abandonat.

4.2.2.2.5. Screening de donor de acil

Biocatalizatorul cel mai performant (SG-7) a fost testat în continuare la transesterificarea 1-feniletanolului racemic cu diferiți donori de acil cu lanț din

ce în ce mai lung (acetat de vinil, propionat de vinil și decanoat de vinil) în condițiile optime, iar evoluția valorilor conversiilor reacțiilor a fost monitorizată timp de 4 ore, rezultatele fiind reprezentate grafic în **Figura 18**.

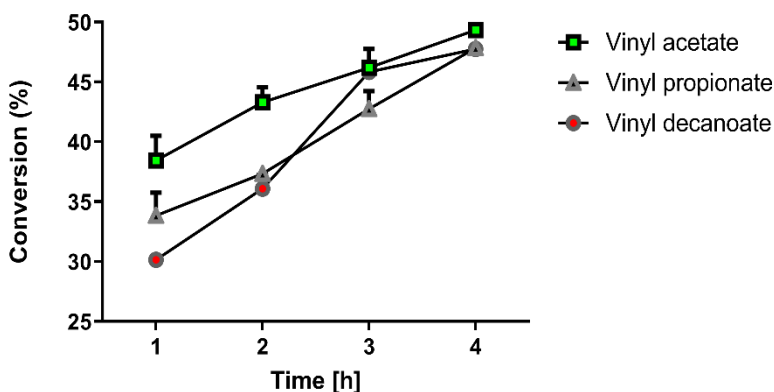


Figura 18. Profilul în timp a transesterificării 1-feniletanolului racemic mediată de SG-7 utilizând diferiți donori de acil. Condiții de reacție: vas de sticlă de 1.5 mL, 16 μmol 1-feniletanol racemic, 2 echiv. ester vinilic, 100 μg lipază (SG-7), 1000 rpm, 30 °C.

Profilul în timp al transesterificării 1-feniletanolului racemic cu diferiți donori de acil mediată de SG-7 arată că deși diferența nu este semnificativă, reacția în care acetatul de vinil a fost utilizat ca donator de acil a oferit cele mai bune valori ale conversiei la toate intervalele de timp, ceea ce arată că viteza de reacție este dependentă de lungimea lanțului de carbon a esterului vinilic. Ca și rezultat, acetatul de vinil a fost selectat ca donator de acil optim și utilizat în pașii următori de optimizare.

4.2.2.3. Studii de reutilizare

Stabilitatea operațională a unui biocatalizator este un parametru extrem de important a unui proces deoarece este necesar ca un biocatalizator să prezinte o stabilitate operațională ridicată pentru ca bioprocesul nou dezvoltat să fie considerat un înlocuitor la scală industrială a metodelor clasice de sinteză.

Pentru asta, gradul de reutilizare a SG-7 a fost evaluat, iar rezultatele sunt prezentate în **Figura 19**.

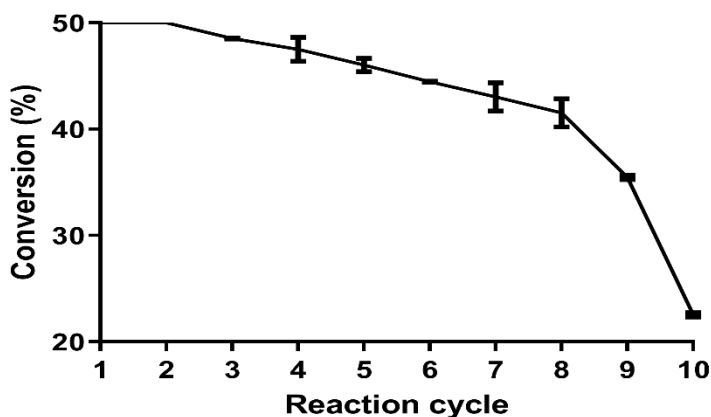


Figura 19. Evaluarea gradului de reutilizare a SG-7 în condițiile optime. Condiții de reacție: vas de sticlă de 1.5 mL, 16 μ mol 1-feniletanol racemic, 2 echiv. acetat de vinil, 1 mL *n*-hexan, 100 μ g CaL-B, 1000 rpm, 30 °C, 4 ore/ ciclu de reacție.

Biocatalizatorul nou preparat în care a fost utilizat un solvent eutectic ca și aditiv (SG-7) prezintă o stabilitate operațională ridicată, deoarece își menține ~85% din activitatea inițială chiar și după 8 cicluri de reacție. Pe baza rezultatelor obținute până în acest punct, SG-7 ar trebui să fie considerat un candidat pentru utilizarea la nivel industrial în procese de rezoluție a 1-feniletanolului sau a altor compuși similari.

4.2.2.4. Screening de concentrație de substrat în condiții optime

În vederea creșterii productivității procesului nou dezvoltat, concentrația de substrat a fost crescută în mod continuu până la observarea unei scăderi în activitatea enzimatică, precum este descris în **Figura 20**.

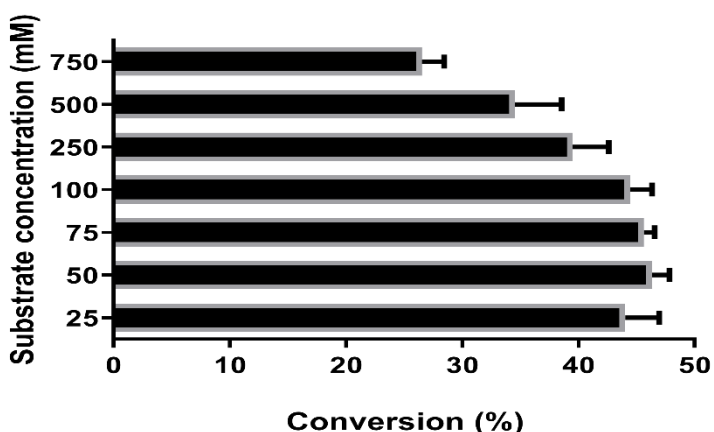


Figura 20. Screening-ul concentrației de substrat pentru transesterificarea 1-feniletanolului racemic. Condiții de reacție: vas de sticlă de 1.5 mL, 25-750 mM 1-feniletanol racemic, 2 echiv. acetat de vinil, 1 mL *n*-hexan, 150-4500 μ g CaL-B, 30 °C, 1000 rpm, 4 ore.

Rezultatele obținute arată că o concentrație de substrat de 100 mM a oferit rezultate excelente (conversie de ~47%) și că o creștere a concentrației de substrat (250-750 mM) duce la o scădere a valorii conversiei (de la ~47% la 100 mM la <30% la 750 mM concentrație inițială de 1-feniletanol racemic). Pe baza rezultatelor obținute, concentrația optimă de substrat a fost aleasă ca fiind 100 mM în vederea maximizării productivității procesului dezvoltat.

4.2.2.5. Efectul sinergic al aditivilor în cazul biocatalizatorului optim

Solventul eutectic format din clorură de colină și fructoză s-a dovedit a fi un aditiv eficient deoarece SG-7 a oferit rezultate excelente în transesterificarea 1-feniletanolului racemic cu acetat de vinil. Pentru a verifica dacă activitatea enzimatică crescută este datorată efectului solventului eutectic sau este datorată acțiunii unui singur component din acest solvent, 3 biocatalizatori adiționali care conțin CaL-B au fost preparați după cum urmează: SG-71 cu o soluție apoasă de clorură de colină, SG-72 cu o soluție apoasă de fructoză și SG-73 a fost preparat prin adăugarea unei soluții apoase de clorură de colină și a unei soluții apoase de fructoză în raport volumic de 1:1. Biocatalizatorii astfel

obținuți au fost testați în transesterificarea 1-feniletanolului racemic cu acetat de vinil utilizând condițiile ideale determinate anterior, în comparație cu SG-7.

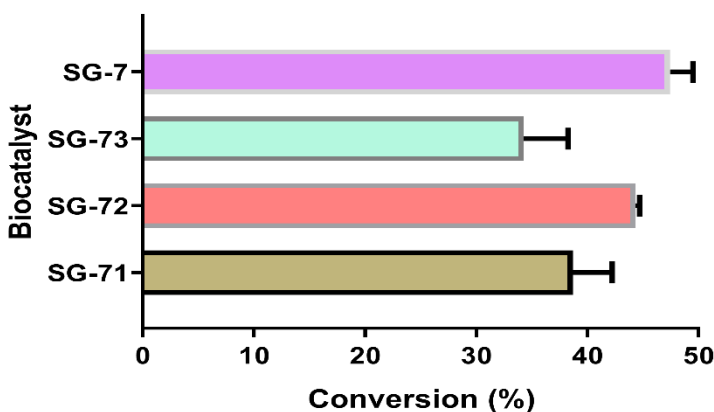


Figura 21. Evaluarea efectului sinergic. Condiții de reacție: vas de sticlă de 1.5 mL, 100 mM 1-feniletanol racemic, 2 echiv. acetat de vinil, 610.5 μ g CaL-B, 1 mL *n*-hexan, 1000 rpm, 30 °C, 4 ore.

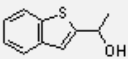
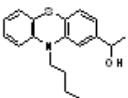
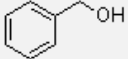
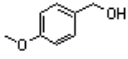
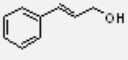



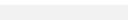
Aproape valoarea maximă a conversiei a fost obținută la reacția catalizată de SG-7 care a fost preparat utilizând solventul eutectic ca și aditiv, în timp ce valoarea minimă a conversiei (~35%) a fost obținută în reacția catalizată de SG-73, care a fost obținut prin adăugarea unei soluții apoase de clorură de colină și o soluție apoasă de fructoză în raport volumic de 1:1. Grija că un singur component al solventului eutectic a îmbunătățit activitatea enzimatică a fost înlăturată când a fost observat faptul că valorile conversiilor în cazul reacțiilor mediate de SG-71 și SG-72 (în care componenții separați ai solventului eutectic au fost utilizați ca și aditivi) au fost mai mici decât valoarea conversiei reacției de transesterificare a 1-feniletanolului racemic mediată de SG-7. Pe baza rezultatelor obținute se poate spune că utilizarea solvenților eutectici ca și aditivi la încapsularea lipazelor prin tehnica sol-gel

este justificată deoarece afectează în sens pozitiv activitatea și stabilitatea enzimei.

4.2.2.6. Diversificarea domeniului de substrat al biocatalizatorului optim

După optimizarea procesului utilizând transesterificarea 1-feniletanolului racemic cu acetat de vinil ca și reacție model, performanța biocatalizatorului optim a fost testată pentru acilarea a altor nouă alcooli, toți cu relevanță industrială, după cum este descris în **Tabelul 5**.

Table 5. Rezultatele obținute la acilarea diversilor alcooli cu acetat de vinil mediată de SG-7.

Substrate code	Substrate name	Substrate structure	Substrate enantiomeric excess [%]	Product enantiomeric excess [%]	Conversion [%]
A	1-(benzo[<i>b</i>]thiophen-2-yl)ethan-1-ol		99.9	99.9	50
B	1-(10-butyl-10 <i>H</i> -phenothiazin-2-yl)ethan-1-ol		99.9	99.9	50
C	benzyl alcohol		NAP	NAP	99.9
D	(4-methoxyphenyl)methanol		NAP	NAP	99.9
E	3-phenylprop-2-en-1-ol		NAP	NAP	99.9
F	1-pentanol		NAP	NAP	99.9
G	1-hexanol		NAP	NAP	99.9
H	1-octanol		NAP	NAP	99.9
I	1-dodecanol		NAP	NAP	99.9

*NAP- nu se aplică. Condiții de reacție: 100 mM substrat, 2 echiv. acetat de vinil, 1 mL *n*-hexan, 1000 rpm, 30 °C, 4 ore. SG-7 a fost adăugat în fiecare caz astfel încât să respecte valoarea optimă a raportului masic substrat: enzimă de 20:1.

Rezultate excelente au fost obținute pentru transformarea tuturor substraturilor testate (**A-I** în **Tabelul 5**) mediată de SG-7. Produși de reacție enantiopuri (exces enantiomeric >99%) au fost obținuți cu valori maxime ale conversiei (50%) pornind de la compușii **A** și **B**, în timp ce compușii **C-I** au fost acilați eficient cu valori ale conversiei aproape cantitative (>99%). Versatilitatea și stabilitatea noului biocatalizator SG-7 îl recomandă pentru o potențială producție și aplicare la nivel industrial.

4.2.3. Concluzii

În acest capitol de teză, utilizarea revoluționară a solvenților eutectici la încapsularea prin tehnica sol-gel a CaL-B a fost prezentată. Utilizând solventul eutectic optim, un amestec clorură de colină: fructoză în raport molar 1:1 (utilizat sub forma unei soluții apoase 30%), a fost preparat un biocatalizator activ, versatil, eficient și stabil (SG-7) și acesta a fost comparat cu alți biocatalizatori preparați cu ajutorul mult mai popularelor lichide ionice. Biocatalizatorul optim a fost utilizat cu succes pentru rezoluția cinetică enzimatică a 1-feniletanolului racemic prin transesterificare cu acetat de vinil. Utilizând condițiile ideale de reacție, cel mai activ biocatalizator a fost capabil să transforme eficient alți nouă alcooli de interes industrial, făcând astfel SG-7 un candidat pentru o potențială producție la scală industrială.

Chapter 5. Materiale și metode (date experimentale)

Chapter 6. Concluzii generale

În cadrul acestei teze de doctorat s-a realizat cu succes imobilizarea enzimei CaL-B prin încapsulare în matrice de sol-gel, iar biocatalizatorii obținuți au fost utilizați, în principal, pentru sinteza enzimatică a esterilor de aromă.

Sinteza enzimatică a propionatului de anisil a fost optimizată cu succes, fiind capabilă de a produce esterul de interes cu un randament de 90% pornind de la o concentrație de substrat de 1 M în doar 6 ore, ceea ce reprezintă prima metodă enzimatică eficientă de sinteză a propionatului de anisil descrisă în literatura de specialitate.

Imobilizarea lipazei B din *Candida antarctica* în matrice de sol-gel în prezența unor compuși polihidroxicili (utilizați ca și aditivi) s-a dovedit a fi o metodă eficientă de încapsulare, deoarece biocatalizatorii obținuți cu această metodă au fost utilizați pentru sinteza eficientă a șapte esteri de aromă naturali cu lanț scurt. Pe baza rezultatelor obținute după optimizarea procesului, produșii de interes pot fi obținuți cu valori excelente ale conversiei în timp scurt de reacție (1 oră) și aceștia sunt facil de izolat din mediul de reacție, făcând astfel procesul enzimatic dezvoltat un candidat important pentru o potențială scalare la nivel industrial și poate fi considerată, de asemenea, un proces verde și sustenabil (idee suportată prin evaluarea indicilor chimiei verzi).

Utilizarea revoluționară a solvenților eutectici ca și aditivi la încapsularea CaL-B prin tehnica sol-gel a fost de asemenea descrisă în cadrul acestei teze de doctorat. Un amestec format din clorură de colină și fructoză, în raport molar de 1:1 (utilizat sub forma unei soluții apoase de 30%) a fost utilizat pentru prepararea unui nou biocatalizator stabil și eficient, care a fost mai apoi aplicat în rezoluția cinetică enzimatică a 1-feniletanolului racemic. Utilizând condițiile ideale de reacție biocatalizatorul SG-7 a fost aplicat cu succes în acilarea altor nouă alcooli cu relevanță industrială. Aceasta a fost prima utilizare a solvenților eutectici ca și aditivi la imobilizarea lipazelor descrise în literatura de specialitate, ceea ce deschide calea pentru o continuare a acestei teme de cercetare.

Bibliografie

- (1) Boudrant, J.; Woodley, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Parameters Necessary to Define an Immobilized Enzyme Preparation. *Process Biochem.* **2020**, *90* (November 2019), 66–80.
- (2) Kasche, V. Mechanism and Yields in Enzyme Catalysed Equilibrium and Kinetically Controlled Synthesis of β -Lactam Antibiotics, Peptides and Other Condensation Products. *Enzyme Microb. Technol.* **1986**, *8* (1), 4–16.
- (3) Samuelsen, L.; Holm, R.; Lathuile, A.; Schönbeck, C. Correlation between the Stability Constant and PH for β -Cyclodextrin Complexes. *Int. J. Pharm.* **2019**, *568* (April), 118523.
- (4) Ortiz, C.; Ferreira, M. L.; Barbosa, O.; Dos Santos, J. C. S.; Rodrigues, R. C.; Berenguer-Murcia, Á.; Briand, L. E.; Fernandez-Lafuente, R. Novozym 435: The “Perfect” Lipase Immobilized Biocatalyst? *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9* (10), 2380–2420.
- (5) Perdomo, I. C.; Gianolio, S.; Pinto, A.; Romano, D.; Contente, M. L.; Paradisi, F.; Molinari, F. Efficient Enzymatic Preparation of Flavor Esters in Water. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67* (23), 6517–6522.