



Universitatea Babeş-Bolyai
Cluj-Napoca, România



Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică
Școala Doctorală de Chimie

**Abordări biocatalitice pentru sinteza unor alcooli și amine
optic pure**

Rezumatul Tezei de Doctorat

Student doctorand: Cristian Andrei Gal

Coordonator științific: Prof. Dr. Csaba Paizs

Cluj-Napoca

2022



Universitatea Babeş-Bolyai
Cluj-Napoca, România



Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică
Școala Doctorală de Chimie

Abordări biocatalitice pentru sinteza unor alcooli și amine optic pure

Rezumatul Tezei de Doctorat

Student doctorand: Cristian Andrei Gal

Coordonator științific: Prof. Dr. Csaba Paizs

Președinte comisie: Prof. Dr. Ion Grosu – membru corespondent al Academiei
Române – Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca, România

Referenți:

Prof. Dr. Jörg Pietruszka – Universitatea Heinrich Heine, Düsseldorf, Germania

Prof. Dr. Francisc Péter – Universitatea Politehnică, Timișoara, România

Conf. Dr. Anamaria Elena Terec – Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca,
România

Cluj-Napoca

2022

Cuprins

1. Introducere	5
1.1. Rolul biocatalizei în sustenabilitate	5
1.2. Biocataliza în sistem continuu	6
1.3. Utilizarea enzimelor în rezoluții cinetice	7
1.3.1. Lipazele în sinteza stereoselectivă a alcoolilor chirali	7
1.3.2. ω -Transaminaze în sinteza stereoselectivă a aminelor chirale	9
2. Scopul tezei	10
Obiectivul 1. Producția în flux continuu a alcoolilor secundari enantiopuri utilizând lipaza B din <i>Candida antarctica</i> (CaL-B) imobilizată	10
Obiectivul 2. Lipaze în rezoluția cinetică dinamică a aminelor	11
Obiectivul 3. Transaminaze pentru producția de (R)- și (S)-amine	11
3. Rezultate și discuție	12
3.1. Procedura de imobilizare a lipazei B din <i>Candida antarctica</i> (CaL-B).....	12
3.1.1. Imobilizarea covalentă a lipazei pe nanotuburi de carbon cu un singur perete (SwCNT) ..	12
3.1.2. Importanța încărcării cu enzimă a suportului	13
3.2. Biocataliza în flux continuu utilizând CaL-B	14
3.2.1. Sinteza chimică a alcoolilor și acetaților.....	14
3.2.2. Influența solvenților organici asupra activității lipazei	14
3.2.3. Profilul temperaturii pentru acetilarea enantioselectivă mediată de SwCNT-CaL-B	15
3.2.4. Reciclabilitatea SwCNT-CaL-B în sistem discontinuu.....	16
3.2.5. Acilarea <i>rac-a</i> catalizată de lipază în flux continuu.....	16
3.2.6. Concluzii	22
3.3. Lipaze în rezoluția cinetică dinamică a aminelor în flux continuu	23
3.3.1. Experimente de racemizare	23
3.3.2. Stabilitatea operațională.....	28
3.3.3. Concluzii	29
3.4. Tranzaminaze (TA) în rezoluția cinetică a aminelor.....	29

3.4.1. Identificarea de noi TA	29
3.4.2. Teste de activitate/stabilitate funcțională	30
3.4.3. Concluzii	40
4. Concluzii generale	41
5. Referințe bibliografice	42

Cuvinte cheie: biocataliză în flux continuu, lipaze, transaminaze, rezoluție cinetică, caracterizare enzime

1. Introducere

1.1. Rolul biocatalizei în sustenabilitate

În biocataliză enzimele sunt utilizate drept catalizatori, putând acționa într-o manieră chemo-, regio- și enantioselectivă, cerințe greu de îndeplinit în cataliză chimică. Acești catalizatori, care în mod uzual prezintă enantioselectivități aproape perfecte, au deschis noi orizonturi în domeniul catalizei: sunt verzi, cu impact redus asupra planetei și avantajoși din punct de vedere economic.¹

În general, cataliza enzimatică se realizează în condiții blânde de reacție (presiune atmosferică și temperatură ambientală), în apă, în reactoare standard. În anii 80 cercetătorii au demonstrat faptul că lipazele sunt mai termostabile în solvent organic (toluen la 100 °C) decât în apă.² Aceste studii au prezentat modul în care enzimele pot fi utilizate în sinteza organică. În plus, etapele dificile de protejare, deprotejare și activare a grupărilor funcționale pot fi deseori evitate, reducându-se astfel numărul de etape ale procesului³ și deșeuri generate.

Din punct de vedere al sustenabilității procesele în mai multe etape, de tip “one-pot”, în care nu se realizează izolarea produșilor intermediari, prezintă numeroase avantaje: consum minimizat de solvent, productivități maximizate, număr redus de etape (prin evitarea etapelor de derivatizare și protejare a grupărilor funcționale), performanțe superioare, cantitate redusă de deșeuri.⁴ În cazul în care echilibrul unei cascade enzimatică este deplasat spre formare de produs, sustenabilitatea procesului este semnificativ îmbunătățită.⁵ Biocataliza poate utiliza celule viabile și active din punct de vedere metabolic.⁶ Prin intermediul acestei tehnici se poate realiza supraproducția anumitor metaboliți, precum vitamine, aminoacizi, alcooli, acizi carboxilici.⁷ Sistemele de reacții enzimatică tip celule întregi sunt extrem de practice deoarece oferă protecție enzimelor (prin intermediul peretelui celular), permit regenerarea cofactorului și recuperarea/îndepărtarea facilă a celulelor, reacțiile în mai multe etape devenind astfel mult mai accesibile.

Organizația ACS Green Chemistry Institute Pharmaceutical Roundtable a publicat domeniile cheie de cercetare, în care enzimele contribuie la integrarea chimiei verzi în industria farmaceutică.⁸ După cum era de așteptat, biocataliza joacă un rol crucial în majoritatea acestor domenii de cercetare.

1.2. Biocataliza în sistem continuu

În prezent există două tendințe majore în ceea ce privește sinteza ingredientelor farmaceutice active (API): biocataliza și chimia în sistem continuu.^{9,10} Un aspect important în utilizarea chimiei în sistem continuu constă în potențialul enorm pe care aceasta îl prezintă ca siguranță în desfășurarea reacțiilor/proceselor. Riscurile asociate cu reacțiile conduse la presiune ridicată, expunerea la chimicale periculoase, căldura degajată de reacțiile exoterme pot fi eliminate prin utilizarea proceselor continue.¹¹ În corelație cu biocataliza (care în general evită utilizarea chimicalelor periculoase și condițiile de reacție extreme) cele două tehnologii pot fi combinate pentru dezvoltarea unei tehnologii extrem de avantajoase. Mai mult de atât, întrucât reglementările industriei farmaceutice susțin aplicarea biocatalizei în sinteza API, utilizarea acesteia în flux continuu devine din ce în ce mai necesară.¹² În plus, efectele benefice ale chimiei în flux continuu devin și mai clare în contextul proceselor industriale.^{13 14} Prin aplicarea chimiei în flux continuu, intensificarea¹⁵ și integrarea¹⁶ proceselor chimice devin ușor accesibile iar condițiile de reacție sunt uniforme, experimentele fiind mult mai ușor de controlat. Se poate realiza controlul precis al temperaturii și pH-ului iar catalizatorii pot fi compartimentați. Compartimentarea catalizatorilor este extrem de importantă în cazul biocatalizatorilor pentru evitarea problemelor legate de incompatibilitate.

Chimia în flux continuu poate oferi soluții la problemele aferente utilizării biocatalizatorilor în sinteza chimică. Utilizarea reactoarelor discontinue cu amestecare nu este atât de eficientă în cazul biocatalizatorilor datorită condițiilor de operare ale acestora: agitare puternică și temperatură ridicată. Acestea pot conduce la inactivarea enzimei ca urmare a temperaturii ridicate și a efectelor interfaciale.¹⁷ Utilizarea biocatalizei în flux continuu a fost studiată și recenzată în detaliu¹⁸ și aplicabilitatea sa a fost demonstrată pentru o varietate de substanțe. Dezvoltarea rapidă a electronicii și a inteligenței artificiale (AI) și-a pus amprenta și asupra chimiei în flux continuu, oferind posibilitatea utilizării de senzori și sisteme de control înalt eficiente.¹⁹

În **Figura 1** este prezentat modul general de configurare a reactoarelor microfluidice cu enzime imobilizate (μ -IMER). Configurarea acestora poate fi: în cascadă (în serie) (**Figura 1A**) sau biocatalizatorii pot fi co-imobilizați (**Figura 1C**), ceea ce prezintă avantajul că biocatalizatorii sunt în strânsă proximitate. O altă posibilitate este inserarea unui alt catalizator între unitățile care conțin enzime (**Figura 1B**).²⁰

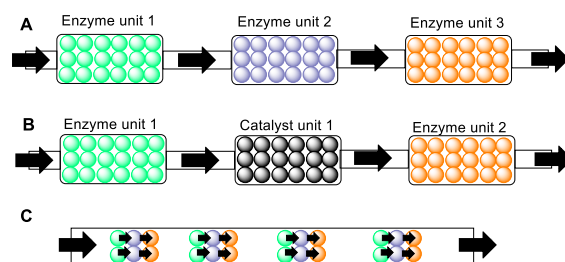


Figura 1. Modul de configurare a μ -IMER

Prin compartimentarea reacțiilor, care constituie unul din avantajele majore ale chimiei în flux continuu, reacții imposibil de realizat devin posibile. Efectul benefic al compartimentării poate fi observat în cazul sintezei aminelor primare și secundare și a 4'-O-metilnorbeladinei, precursor al galantaminei (utilizată în tratamentul demenței).²¹

1.3. Utilizarea enzimelor în rezoluții cinetice

Răspândirea și dezvoltarea rapidă a proceselor enzimatică au fost accelerate de dezvoltări la nivel social. Exemple relevante sunt Actul de Prevenire a Poluării al S.U.A.²², care a încurajat trecerea de la metodologii “stoechiometrice” la prevenirea deșeurilor, întrucât metodologiile inițiale generau cantități enorme de deșeuri, și agențiile de reglementare care au introdus legi care prevăd teste obligatorii pentru fiecare stereoisomer al medicamentelor chirale.²³ Rezoluțiile enzimatică au fost limitate la rezoluții cinetice (KR), spre exemplu, ale amidelor și esterilor, utilizând hidrolaze. Acestea au permis randamente de 50% pentru enantiomerul dorit, ceea ce indică un randament de 50% pentru enantiomerul nedorit (distomer) considerat deșeu, care trebuie să fie racemizat pentru a putea fi reutilizat, această etapă realizându-se în unele cazuri *in situ*.²⁴

1.3.1. Lipazele în sinteza stereoselectivă a alcoolilor chirali

În prezent, alcooli optic puri sunt precursori esențiali, fiind utilizați pe scară largă ca intermediari în industria farmaceutică și chimică pentru sinteza aromelor, medicamentelor, agrochimicalelor, cristalelor lichide sau a materialelor de specialitate care conțin centre chirale.²⁵ Prin urmare, sinteza lor prezintă un mare interes pentru cercetători. Metodele convenționale de sinteză a alcoolilor în formă enantiomeric pură presupun în mare parte utilizarea de metale toxice sau liganzi costisitori. Pentru a elimina aceste neajunsuri, enzimele oferă o alternativă verde și sustenabilă pentru sinteza acestora.^{26 27} În metodele tradiționale din sinteza organică, pentru obținerea alcoolilor enantiomeric puri lipsește controlul regio- și

stereochemic al reacțiilor. Astfel, datorită condițiilor dure de reacție, pot apărea reacții secundare nedorite (aldolizare) și reacții ulterioare (deshidratare).²⁸ Pe lângă acestea, la finalul actului catalitic biocatalizatorii sunt ușor descompuși în mediul înconjurător, ceea ce face ca utilizarea lor să reprezinte o alternativă viabilă la sinteza chimică tradițională.²⁹

Cele șapte strategii principale de sinteză enzimatică a alcoolilor enantiomeric puri sunt: 1) adiția enantioselectivă a apei la cetone α,β -nesaturate, ceea ce conduce la formarea de hidroxil cetone³⁰; 2) adiția aldolică enantioselectivă, care produce hidroxil cetone prin formarea asimetrică a unei legături carbon-carbon³¹; 3) cuplarea enantioselectivă a cetonei și aldehydilor cu acid cianhidric, obținându-se alcooli chirali nitril-substituiți (cianhidrine)³²; 4) reducerea asimetrică a compușilor carbonilici³³; 5) rezoluția cinetică (dinamică) a amestecurilor racemice, metoda fundamentală în sinteza alcoolilor optic puri³⁴; 6) hidroliza enantioselectivă a epoxizilor, care conduce la formarea diolilor vicinali³⁵; 7) hidroxilarea regio- și stereoselectivă a legăturilor C-H, cu obținerea compușilor hidroxilici³⁶.

Alcoolii secundari reprezintă cele mai des utilizate substraturi în rezoluțiile cinetice catalizate de lipaze. Acest lucru este rezultatul cerinței crescute pentru această clasă de compuși și enantioselectivității ridicate a lipazelor față de alcoolii secundari (fiind mai redusă în cazul alcoolilor primari și terțiari), conducând la răspândirea acestei metode.³⁷ Rezultatul proceselor KR este foarte previzibil datorită regulii lui Kazlauskas.³⁸ De obicei enantiomerul *R* al alcoolului este transformat în (*R*)-acetat cu o viteză de reacție mult mai mare (având exces enantiomeric (*ee*) mare). În acest fel, (*S*)-alcoolul, rămâne nereacționat. Dacă se dorește recuperarea (*R*)-alcoolului (din (*R*)-acetat), hidroliza catalizată de lipaze este opțiunea cea mai la îndemână pentru obținerea (*R*)-alcoolului cu *ee* ridicat, realizând astfel separarea celor doi enantiomeri.

Lipazele pot fi catalizatori eficienți și în KR ale aminelor chirale primare³⁹ și secundare (deși a doua variantă nu este atât de comună)⁴⁰, fiind implicate în reacția de acetilare enantioselectivă a grupării amino a substratului racemic. Un avantaj al lipazelor este faptul că nu sunt reactive în reacția de hidroliză a legăturii amidice (care se formează în timpul procesului de KR catalizat de aceste enzime), ceea ce determină ireversibilitatea formării legăturii amidice.⁴¹ O serie de parametri pot influența productivitatea și selectivitatea reacțiilor de formare enantioselectivă a legăturii amidice, catalizate de lipaze, și anume: tipul solventului⁴², conținutul în apă al compușilor implicați în proces (preparat enzimatic, donor de acetyl, substrat și solvent)⁴³ și activitatea enzimei utilizate în formă liberă sau imobilizată (dacă scopul este utilizarea în sisteme de reacție continue).

1.3.2. ω -Transaminaze în sinteza stereoselectivă a aminelor chirale

Dezvoltarea recentă din domeniul biocatalizei s-a remarcat și în sinteza aminelor chirale. Se estimează că 40% din compușii farmaceutici conțin o unitate funcțională amino⁴⁴, în consecință aminele chirale reprezintă unități structurale de bază relevante pentru industria farmaceutică. În general, cea mai des utilizată metodă pentru sinteza aminelor chirale este hidrogenarea bazelor Schiff⁴⁵, deși s-au utilizat și alte metode precum adiția nucleofilă, inserția C-H și cristalizarea diastereomerilor. Pentru producția acestor compuși într-o manieră verde și sustenabilă s-au luat în considerare strategii de sinteză enzimatică bazate pe hidrolaze⁴⁶, în timp ce au fost studiate și alte enzime, precum oxidazele, liazele și transaminazele (TA).⁴⁷

Transaminazele sunt enzime care transferă gruparea funcțională amino de la un donor de grupare amino la o moleculă acceptoare, de regulă o cetonă sau o aldehydă.⁴⁴ Acestea sunt enzime dependente de cofactor, cofactorul lor fiind PLP, care mediază reacția mai sus menționată.⁴⁸ În natură această reacție este în general reprezentată de transferul unei grupări amino de la un α -aminoacid la un ceto-acid, evidențiind principalul lor rol biocatalitic. În plus ele posedă capacitatea universală de asimilare a azotului a tuturor organismelor.^{49 50} În ultimul deceniu un număr semnificativ de recenzii^{51 52 53} au prezentat potențialul pe care aceste enzime îl au, subliniind rolul esențial al acestora în sinteza aminoacizilor și aminelor chirale.⁵⁴ La finalul anilor 80 reacțiile catalizate de TA au fost deja implementate la scară industrială pentru producția aminelor optic pure, atât prin procese de KR cât și prin sinteză asimetrică.⁵⁵ Au fost dezvoltate atât TA (*R*)-selective cât și (*S*)-selective, aplicate în sinteze asimetrice pornind de la cetone prochirale. La începutul deceniului următor aceste metode au fost dezvoltate suplimentar în mediul academic.^{56 57}

2. Scopul tezei

Teza de față își propune dezvoltarea de **metode eficiente pentru sinteza alcoolilor și aminelor optic pure**. Pentru atingerea scopului, următoarele obiective trebuie realizate cu succes:

Obiectivul 1. Producția în flux continuu a alcoolilor secundari enantiopuri utilizând lipaza B din *Candida antarctica* (CaL-B) imobilizată

Imobilizarea covalentă a CaL-B (a). Aceasta va permite utilizarea sa în sistem continuu pentru obținerea alcoolilor enantiopuri. **Biocataliza în flux continuu utilizând CaL-B** – dezvoltarea și optimizarea unui sistem de reacție pentru obținerea alcoolilor secundari optic puri, în solvent organic, la scară preparativă (b) (Figura 2.).

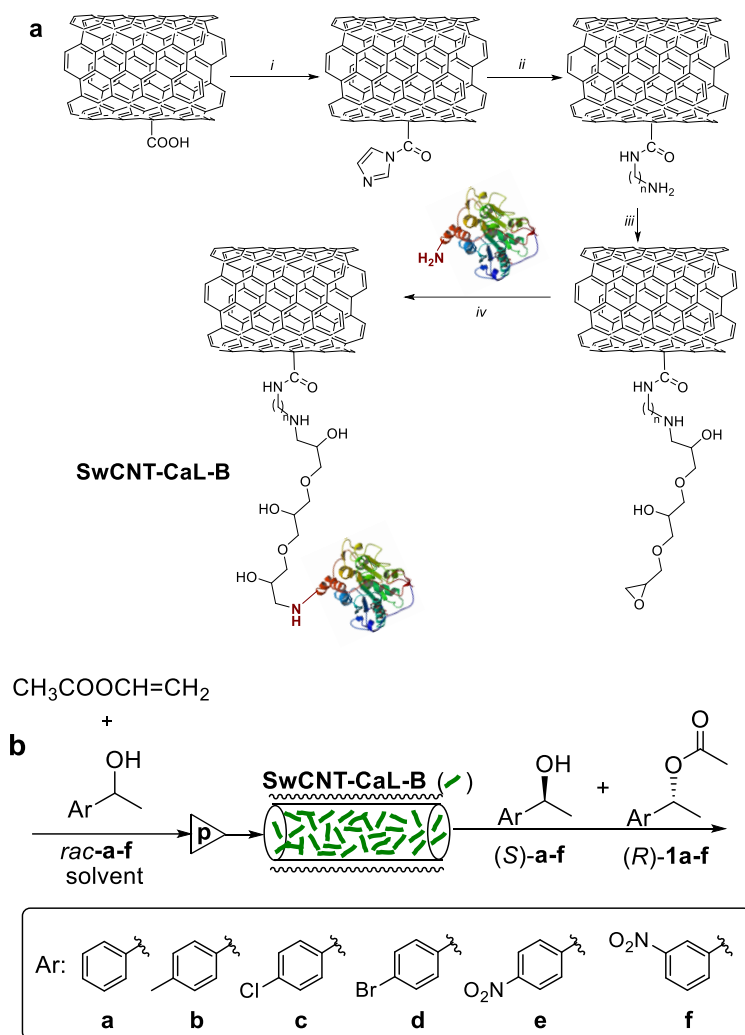


Figura 2. Strategia de imobilizare a lipazei (a); sistemul de reacție în flux continuu propus pentru rezoluția cinetică a ariletan-1-olilor secundari (b)

Obiectivul 2. Lipaze în rezoluția cinetică dinamică a aminelor.

Implementarea unui sistem în flux continuu pentru rezoluția cinetică dinamică (DKR) eficientă a aminelor benzilice (**Figura 3.**).

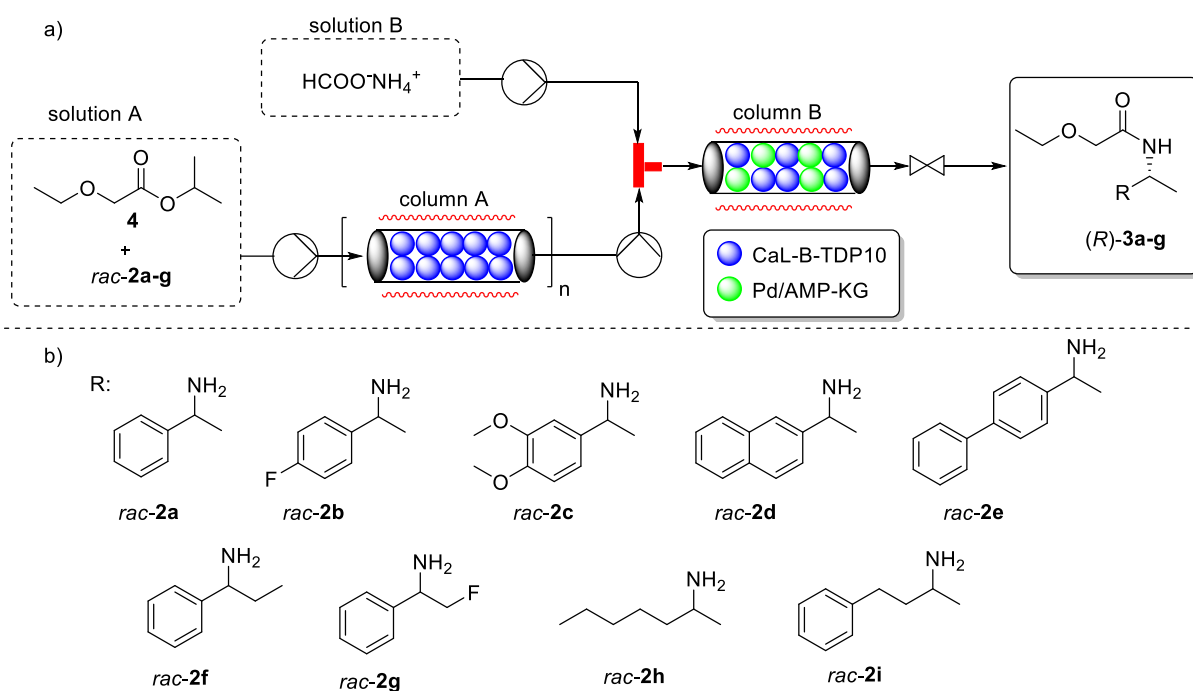


Figura 3. Sistemul considerat pentru DKR a aminelor

Obiectivul 3. Transaminaze pentru producția de (*R*)- și (*S*)-amine.

S-a urmărit caracterizarea a două transaminaze, care nu au fost descrise în literatură, pentru KR a aminelor în sistem discontinuu. Proprietățile catalitice ale acestora au fost comparate cu cele ale unei TA bine studiate (**Figura 4.**).

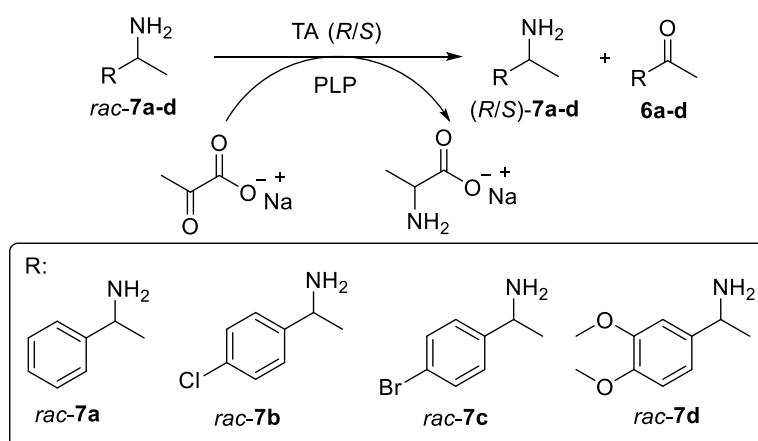


Figura 4. Rezoluția cinetică catalizată de TA

3. Rezultate și discuție

3.1. Procedura de imobilizare a lipazei B din *Candida antarctica* (CaL-B)

3.1.1. Imobilizarea covalentă a lipazei pe nanotuburi de carbon cu un singur perete (SwCNT)

S-a utilizat *N,N'*-carbonildiimidazol pentru activarea nanotuburilor de carbon funcționalizate cu grupări amino (SwCNT_{COOH}). Ulterior nanotuburile activate au reacționat cu α,ω -diaminoalcani (cu diferite lungimi ale lanțului: C₃- C₆- C₈-), generându-se SwCNT funcționalizate cu resturi aminoalchil de diferite lungimi: SwCNT_{COOH}-C₃-NH₂, SwCNT_{COOH}-C₆-NH₂ și SwCNT_{COOH}-C₈-NH₂. Aceste structuri au reacționat mai departe cu glicerol diglicidil eter (GDE). Enzima CaL-B a fost imobilizată covalent pe aceste suporturi (aproape cu randament cantitativ), cu un raport enzimă:suport 1:2 (w/w), în prezența Tween 80 (surfactant neionic), obținându-se 3 preparate enzimatiche imobilizate (SwCNT_{COOH}-C_n-NH-GDE-CaL-B; $n=3, 6, 8$). Pentru validarea metodei fiecare imobilizare s-a realizat în triplicat și biocatalizatorii rezultați au fost investigați în reacția model (acetilarea *rac*-feniletan-1-olului în prezența acetatului de vinil în hexan) pentru a testa activitatea și stereoselectivitatea enzimei după imobilizare. După urmărirea reacțiilor în timp s-a observat faptul ca metodologia de imobilizare este înalt reproductibilă și că eficiența catalitică scade cu creșterea lungimii lanțului de carbon (utilizat ca braț de distanțare, linker, în imobilizare). Toți biocatalizatorii au prezentat stereoselectivitate excelentă, cele mai bune rezultate înregistrându-se cu SwCNT_{COOH}-C₃-NH-GDE-CaL-B (SwCNT_{COOH}-CaL-B) (**Figura 5**).

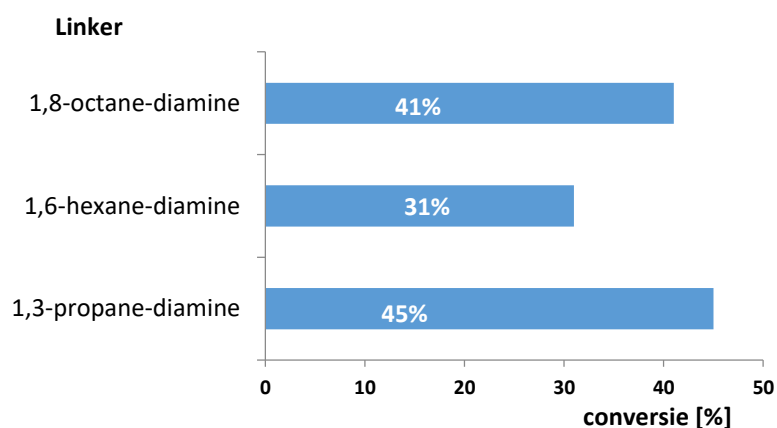


Figura 5. Influența lungimii brațului de distanțare asupra activității KR (raport enzimă:suport 1:2, 0.75 echiv. acetat de vinil, *n*-hexan, 30 °C, după 2 ore)

Procedura de imobilizare pentru obținerea lipazei imobilizate covalent s-a realizat după o metodă anterior dezvoltată în cadrul grupului nostru,^{58 59} prezentată în **Figura 6**.

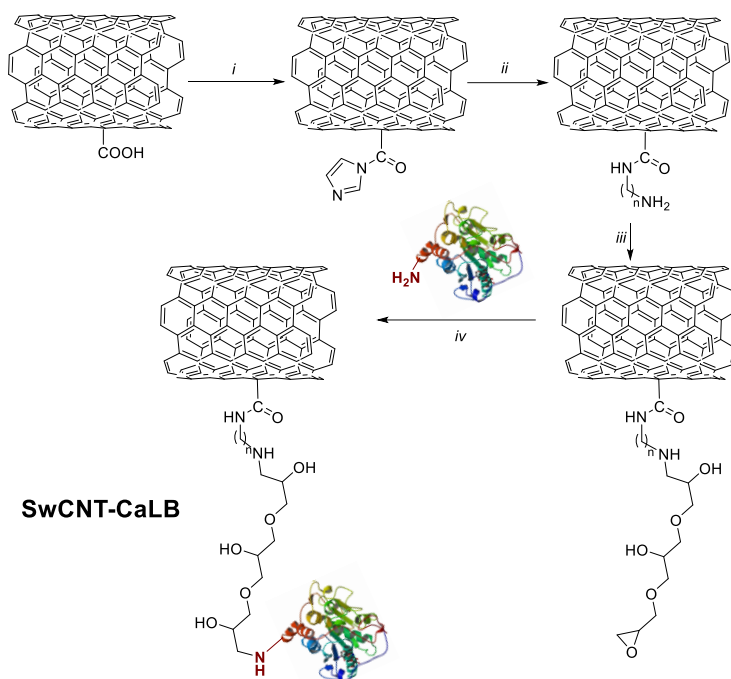


Figura 6. Imobilizarea covalentă a CaL-B pe SwCNT_{COOH}

3.1.2. Importanța încărcării cu enzimă a suportului

Performanța catalitică a biocatalizatorului imobilizat a fost investigată în reacția substratului model, *rac*-feniletan-1-olul (*rac*-a), acetilarea enantioselectivă cu acetat de vinil în *n*-hexan la 30 °C la un timp de reacție de 1 oră (**Tabelul 1**). Catalizatorii au fost cântăriți cu precizie pentru a asigura aceeași cantitate de SwCNT-CaL-B în toate experimentele.

Tabelul 1. Efectul încărcării cu enzimă asupra activității biocatalizatorilor imobilizați (2 mg *rac-a* /mL, 0.75 echiv. acetat de vinil, în *n*-hexan, la 30 °C, după 1 h)

Nr. Crt.	Raport Suport-Enzimă (w/w)	Încărcare cu enzimă (mg CaL-B/mg suport)	c (%)
1	4:1	0.16	41
2	2:1	0.33	42
3	1:1	0.5	41
4	1:2	0.66	42
4	1:3	0.72	35
5	1:4	0.78	29
6	1:5	0.83	24

S-a observat faptul că un raport enzimă:suport în intervalul de la 1:4 la 2:1 (w/w) a produs activități specifice aproape identice. O încărcare mai mare a suportului cu enzimă nu a avut efect benefic asupra activității specifice, prin urmare, raportul enzimă:suport (w/w) de 2:1 a fost ales pentru experimentele următoare, fiind varianta cea mai avantajoasă din punct de vedere economic.

3.2 Biocataliza în flux continuu utilizând CaL-B

3.2.1. Sinteza chimică a alcoolilor și acetaților

Sinteza chimică a alcoolilor secundari (*rac-a-f*) s-a realizat prin reducerea cetonelor corespunzătoare cu NaBH₄. Sinteza chimică a alcoolilor racemici acetilați (*rac-1a-f*) s-a realizat cu clorură de acetyl, în prezența 4-dimetilaminopiridinei (DMAP). Pentru confirmarea structurii compușilor *rac-a-f* și *rac-1a-f* s-au efectuat măsurători ¹H- și ¹³C-NMR. Suplimentar, s-au determinat parametrii HPLC și GC pentru separarea compușilor investigați.

3.2.2. Influența solvenților organici asupra activității lipazei

Biocatalizatorul SwCNT-CaL-B a fost testat în diverși solvenți organici, precum hidrocarburi aromatice, alifaticе și halogenate, eteri și nitrili. În reacția de acetylare a substraturilor *rac-a-d* *n*-hexan s-a dovedit a fi cea mai bună alegere în ceea ce privește eficiența catalitică (viteză de reacție și stereoselectivitate). Aceeași investigație a dat rezultate diferite

pentru substraturile *rac-e-f*, DIPE fiind solventul optim pentru acetilarea enantioselectivă (*E*) a alcoolilor secundari (**Tabelul 2.**).

Tabelul 2. Solvenții optimi pentru rezoluția cinetică biocatalitică a *rac-a-f* (2 mg *rac-a-f*/mL, 0.75 echiv. acetat de vinil, 1.5 mg catalizator, 500 μL solvent, la 30 °C)

Substrat	Solvent	Timp (h)	<i>ee_S</i> (%)	<i>ee_P</i> (%)	<i>c^a</i> (%)
<i>rac-a</i>	<i>n</i> -hexane	2	99	99	50
<i>rac-b</i>	<i>n</i> -hexane	4	99	99	50
<i>rac-c</i>	<i>n</i> -hexane	4	99	99	50
<i>rac-d</i>	<i>n</i> -hexane	6	98	99	50
<i>rac-e</i>	DIPE	8	98	99	50
<i>rac-f</i>	DIPE	8	99	99	50

^a Enantioselectivitate excelentă în toate cazurile ($E \gg 200$).

3.2.3. Profilul temperaturii pentru acetilarea enantioselectivă mediată de SwCNT-CaL-B

În continuare s-a studiat efectul temperaturii asupra biotransformării substratului model (*rac-a*) în *n*-hexan, pe domeniul de temperatură 30-60 °C. În acest caz, reacțiile s-au realizat în sistem discontinuu, și s-au colectat probe după 1 oră, la diferite temperaturi. Pentru parametrii de reacție stabiliți (concentrație de substrat, cantitate de SwCNT-CaL-B și agent de acilare și solvent) temperatura de 60 °C s-a dovedit a fi cea mai benefică pentru KR, atingându-se o conversie apropiată de cea maximă (valoare teoretică - 50%). Așa cum era de așteptat, s-a înregistrat o îmbunătățire a performanței catalitice cu creșterea temperaturii, cu toate acestea, la 40 °C lipaza a avut eficiență redusă, ceea ce este în bună concordanță cu observații anterioare.⁵⁸ Mărirea temperaturii a condus la scăderea vâscozității mediului de reacție, astfel procesul de difuzie a fost intensificat⁶⁰ și s-a îmbunătățit accesibilitatea substratului la situsul catalitic al enzimei (**Figura 7.**).

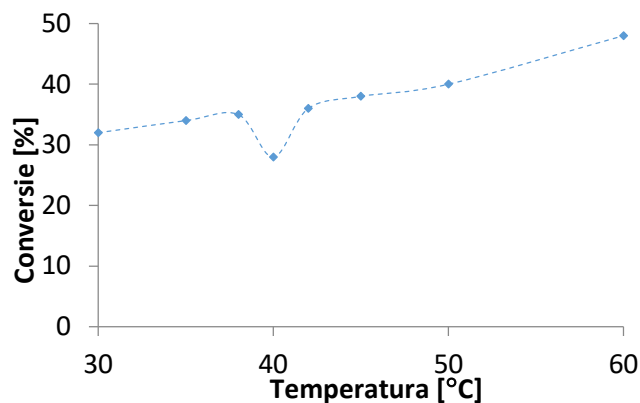


Figura 7. Profilul conversiei la diferite temperaturi pentru biotransformarea *rac-a* (2 mg/mL) cu acetat de vinil (0.75 echiv.) în *n*-hexan, 3 mg SwCNT-CaL-B, după 1 h

3.2.4. Reciclabilitatea SwCNT-CaL-B în sistem discontinuu

S-a investigat reciclabilitatea preparatului enzimatic optim (0.66 mg lipază/mg biocatalizator) în reacția substratului model (*rac-a*) în cicluri de reacții consecutive în condițiile de reacție stabilite anterior (2 mg/mL substrat în *n*-hexan, 0.75 echiv. acetat de vinil, 60 °C). Biocatalizatorul SwCNT-CaL-B și-a păstrat activitatea inițială chiar și după 10 cicluri de reacție consecutive, demonstrând astfel posibilitatea de utilizare a acestuia în procese de KR ale ariletan-1-olilor la scară preparativă. (**Figura 8.**)

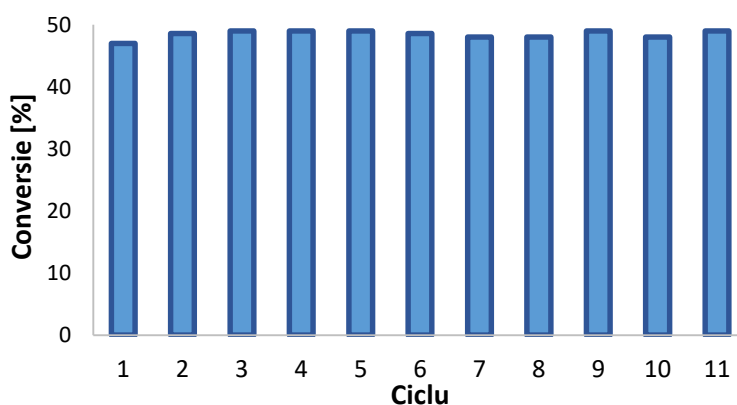


Figura 8. Conversiile obținute cu ajutorul SwCNT-CaL-B după 1 h, în cicluri consecutive de reacție

3.2.5. Acilarea *rac-a* catalizată de lipază în flux continuu

Reactorul a fost umplut complet cu biocatalizator uscat sub vid. Reactorul închis a fost plasat vertical și *n*-hexanul a fost pompat prin partea de jos a reactorului. După ce aerul a fost îndepărtat din reactor, s-a testat compresibilitatea stratului de biocatalizator. Pentru a efectua

acest test, debitul de hexan a fost crescut treptat de la 0.1 la 5 mL/min, determinând o creștere a căderii de presiune în reactor cu doar ~1.5 bar. În consecință, reactorul a fost atașat invers și s-a efectuat același experiment (creșterea debitului de hexan), ajungând la aceleași rezultate ca cele observate anterior - aceeași cădere de presiune odată cu creșterea debitului. La analiza vizuală a reactorului, nu s-a remarcat compresia stratului de catalizator.

3.2.5.1. Influența temperaturii și a concentrației substratului asupra acilării enzimatică a substratului model (*rac-a*) în flux continuu

În acest set de experimente, s-a urmărit investigarea influenței temperaturii asupra acilării catalizate de SwCNT-CaL-B a *rac-a* (2 mg/mL) cu acetat de vinil (0.75 echiv.). În concordanță cu experimentul efectuat în sistem discontinuu, în acest caz, intervalul de temperatură a fost variat de la 30 °C la 60 °C, biocatalizatorul expunând aceeași scădere a activității în jurul a 40 °C (**Figura 9**).

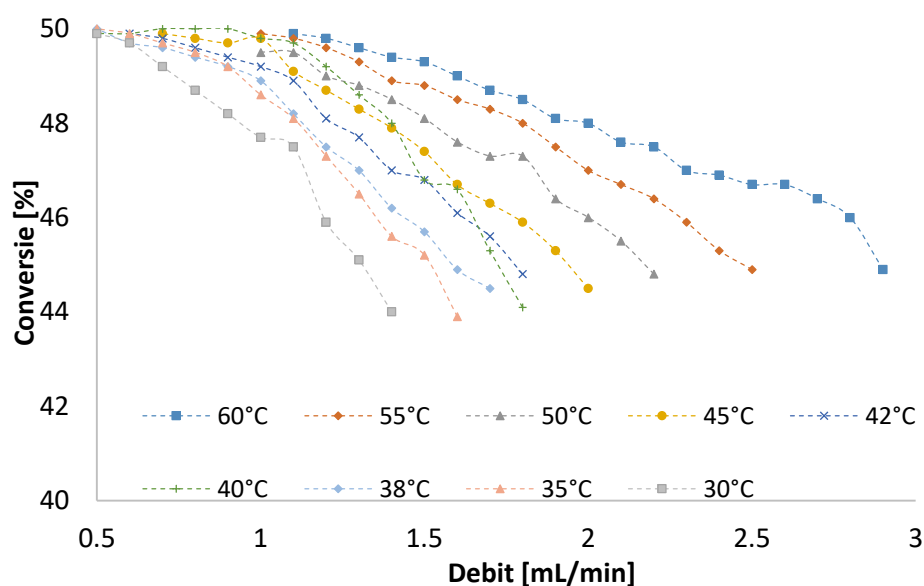
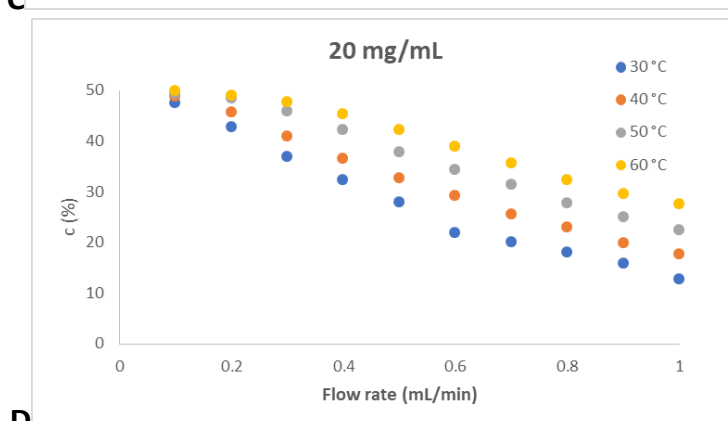
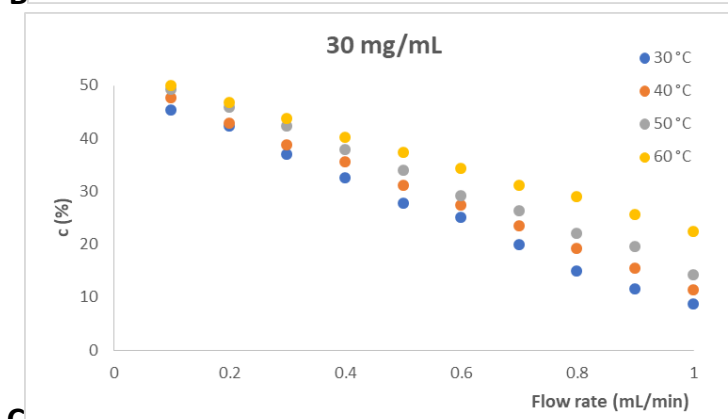
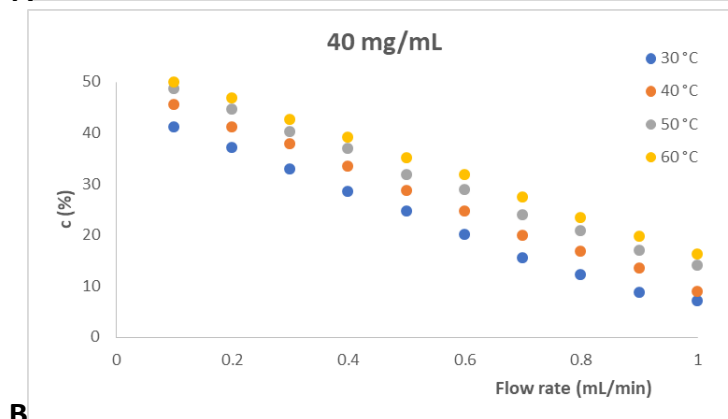
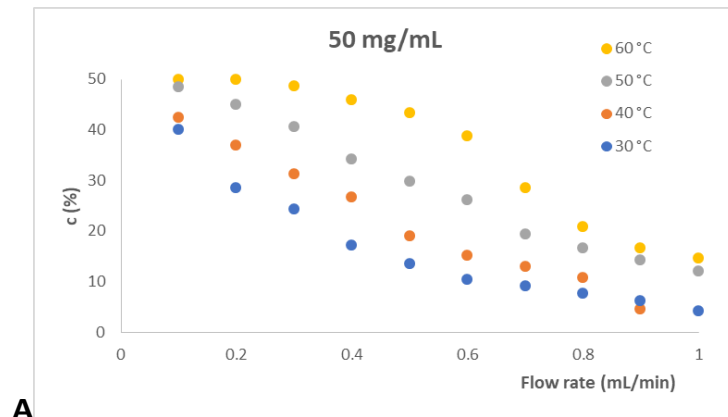
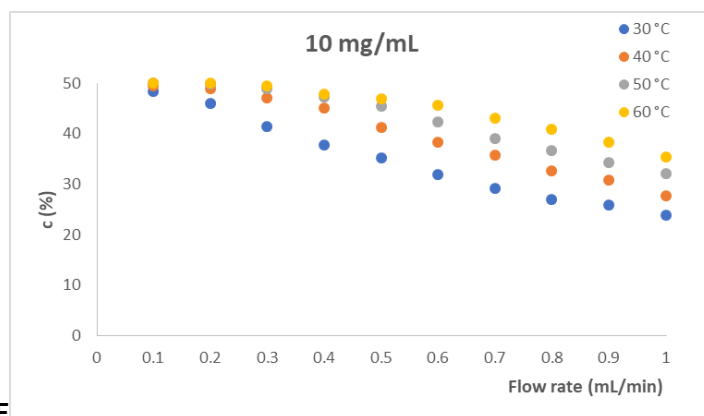


Figura 9. Performanța catalitică a SwCNT-CaL-B în KR a *rac-a* (2 mg/mL) cu acetat de vinil (0.75 echiv.) la diferite temperaturi, în *n*-hexan, în regim continuu

În cele ce urmează, s-a urmărit îmbunătățirea productivității sistemului de rezoluție cinetică în flux continuu. În acest scop, concentrația de *rac-a* a fost crescută (la 10, 20, 30, 40 și 50 mg/mL) (acetat de vinil 0.75 echiv.) și s-a investigat influența concentrației substratului asupra conversiei la diferite debite (0.1 -1 mL/min) și valori ale temperaturii (30-60 °C) (**Figura 10A-E**).



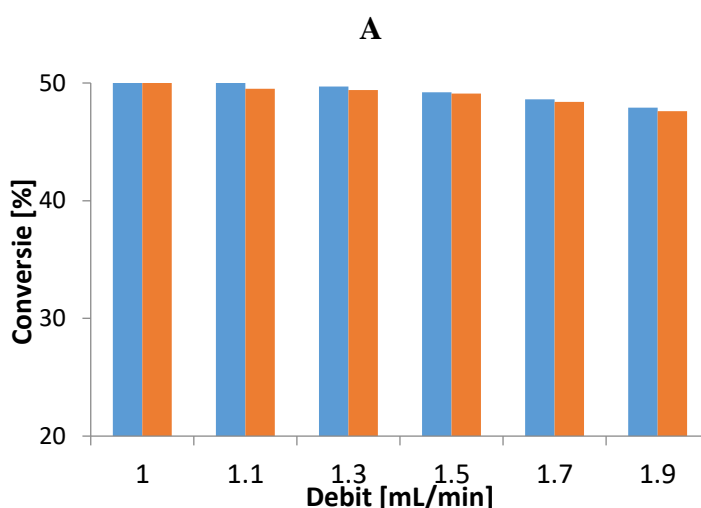


E

Figura 10A-E. Efectul debitului la diferite concentrații de substrat (*rac-a*) (50, 40, 30, 20 și 10 mg/mL) și temperaturi (30, 40, 50 și 60 °C) asupra conversiei (*c*) rezoluției cinetice în flux continuu. Condiții de reacție: 70 mg SwCNT-CaL-B, *n*-hexan, 0.75 echiv. acetat de vinil

3.2.5.2. Acilarea *rac-a-f* în flux continuu catalizată de lipază

Pentru a demonstra aplicabilitatea largă a SwCNT-CaL-B, experiența dobândită în dezvoltarea reacțiilor în sistem discontinuu pentru *rac-c-f* a fost transferată implementării acestor reacții în sistem continuu. Datorită asemănării structurale dintre *rac-a* și *rac-b*, feniletan-1-olul substituit cu metil a fost exclus din experimentele în flux continuu. Alcoolii *para*-halogenați (*rac-c, d*) au fost substraturi potrivite pentru CaL-B imobilizat (**Figura 11A.**), iar rezoluția cinetică a nitro-feniletan-1-olilor (*rac-e-f*) s-a dovedit a fi mai lentă, ceea ce se reflectă în debitele mai mici necesare pentru obținerea conversiilor dorite (**Figura 11B.**).



A

B

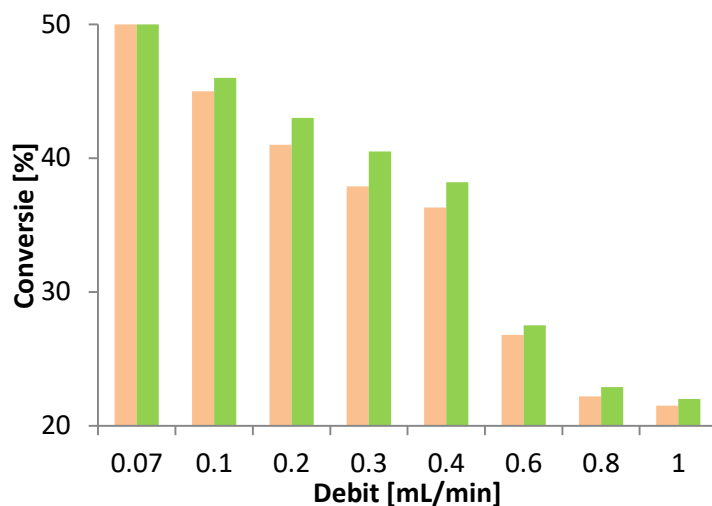
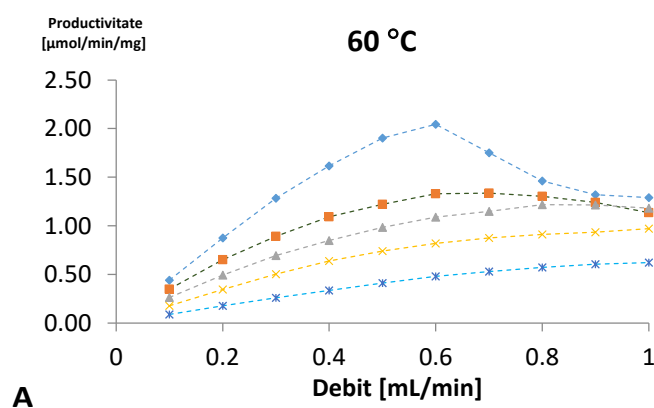


Figure 11. Acilarea în flux continuu a (A): *rac-c* (bare albastre) și *rac-d* (bare roșii) și (B): *rac-e* (bare portocalii) și *rac-f* (bare verzi) cu SwCNT- CaL-B. Condiții de reacție: solventul organic menționat anterior, 0.75 echiv. acetat de vinil, 2 mg/mL *rac-c-f*, 60 °C, 70 mg SwCNT-CaL-B

Productivitatea (r_{cont} , $\mu\text{mol/mL} \times \text{mg}$) sistemului cu cel mai performant biocatalizator (SwCNT-CaL-B) a fost calculată pentru rezoluția cinetică a substratului model (*rac-a*) pentru toate cele cinci concentrații de substrat (10, 20, 30, 40 și 50 mg/mL) și la toate cele patru temperaturi (30, 40, 50 și 60 °C), în intervalul debitului de la 0.1 – 1 mL/min (Figura 12. și Ecuația (1)).

$$r_{\text{cont}} = \frac{[P] \times f}{m_e} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{mg}} \right] \quad (1)$$



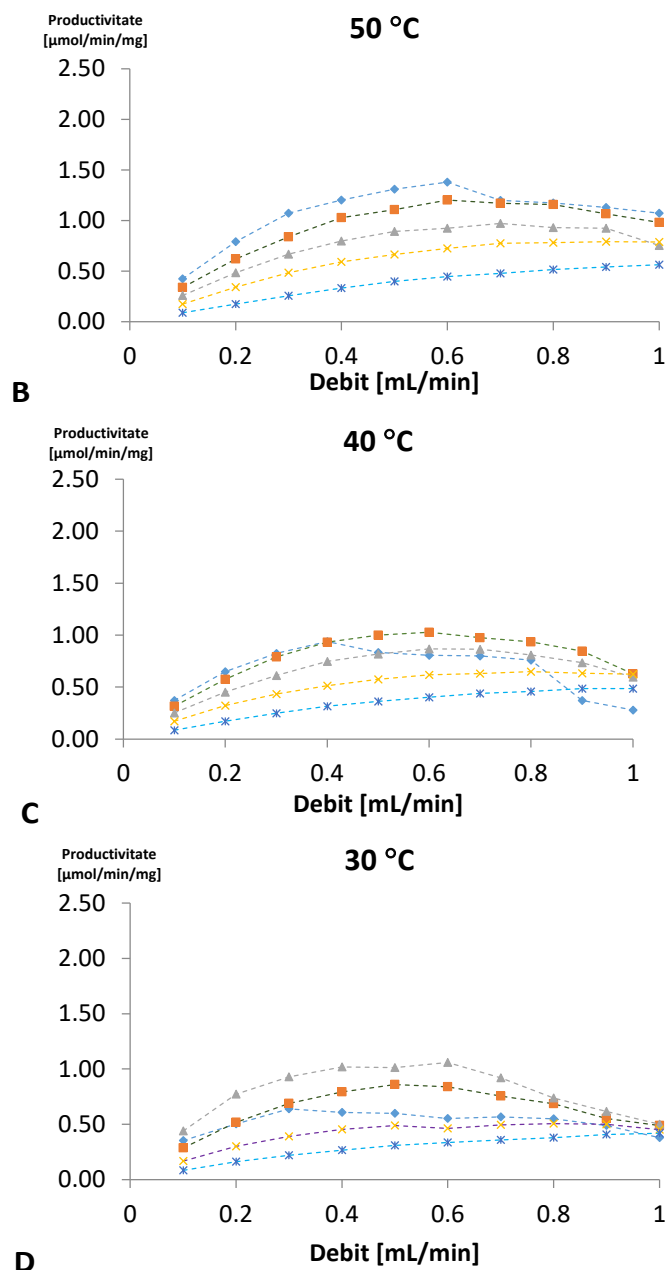


Figure 12. Variația productivității ($\mu\text{mol}_{\text{produs}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ biocatalizator) a SwCNT-CaL-B în funcție de debit, la diferite temperaturi și concentrații de substrat (\blacklozenge 50 mg mL⁻¹; \blacksquare 40 mg mL⁻¹; \blacktriangle 30 mg mL⁻¹; \times 20 mg mL⁻¹; $*$ 10 mg mL⁻¹).

În ecuația (1), m_e este greutatea biocatalizatorului din reactor (în mg), $[P]$ este concentrația (R)-1a (dată ca $\mu\text{mol}/\text{mL}$, calculată din concentrația și conversia substratului) și f este debitul (mL/min).

Productivitatea maximă a sistemului a fost obținută la 60 °C, cu o concentrație de substrat model de 50 mg/mL la un debit de 0.6 mL/min. S-a determinat ca fiind 2.04 $\mu\text{mol mL}^{-1}$

$^1\text{mg}^{-1}$. În **Figura 13** se poate urmări productivitatea sistemului în funcție de debit, concentrația substratului și temperatură.

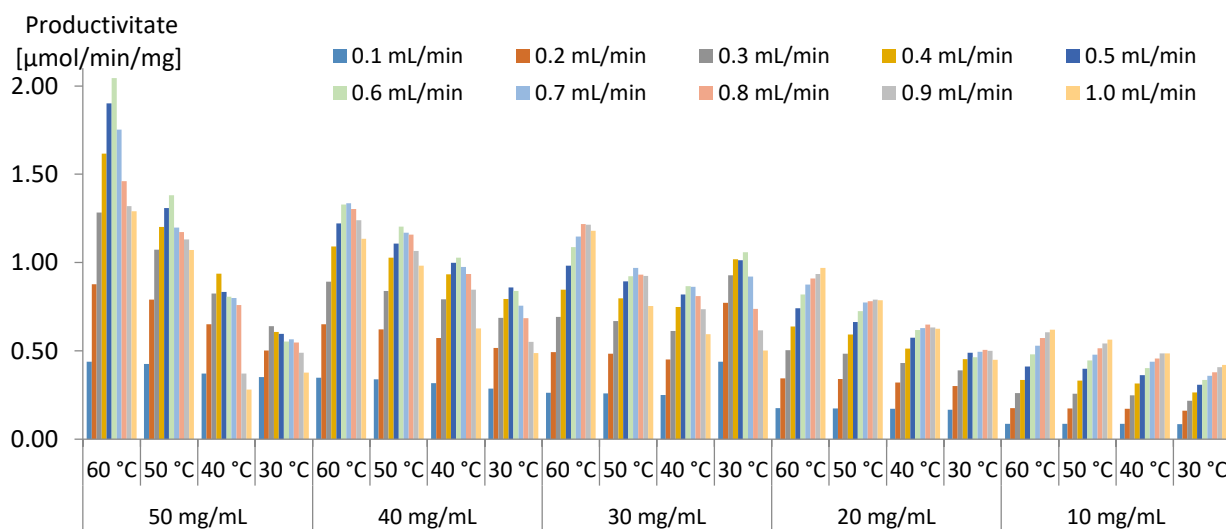


Figura 13. Productivitatea SwCNT-CaL-B în sistem continuu

Acilarea în flux continuu a decurs cu enantioselectivitate excelentă în toate experimentele, produsul obținându-se cu exces enantiomeric maxim ($ee_p > 99\%$).

3.2.6. Concluzii

În acest studiu, s-a demonstrat aplicabilitatea eficientă a imobilizării covalente pe nanotuburi de carbon cu un singur perete, funcționalizate, a lipazei B din *Candida antarctica*. Catalizatorul menționat anterior a fost activ și selectiv atât în flux continuu, cât și în mod discontinuu pentru rezoluția cinetică enzimatică a diferiților aril-alcooli secundari. Rezultatele experimentale au dovedit faptul ca biocatalizatorul SwCNT-CaL-B a prezentat reproductibilitate ridicată în ceea ce privește activitatea și stereoselectivitatea. Procedura optimizată dezvoltată, cu productivitate ridicată, a fost adecvată pentru producerea de alcooli și acetati enantiopuri. Biocatalizatorul în cantitate de ~ 70 mg încărcat în reactor a permis rezoluția cinetică la scară de o sută de grame a enantiomerilor vizați, subliniind în acest fel stabilitatea operațională pe termen lung a SwCNT-CaL-B.

3.3. Lipaze în rezoluția cinetică dinamică a aminelor în flux continuu

3.3.1. Experimente de racemizare

Pe lângă catalizatorul disponibil comercial, 10% Pd/C, au fost produși și testați ca agenți de racemizare șase catalizatori eterogeni suplimentari: Pd/BaCO₃,⁶¹ Pd/Al(O)OH,⁶² Pd/BaSO₄, Pd/AMP-D, Pd/AEAP-D și Pd/AMP-KG (pe silice derivatizat cu 3-aminopropil și 3-(2-aminoetilamino)propil⁶³, suporturi sintetizate). Experimentele de racemizare au fost efectuate cu catalizatorii menționați mai sus în reactoare din oțel inoxidabil. În prima serie de teste de racemizare, microreactoarele au fost umplute cu diferiți catalizatori și o soluție de (S)-1-feniletilamină (S)-**2a** și formiat de amoniu (utilizat ca sursă de hidrogen), care împreună au fost pompate prin reactor la temperaturi ridicate (60, 90 și 120 °C). În toate cazurile, experimentele de racemizare au fost monitorizate și din efluent s-au determinat compoziția enantiomerică [*ee*_{(S)-**2a**] a **2a** și selectivitatea (*sel*_{(R,S)-**2a**}). La 120 °C selectivitatea catalizatorilor pe bază de Pd a fost scăzută (*sel*_{(R,S)-**1a**} < 5%). În cadrul testelor efectuate la 90 °C pot fi observate grade de racemizare (*ee*_{(S)-**2a**} < 15%) și selectivități (*sel*_{(R,S)-**2a**} = 2–74%) ușor îmbunătățite (**Tabelul 3.**).}

Tabelul 3. Racemizarea (S)-**2a** mediată de catalizatori pe bază de Pd în reactoare continue în strat fix la 90 °C

Nr. crt.	catalizator	<i>ee</i> _{(S)-2a} (%) ^a	<i>sel</i> _{(R,S)-2a} (%) ^{a,b}
1	Pd/BaSO ₄	-	-
2	10% Pd/C	>99	2
3	Pd/BaCO ₃	13	41
4	Pd/AlO(OH)	4	98
5	Pd/AEAP-D	2	74
6	Pd/AMP-D	<1	9

^aDeterminat prin GC. ^b*sel*_{(R,S)-**2**} (%) = cantitate de (R,S)-**2a** / cantitate de compuși detectabili în amestecul de reacție × 100.

Având în vedere faptul că temperaturile sub 70 °C s-au dovedit a fi compatibile cu lipaza B din *Candida antarctica* (CaLB)⁶⁴ imobilizată, studiile amănunțite de racemizare au fost efectuate la această temperatură (**Tabelul 4**, rândurile 1-7).

Tabelul 4. Rezultatele racemizărilor (*S*)-**2a**, (*S*)-**2h** și (*S*)-**2i** mediate de catalizatori pe bază de Pd într-un reactor continuu în strat fix, folosind formiat de amoniu ca sursă de hidrogen^a

Nr. crt.	amină	catalizator ^b	<i>ee</i> _{(<i>S</i>)-2a} (%) ^c	<i>sel</i> _{(<i>R,S</i>)-2a} (%) ^{c,d}
1	(<i>S</i>)- 2a	10% Pd/C	>99	13
2	(<i>S</i>)- 2a	Pd/AlO(OH)	57	99
3	(<i>S</i>)- 2a	Pd/AEAP-D	36	95
4	(<i>S</i>)- 2a	Pd/BaCO ₃	6	66
5	(<i>S</i>)- 2a	Pd/BaSO ₄	1	68
6	(<i>S</i>)- 2a	Pd/AMP-D	5	90
7	(<i>S</i>)- 2a	Pd/AMP-KG	2	94
8	(<i>S</i>)- 2a	Pd/AMP-KG ^e	3	95
9	(<i>S</i>)- 2h	Pd/AMP-KG ^e	99	93
10	(<i>S</i>)- 2i	Pd/AMP-KG ^e	99	90

^aRândurile 1-7: (*S*)-**2a** (69 mM), formiat de amoniu (1.0 echiv., 69 mM) în 2-metil-2-butanol uscat, la 60 °C, cu un debit de 20 μL min⁻¹; Rândurile 8-10: (*S*)-amine [(*S*)-**2a**, (*S*)-**2h** sau (*S*)-**2i**: (69 mM), formiat de amoniu (1.2 echiv., 83 mM) în 2-metil-2-butanol uscat, la 60 °C, cu un debit de 10 μL min⁻¹. ^bCantitățile de catalizatori din reactor sunt date în teză. ^cDeterminat prin GC. ^d*sel*_{(*R,S*)-1}= cantitate de (*R,S*)-2/cantitate de compuși detectabili în amestecul de reacție × 100 (%). ^eRândurile 8-10: vezi cantitățile de catalizatori din reactor în teză.

La 60 °C, 10% Pd/C a convertit (*S*)-**2a** în principal în produși secundari (*sel*_{(*R,S*)-2a} = 13%), fără racemizare (*ee*_{(*S*)-2a} > 99%; **Tabelul 1**, rândul 1). Interesant, cu ceilalți catalizatori pe bază de Pd (**Tabelul 4**, rândurile 2-7) s-au înregistrat diferite grade de racemizare (*ee*_{(*S*)-2a} = 1–57%) și selectivitate (*sel*_{(*R,S*)-2a} = 66-99%). Pd/AMP-KG s-a dovedit a fi cel mai util catalizator de racemizare la 60 °C (*ee*_{(*S*)-2a} = 2%), având o selectivitate bună (*sel*_{(*R,S*)-2a} = 94%; **Tabelul 4**, rândurile 7).

Apoi, un preparat enzimatic robust obținut prin includerea în sol-gel a lipazei B din *Candida antarctica* (CaLB-TDP10) a fost testat cu cel mai încurajator agent de racemizare (Pd/AMP-KG) într-un reactor cu strat fix, mixt, de catalizator (coloana B). S-a dorit să se verifice compatibilitatea condițiilor reacției de racemizare cu enzima imobilizată. S-au testat reacțiile de racemizare a (*S*)-**2a** și a două amine nebenzilice, (*S*)-**2h** și (*S*)-**2i**. Testele au evidențiat racemizarea lină și eficientă a (*S*)-**2a** cu Pd/AMP-KG chiar și în prezența CaL-B-TDP10 (*ee*_{(*S*)-2a} = 3% cu *sel*_{(*R,S*)-2a} = 95 %: rândul 8 din **Tabelul 4**), totuși aminele nebenzilice nu au putut fi racemizate (*ee*_{(*S*)-2a} ≥ 99%: rândurile 9,10 din **Tabelul 4**). Datorită apariției

aminării reductive a aminelor nebenzilice cu catalizatori de Pd (cu ajutorul formiatului de amoniu) chiar și la 40 °C, oxidarea slabă poate fi motivul racemizării inexistente a aminelor nebenzilice.

Pentru a elimina toate obstacolele observate în timpul experimentelor preliminare pentru DKR a 1-feniletanaminei *rac-2a* în flux continuu (vezi Secțiunea 5.2), următoarele elemente cheie au fost utilizate în sistemul DKR final [$n=1$ sau 2 în **Figura 14.**, panoul b)]: i) în etapa catalizată de enzimă, 2-etoxiacetatul de izopropil (**4**) a fost selectat ca agent eficient de acilare a aminei; ii) a fost introdusă o coloană pentru KR (coloana A, umplută numai cu CaLB-TDP-10) pentru a minimiza cantitatea de etoxiacetamidă formată (**5**); iii) Pd/AMP-KG (catalizator de racemizare); iv) 2-metil-2-butanol a fost înlocuit cu un amestec de 2-metil-2-butanol/toluen 1:1 (v/v) (pentru a îmbunătăți solubilitatea aminelor mai hidrofile *rac-2c-e* în soluția A) ; v) s-a aplicat presiune la ieșirea coloanei B; vi) coloana B (Pd/AMP-KG) a fost preactivată cu un flux de soluție de formiat de amoniu (timp de 30 min).

În sistemul descris anterior, peste coloana pentru KR (coloana A: CaLB-TDP-10) a fost pompată soluția A (*rac-2a* și **4**). Efluentul (conținând cantități aproape echimolare de amidă (*R*)-**3a** și amina nereacționată (*S*)-**2a**) a fost unit cu soluția B (formiat de amoniu în 2-metil-2-butanol uscat) într-o valvă cu trei căi care duce către o coloană cu strat fix, mixt, de catalizatori (coloana B: Pd/AMP-KG+CaLB-TDP10). A fost examinat efectul formiatului de imidazoliu ca sursă de hidrogen (**Tabelul 5.**) și numărul de echivalenți de formiat de amoniu asupra DKR a *rac-2a* (**Tabelul 6.**).

Tabelul 5. Optimizarea sursei de hidrogen pentru DKR a *rac-2a* în sistem complet continuu^a

Nr. crt.	agent de acilare ^b (mM) [echiv.]	sursa de H ^c (mM) [echiv.]	<i>c</i> (%) ^d	<i>Y</i> (%)	ee _{(R)-3a} (%) ^d
1	180 [2.0]	AF, 54 [0.6]	>99 ^e	91	99.6
2	180 [2.0]	IF, 54 [0.6]	>99	90	97.5
3	180 [2.0]	IF, 27 [0.3]	80	75	97.7
4	135 [1.5]	IF, 54 [0.6]	>99	90	98.4
5	108 [1.2]	IF, 54 [0.6]	>99	91	98.3

^aCondiții – cantitatea de umplutură: coloana A: M540-CaLB (209 mg), coloana B: M540-CaLB (120 mg) amestecat cu Pd/AMP-D (120 mg); debite: 5-5 μL min⁻¹; la 60 °C. b) Soluția A: *rac-2a* (90 mM) și izopropil 2-etoxiacetat (**4**) în 2-metil-2-butanol uscat. c) Soluția B: sursa de hidrogen AF: formiat de amoniu, IF: formiat de imidazoliu [echiv. față de *rac-2a*] în 2-metil-2-butanol uscat. d) Determinat prin GC. e) Formarea 2-etoxiacetamidei (**5**) a fost observată.

Tabelul 6. Optimizarea cantității de formiat de amoniu pentru DKR a *rac-2a* în sistem complet continuu^a

Nr. crt.	HCOONH ₄ (echiv.)	<i>ee</i> _{(S)-2a} (%) ^b	<i>ee</i> _{(R)-3a} (%) ^b	conv. (%) ^b	randament (%)
1	0.2	n.d. ^c	99.9	>99	63
2	0.3	n.d. ^c	99.9	>99	88
3	0.4	n.d. ^c	99.9	>99	92
4	0.6	n.d. ^c	99.9	>99	96

^aSoluția A: *rac-2a* (138 mM) și **4** (2 echiv., 276 mM) în 2-metil-2-butanol/toluen 1:1 (v/v) uscat, debit de 5 μL min⁻¹ și Soluția B: formiat de amoniu în 2-metil-2-butanol, debit de 5 μL min⁻¹, presiunea de 30 psi, 60 °C.

^bDeterminat prin GC. ^cNu a fost detectat.

Cel mai performant sistem pentru DKR a *rac-2a* (temperatura: 60 °C; debit: 5 μL min⁻¹ în toate pompele, 0.6 echiv. formiat de amoniu) a furnizat (*R*)-**3a** cu un randament de izolare ridicat (96%) și exces enantiomeric excelent (>99%) (**Tabelul 7**, rândul 1).

Tabelul 7. DKR chemoenzimatic a șapte amine benzilice, *rac-2a-g*, în sistem complet continuu^a

Nr. crt. ^a	amină	n	<i>T</i> (°C)	<i>p</i> (psi)	<i>ee</i> _{(S)-2a-f} (%) ^b	<i>ee</i> _{(R)-3a-f} (%) ^b	conv. (%) ^b	randament (%)
1	<i>rac-2a</i>	1	60	30	n.d. ^c	99.9	>99	96
2	<i>rac-2b</i>	1	60	30	92.0	99.5	61.9	60
3	<i>rac-2c</i>	2	60	30	63.3	98.9	63.5	60
4	<i>rac-2d</i>	1	60	30	8.3	99.3	96.7	86
5	<i>rac-2e</i>	2	60	30	74.4	99.2	65.0	57 ^d
6	<i>rac-2f</i>	1	60	30	9.7	99.9	72.0	67
7	<i>rac-2g</i>	0 ^e	70	100	98(59) ^f	99.1(99.3) ^g	63(75) ^h	n.i. ⁱ

^aRândurile 1-6: Soluția A: *rac-2a-f* (138 mM) și **3** (2 echiv., 138 mM) în 2-metil-2-butanol/toluen 1:1 (v/v) uscat, debit de 5 μL min⁻¹ și Soluția B: formiat de amoniu (0.6 echiv.) în 2-metil-2-butanol, debit de 5 μL min⁻¹.

^bDeterminat prin GC (detalii în teză). ^cNu a fost detectat. ^d4-Etil-1,1'-bifenil a fost izolat ca produs secundar. ^eRândul 7 (n=0): fără coloana A, *rac-2g* (138 mM), **4** (2 echiv., 138 mM) și formiat de amoniu (0.6 echiv.) în 2-metil-2-butanol uscat a fost pompat direct în coloana B cu debitul de 10 μL min⁻¹. ^f*ee*_{(S)-2g} (valoarea *ee*_{(S)-2a} este între paranteze). ^g*ee*_{(S)-3g} (valoarea *ee*_{(S)-3a} este între paranteze). ^h*c*_{(S)-3g} (conversia la (*S*)-**3g** + (*S*)-**3a** este dată între paranteze). ⁱn.i.: nu a fost izolat.

De asemenea, după DKR a *rac-2a* în flux continuu, acest sistem a fost supus și altor amine benzilice având proprietăți sterice și electronice diferite pentru a evalua toleranța la substrat a procesului (**Figura 14.**). Existența grupărilor funcționale reductibile, prin hidrogenare prin transfer cu catalizatorul de racemizare, a fost impedimentul cel mai evident al acestui tip de proces DKR. Experimentele cu feniletan-1-amine 4-cloro-, 4-bromo- și 4-nitro-substituite au evidențiat reducerea acestor grupări în condițiile de racemizare, aceste substraturi fiind inadecvate pentru acest tip de proces DKR.

În continuare, procesul de DKR a fost investigat cu șase amine benzilice de interes mare, *rac-2b-g*. Pentru procesul KR a *rac-2a-f* cu o singură coloană umplută cu CaLB-TDP10 ($n = 1$ pentru coloana A din **Figura 14.**) s-au înregistrat conversii de aproape 50%. Pe de altă parte, în cazul aminelor mai voluminoase *rac-2c* și *rac-2e*, un singur reactor pentru KR a dat conversii mediocre ($n=1$: 34% pentru *rac-2c* și 25% pentru *rac-2e*). Pentru transformarea substraturilor menționate mai sus, a fost aplicat un sistem cu două coloane pentru KR ($n= 2$, coloana A în **Figura 14.**). S-a urmărit atingerea unei conversii de aproape 50% pentru partea KR (coloana A) a sistemelor DKR.

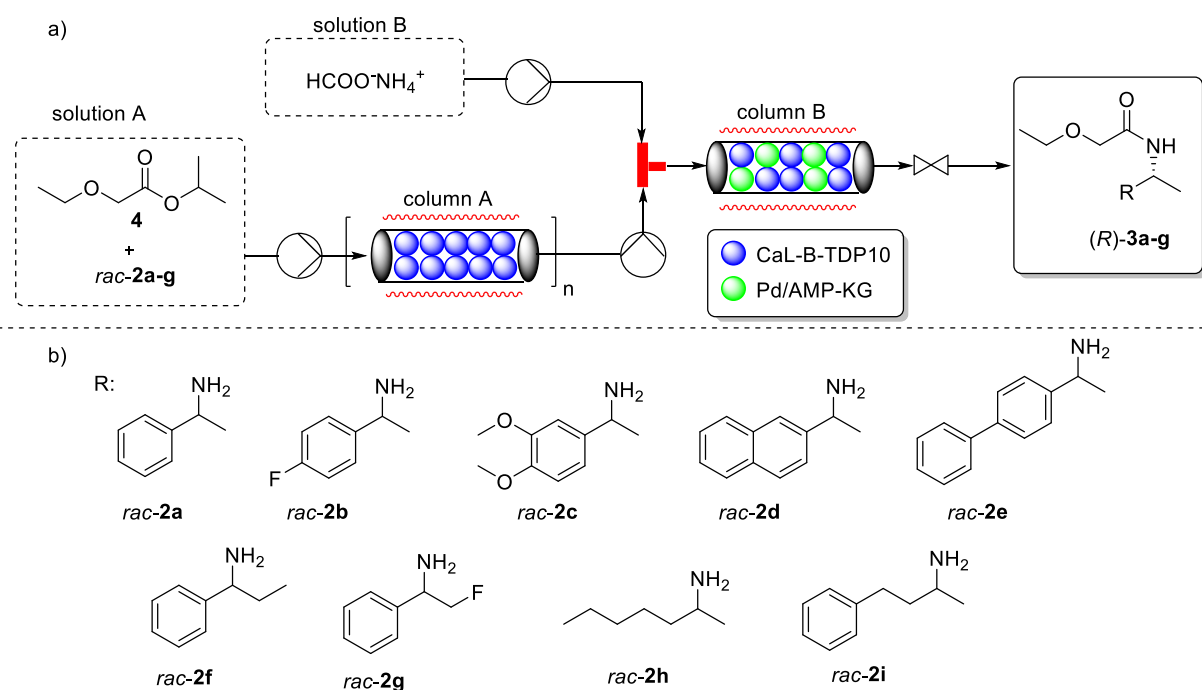


Figura 14. Sistemul complet continuu dezvoltat

Performanța de racemizare a putut fi dedusă din compoziția enantiomerică a aminei reziduale ($ee_{(S)-2a-g}$). Racemizarea eficientă a avut loc în cazul DKR a *rac-2a* (nu a rămas **2a**, **Tabelul 7**, rândul 1), *rac-2d* ($ee_{(S)-2a} = 8.3\%$, **Tabelul 7**, rândul 4), și *rac-2f* ($ee_{(S)-2f} = 9.7\%$, **Tabelul 7**, rândul 6). Prin urmare, s-au obținut conversii și randamente mari până la excelente

în procesele de DKR ale acestor substraturi (**Tabelul 7**, intrările 1,4,5). Efectul inductiv pozitiv ușor pronunțat al grupării etil atașată în poziție benzoilică (*rac-2f*) nu a inhibat racemizarea. În cazul *rac-2f*, conversia redusă a DKR este o consecință directă a scăderii vitezei de reacție a KR, comparativ cu cea observată în cazul *rac-2a*.

După cum era de așteptat, în cazul substraturilor cu substituenți donori de electroni, cum ar fi *rac-2c* (cu substituenții 3,4-metoxi) sau *rac-2e* (cu substituentul 4-fenil), racemizarea nu a decurs foarte bine ($ee_{(S)-2c} = 63.3\%$ și $ee_{(S)-2e} = 74.4\%$; **Tabelul 7**, rândurile 3 și 5). S-a observat faptul că substituentul 4-fluoro (*rac-2b*) a avut un impact negativ semnificativ asupra racemizării ($ee_{(S)-2b} = 92.0\%$, **Tabelul 7**, intrarea 2). Eficiența moderată a racemizării a dus la randamente izolate modeste (57-60%), totuși în cazul DKR a *rac-2b,c,e* au putut fi observate purități enantiomerice excelente ($ee \geq 98.9\%$).

În cazul procesului de DKR a *rac-2g* (având un atom de fluor într-o poziție alifatică) s-a observat că fluorul a fost redus parțial de agentul de racemizare în condițiile de proces selectate (0.6 echiv. de $\text{HCOO}^-\text{NH}_4^+$, 100 psi, 70 °C: **Tabelul 7**, rândul 7). În acest caz, ca și în cazul anterior, puritățile enantiomerice ale produsului care conține fluor (*R*)-**3g** și ale produsului secundar dehalogenat (*R*)-**3a** au fost excelente ($ee_{(S)-2g}$ și $ee_{(S)-2g} > 99\%$), cu toate acestea, compoziția enantiomerică a substratului halogenat rezidual ($ee_{(S)-2g} = 59\%$) a arătat o eficiență de racemizare medie pentru (*S*)-**2g**.

3.3.2. Stabilitatea operațională

În general, în cazul unui sistem catalitic operat în flux continuu, durabilitatea acestuia poate fi definită prin stabilitatea operațională. În consecință, sistemul DKR pornind de la *rac-2a* la (*R*)-**3a** a fost realizat și supravegheat la 60 °C timp de 48 de ore, demonstrând o stabilitate operațională excelentă (**Figura 15**). Sistemul construit a fost stabil timp de cel puțin 2 zile, producând continuu (*R*)-**3a** enantiopur ($ee_{(S)-2a} > 99,8\%$) cu o productivitate de 103 kg m⁻³ zi⁻¹.

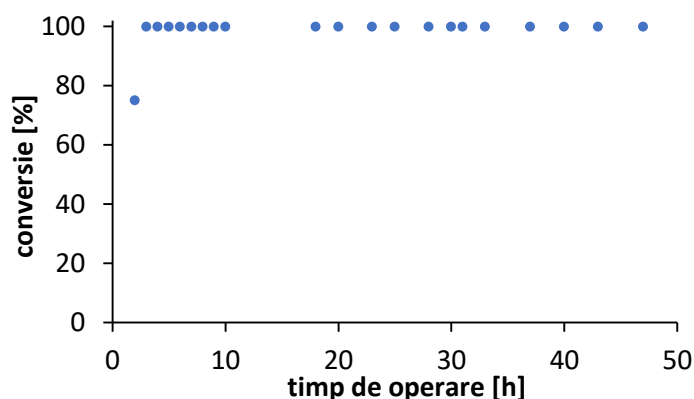


Figura 15. Stabilitatea operațională a sistemului DKR Pd/AMP-KG–CaLB-TDP10 (operat continuu) pentru 1-feniletan-1-amina (*rac-2a*) [conversia GC (●) este prezentată pentru sistemul DKR operat în condițiile din **Tabelul 7** timp de 48 h]

3.3.3. Concluzii

În concluzie, noul sistem prezentat descrie pentru prima dată DKR în flux complet continuu a aminelor benzilice racemice (*rac-2a-f*). Sistemul de rezoluție cinetică dinamică a implicat o lipază robustă (CaLB-TDP10) pentru rezoluția cinetică și un agent blând de racemizare cu paladiu pe silice grefată cu aminopropil (Pd/AMP-KG). Ca sursă de hidrogen a fost utilizat formiatul de amoniu, care s-a dizolvat complet în 2-metil-2-butanol, astfel încât a putut fi utilizat la temperaturi relativ ridicate (60-70 °C). În acest studiu, s-a evidențiat că acest proces de racemizare a fost eficient pentru aminele benzilice care nu conțin funcțiuni susceptibile la reducere. Sistemul DKR dezvoltat a conținut: 1 sau 2 coloane cu umplutură de CaLB-TDP10 (unitate KR) și o coloană umplută cu Pd/AMP-KG+CaLB-TDP10 (unitate de rezoluție cinetică dinamică în strat mixt). Acesta a fost aplicat cu succes pentru conversia diferitelor amine benzilice valoroase *rac-2a-f* în amide (*R*)-**3a-f** cu randamente de izolare medii până la ridicate (57-96%) și purități enantiomerice excelente (>98.8%).

3.4. Tranzaminaze (TA) în rezoluția cinetică a aminelor

3.4.1. Identificarea de noi TA

Căutarea genelor pentru transaminazele (*S*)- sau (*R*)-selective a fost efectuată pe NCBI (Centrul Național de Informații Biotehnologice) utilizând motivele bine conservate ale: TA (*S*)-selective din *Vibrio fluvialis* (F2XBU9, *Vf*-TA); *Chromobacterium violaceum* (Q7NWX4, *CvS*-TA); *Halolamina sediminis* (A0A1J0VCU3, *Hs*-TA) și *Halomonas elongata* (E1V913, *He*-TA) sau TA (*R*)-selective din *Capronia semiimmersa* TA (A0A0D2DZI3, *Cs*-TA); *Arrobacter* sp. (F7J696, *Ar*-TA) și *Thermomyces stellatus* TA (pdb: 6XWB_A, *Ts*-TA).

Identitatea secvenței de aminoacizi a transaminazei (*S*)-selective selectată, TA din *Pseudomonas psychrotolerans* (*PpS*-TA), la *CvS*-TA, *Vf*-TA, *He*-TA și *Hs*-TA a fost de 55.3%, 36.2%, 64.4% și, respectiv, 61.3%, evidențiind cel mai recent ancestor cu *He*-TA și *Hs*-TA. Identitatea secvenței de aminoacizi a transaminazei (*R*)-selective selectată, TA din *Sinorhizobium* sp. (*SrR*-TA), la *Cs*-TA, *Ar*-TA și *Ts*-TA este de 40%, 54.9% și, respectiv, 62.2%, dezvăluind cel mai recent ancestor cu *Ts*-TA.

Mai întâi s-a testat dacă noile TA pot accepta *rac*-**7a-d** ca donatori de amino. S-a ajuns la concluzia că toate aminele testate au fost substraturi pentru TA nou descoperite (**Figura 16**). Un aspect important este că niciunul dintre **6a-d** nu a acționat ca amino acceptor pentru TA menționate mai sus, întrucât nu a fost posibilă detectarea prezenței (*S*)- sau (*R*)-**7a-d** în procesul de sinteză asimetrică. În plus, aceștia au fost incubăți cu 10 echiv. de (*S*)- sau (*R*)-alanină și, de asemenea, nici în acest caz nu a fost identificat niciun produs amină. Aceasta a dus la posibilitatea supravegherii rezoluțiilor cinetice ireversibile prin HPLC chirală, evidențiind în acest fel enantioselectivitatea opusă a TA nou descoperite.

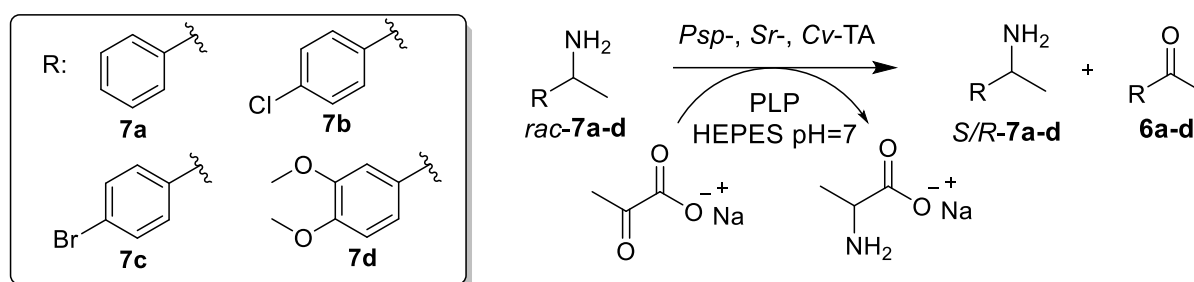


Figura 16. KR mediată de TA a *rac*-1-feniletilaminelor cu piruvat (utilizând enzimele purificate *Pps*-TA, *SrR*-TA și *CvS*-TA W60C)

3.4.2. Teste de activitate/stabilitate funcțională

3.4.2.1. pH-ul optim al noilor TA

În cazul transaminazelor (*S*)- și (*R*)-selective, activitatea lor a fost măsurată în procesul dorit de rezoluție cinetică (**Figura 16**), cu 1-feniletilamina (*rac*-**7a**) ca substrat model, în intervalul de pH 6.2-12 prin teste de activitate bazate pe determinări de viteze inițiale. Astfel, pentru *Pps*-TA cea mai mare activitate relativă a fost atinsă în intervalul de pH de la 9 la 11, care este un interval de pH considerabil mai larg în comparație cu alte TA^{65 66 67 68 69}. Pentru valori ale pH-ului >11.0 și <8.0 s-a observat o activitate enzimatică scăzută (**Figura 17a**). Măsurătorile de stabilitate termică au arătat că stabilitatea termică a TA (*S*)-selective este menținută într-un interval larg de pH, de la 6.5 la 9.5 (**Figura 17a**). La pH = 6.2 și pH > 11.0 stabilitatea structurală a enzimei scade, ceea ce este confirmat de scăderea temperaturilor de topire (T_m) la 39.5 și respectiv 43.5 °C (**Figura 17b**).

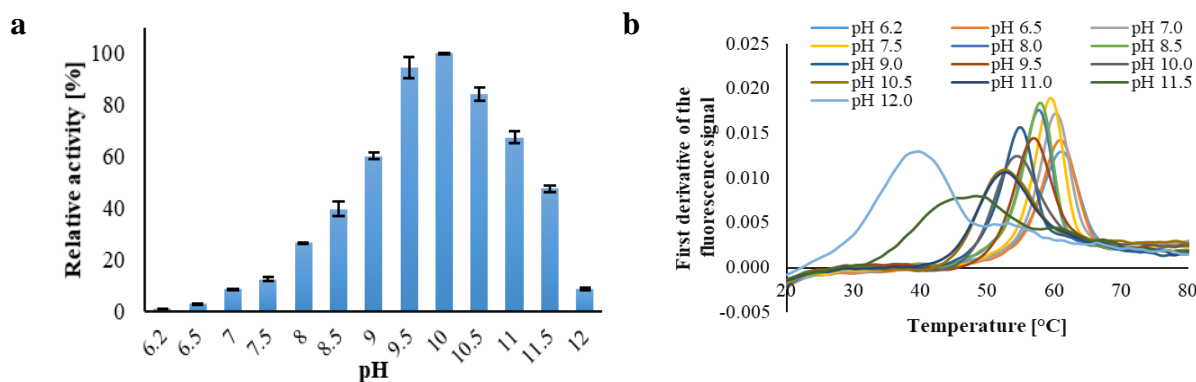


Figura 17. a) Efectul pH-ului asupra activității *PpS*-TA, **b)** curbele de denaturare termică a *PpS*-TA

În cazul TA (*R*)-selective, investigațiile privind efectul pH-ului asupra activității enzimatică au evidențiat un interval de pH mai restrâns. Activitatea maximă a fost observată la pH 7.5 și pentru valorile pH > 8.0 s-a observat o scădere a activității (**Figura 18a**). Măsurătorile de calorimetrie diferențială au arătat că *SrR*-TA are o stabilitate termică modestă, deși la pH = 6 s-a măsurat un T_m maxim de 49 °C (**Figura 18b**).

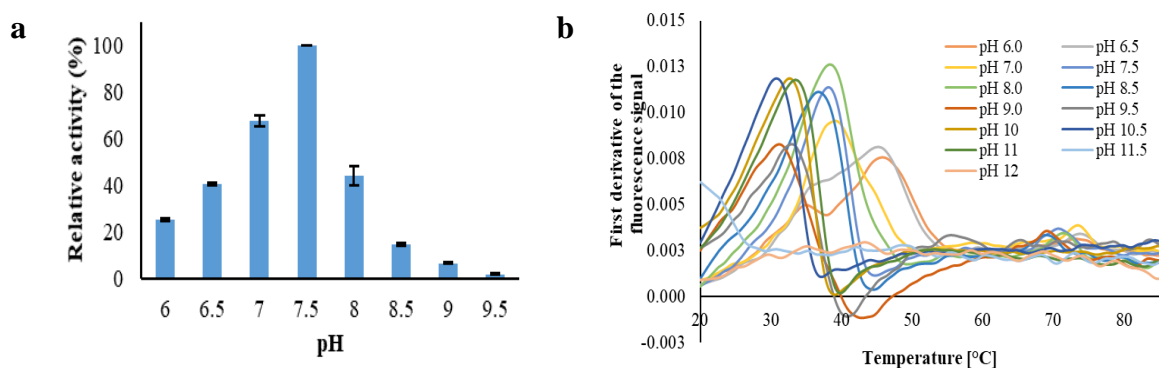


Figura 18. a) Efectul pH-ului asupra activității *SrR*-TA **b)** curbele de denaturare termică a *SrR*-TA la diferite valori de pH

3.4.2.2. Screening-ul de soluție tampon pentru procesul de rezoluție cinetică mediată de TA

În cadrul experimentelor de identificare a soluției tampon optime, rezoluția cinetică utilizată anterior a *rac-7a* a fost studiată în diferite soluții tampon (fosfat, HEPES, fosfat-soluție salină – 50 și 100 mM) la valoarea optimă a pH-ului, pH=7. Reacțiile biocatalitice efectuate cu *PpS*-TA în HEPES, au relevat, după 1 oră de reacție, o conversie de aproape 50%, în timp ce în cazul *SrR*-TA conversia de 38% s-a obținut după 22 de ore de reacție în HEPES (**Figura 19**). În cazul în care s-a folosit tampon PBS, în concentrație de 100 mM, s-au obținut valori

minime de conversie pentru ambii biocatalizatori. Pentru testele ulterioare s-a utilizat în ambele cazuri HEPES în concentrație de 50 mM.

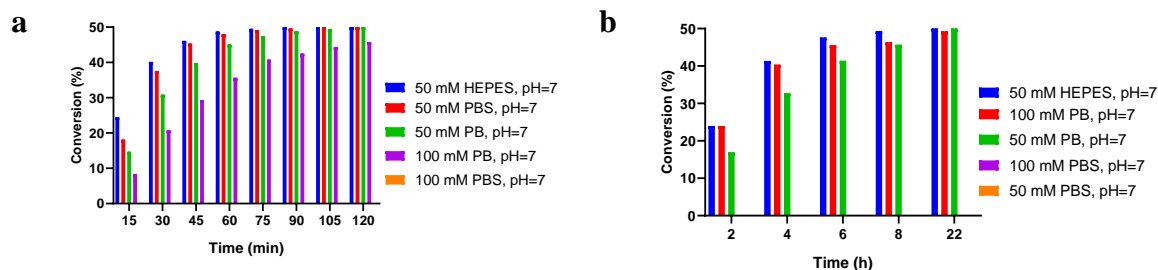


Figura 19. a) KR catalizat de *PpS*-TA, variația conversiei în timp în diferite soluții tampon la 40 °C; **b)** KR catalizat de *SrR*-TA, variația conversiei în timp în diferite soluții tampon la 25 °C

3.4.2.3. Stabilitatea termică a noilor biocatalizatori

S-a urmărit modificarea conversiei procesului de KR a substratului model *rac-7a* în condițiile stabilite anterior (50 mM, pH=7 tampon HEPES) la diferite temperaturi. În cazul *PpS*-TA intervalul de temperatură în care s-a înregistrat conversia a fost 20-55 °C iar pentru *SrR*-TA, 20-40 °C. În cadrul acestei investigații scopul nostru a fost și de a determina stabilitatea operațională a activității bazate pe conversie, în cazul incubării/operării (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 h și 22 h incubare) la temperaturile stabilite anterior (**Figura 17b.** și **Figura 18b.**). Aceste experimente ar putea dezvălui robustețea operațională a biocatalizatorilor.

Conversiile reacțiilor catalizate de *PpS*-TA au crescut odată cu creșterea temperaturii în intervalul 20-55 °C. Valorile maxime de conversie au fost obținute după 0.5 ore la 55 °C, iar în cazul 45 °C și 50 °C a fost necesar un timp de reacție de 1 oră pentru atingerea aceleiași conversii. Începând cu 6 ore de preincubare a biocatalizatorului la temperaturile menționate anterior, TA și-a menținut activitatea bazată pe conversie până la 45 °C ($c_{45^{\circ}\text{C}} = 49.3\%$), fiind urmată de o scădere semnificativă a activității în comparație cu valorile inițiale. În cele din urmă, incubările de 22 de ore au arătat un maxim local de $c_{40^{\circ}\text{C}} = 44.5\%$, care este cu 5% mai mic în comparație cu enzima neincubată la aceeași temperatură. Aceste informații evidențiază o stabilitate operațională în intervalul 20-45 °C pentru *PpS*-TA (**Figura 20.**).

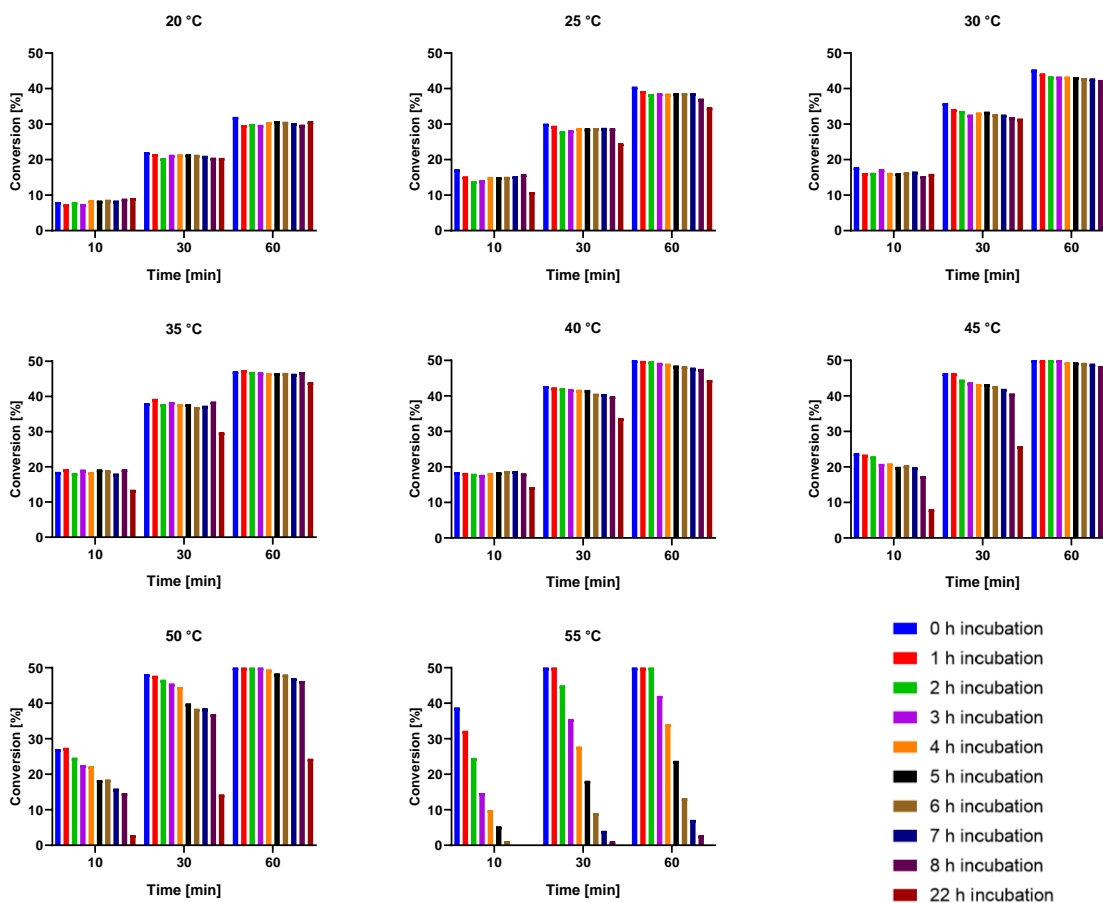


Figura 20. Influența temperaturii asupra activității *PpS*-TA (la diferiți timpi de incubare a biocatalizatorului), utilizând 10 mM *rac*-7a ca substrat și 10 mM piruvat drept co-substrat, după 1 h timp de reacție

În aceleași condiții de rezoluție cinetică a *rac*-7a, inițial *SrR*-TA a fost testat fără preincubarea enzimei. S-a observat o tendință de scădere a activității bazate pe conversie, când temperatura a fost ridicată de la 20 la 40 °C ($c_{20^{\circ}\text{C}} = 21.7\%$ și $c_{40^{\circ}\text{C}} = 10.4\%$), întrucât jumătate din activitate s-a pierdut în 1 oră. În cazul preincubării timp de 6 ore a TA, temperaturile de 20-35 °C nu au avut un impact negativ asupra activității, totuși temperaturile mai ridicate au cauzat pierderi semnificative de activitate în comparație cu varianta fără incubarea enzimei, la aceeași temperatură, în intervalul de timp stabilit. Totodată, pre-incubarea de 22 de ore a produs o pierdere de activitate de 5 ori mai mare față de varianta fără incubare, la 40 °C ($c_{40^{\circ}\text{C}} = 2.2\%$) și o scădere de 10 ori mai mare decât în absența incubării, la 20 °C ($c_{20^{\circ}\text{C}} = 21.8\%$) în screening-ul de 1 oră (**Figura 21.**). Rezultatele obținute au indicat o stabilitate termică scăzută pentru *SrR*-TA (*R*)-selectivă, care este comparabilă cu cea a altor TA (*R*)-selective, deși au fost raportate proiecte de succes pentru a rezolva această problemă.^{70 71 72}

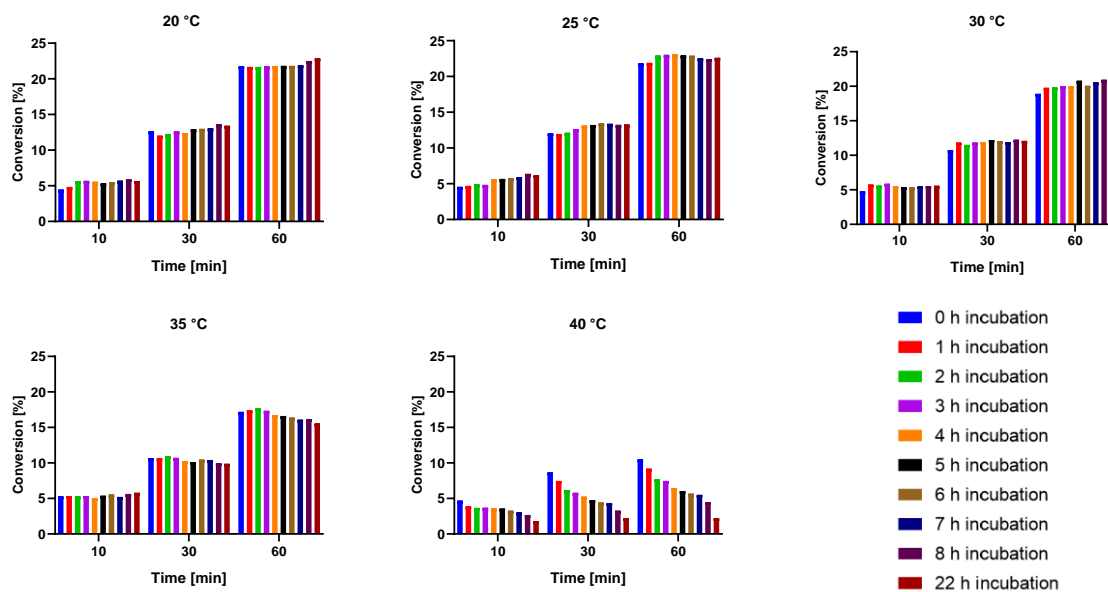
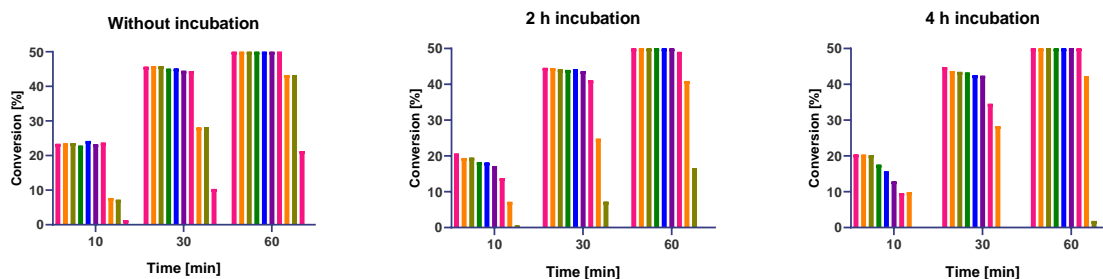


Figura 21. Influența temperaturii asupra activității *SrR*-TA (la diferiți timpi de incubare a biocatalizatorului), utilizând 10 mM *rac*-**7a** ca substrat și 10 mM piruvat cu rol de co-substrat, după 1 h timp de reacție

3.4.2.4. Influența co-solventului asupra stabilității/activității noilor TA

În plus, s-a investigat efectul DMSO asupra activității bazate pe conversie a TA în KR a *rac*-**7a**. TA (*S*)-selectivă fără pre-incubare cu DMSO, a funcționat așa cum era de așteptat până la un conținut de 30% DMSO (v/v), atingându-se conversia completă după 1 oră (în condițiile de screening descrise anterior). Când *PpS*-TA a fost incubată timp de 1-8 ore cu cantități diferite de DMSO, 25% (v/v) este cea mai mare cantitate de DMSO cu care pot fi obținute valori complete de conversie. Creșterea cantității de DMSO a determinat scăderea semnificativă a activității enzimaticе, ceea ce se reflectă în valori minime de conversie (**Figura 22**).



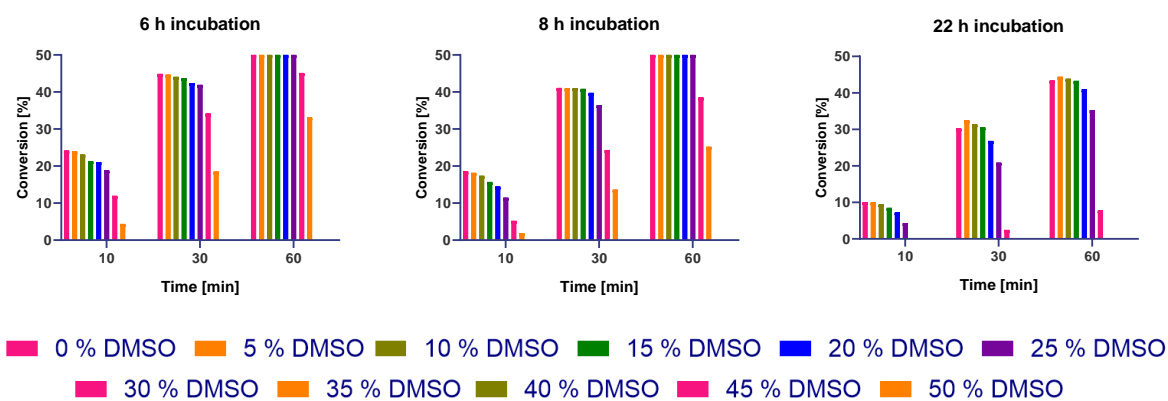


Figura 22. Profilul activității bazate pe conversie a *PpS*-TA în KR a *rac*-7a la diferite cantități de DMSO și diferiți timpi de incubare

TA (*R*)-selectivă, fără incubare prealabilă, a produs conversii similare până la un conținut de 20% DMSO, la cantități mai mari de co-solvent observându-se scăderea conversiei. Incubarea mai lungă nu a afectat activitatea, chiar și în cazul incubării de 22 de ore cu 20% DMSO, conversia a fost de 20% după 1 oră de reacție, aceeași valoare atingându-se și pentru enzima neincubată (**Figura 23**).

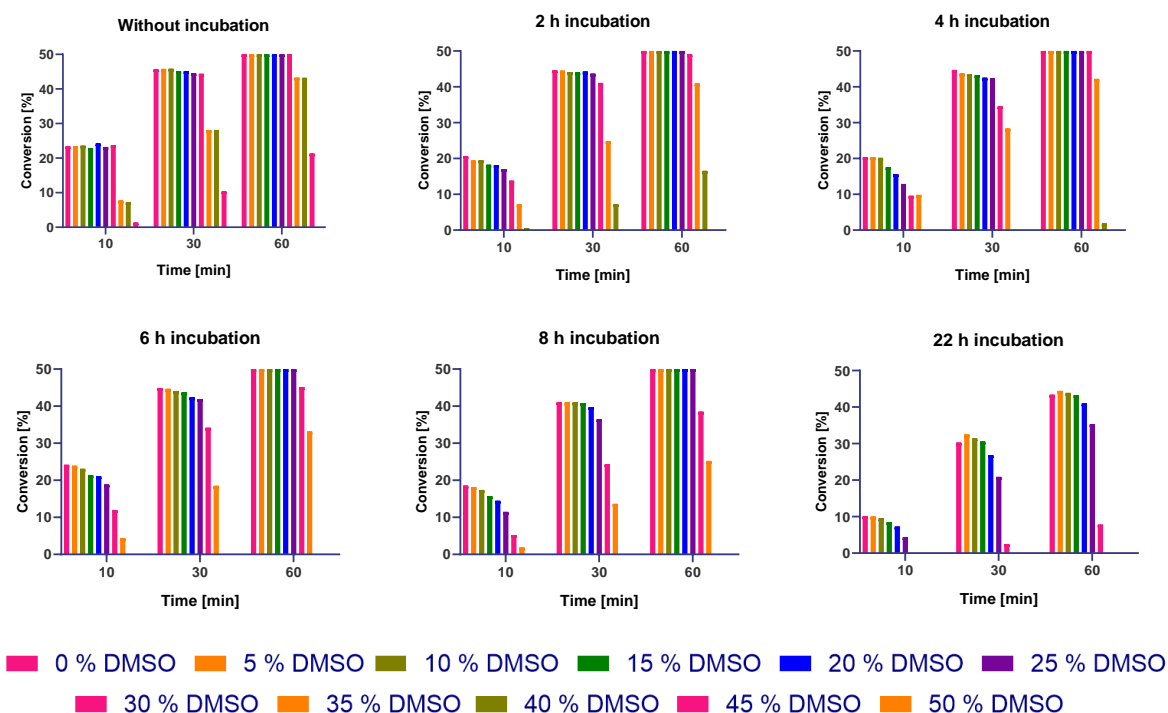


Figura 23. Profilul activității bazate pe conversie a *SrR*-TA în KR a *rac*-7a la diferite cantități de DMSO și diferiți timpi de incubare

3.4.2.5. Caracterizarea cinetică a noilor biocatalizatori

S-a dorit, de asemenea, să se determine eficiența catalitică a noilor TA. Pentru a atinge acest obiectiv s-au realizat măsurători cinetice pentru diferite amine racemice (*rac-7a*, *-7b*, *-7c*, *-7d*) și piruvat (co-substrat). Datele rezultate au fost comparate cu cele obținute pentru bine studiata variantă W60C a TA din *Chromobacterium violaceum* (*CvS-TA*)^{73 74 75}. Inițial, parametrii cinetici au fost determinați pentru *PpS-TA* și *SrR-TA*, la concentrație fixă de piruvat (0.6 mM) pentru substraturile menționate mai sus (**Figura 16.**, **Tabelul 10**).

În general, cu toate substraturile (cu excepția cazului transaminării *rac-7b* cu *SrR-TA*), *SrR-* și *PpS-TA* au valori K_M mai mari decât varianta *CvS-TA* W60C (*CvS-TA*), ceea ce sugerează o afinitate mai mică față de substrat. Cu toate acestea, aceste rezultate pot fi legate de valorile v_{max} și k_{cat} crescute, care subliniază că noile TA sunt mai eficiente la concentrații mai mari de substrat decât *CvS-TA* (**Tabelul 10**). În **Tabelul 10** se poate observa o eficiență catalitică crescută de ~12 ori a *PpS-TA* și de ~2.5 ori a *SrR-TA* (reprezentată prin valori k_{cat} în ambele cazuri) pentru *rac-7a* în comparație cu *CvS-TA*. În mod surprinzător, acest lucru a fost legat de o orientare relaxată a substratului (*rac-7a*), care poate fi dedusă din valorile K_M crescute (creștere de 14 ori pentru *PpS-TA* și creștere de 16.5 ori pentru *SrR-TA*) față de cele pentru *CvS-TA*. În cazul *rac-7b*, pentru cele trei TA s-au obținut valori comparabile ale K_M și k_{cat} . În cazul *rac-7c,d* *PpS-TA* a fost cel mai activ biocatalizator, arătând o eficiență catalitică de ~9 ori mai mare (k_{cat}) și o valoare K_M crescută de ~23 ori în comparație cu varianta W60C a *CvS-TA*.

Pentru *SrR-TA* s-a înregistrat o valoare k_{cat} semnificativ mai mică (de 311.7 și 37.6 ori) în transaminarea *rac-7a* decât cele măsurate pentru alte TA (*R*)-selective, *Fusarium oxysporum* TA⁷⁶ și *Aspergillus terreus* TA. Acest lucru evidențiază eficiența catalitică scăzută a *SrR-TA*, cu toate acestea, condițiile de testare diferite pot influența datele. În plus, comparativ cu varianta îmbunătățită a *CvS-TA*, *SrR-TA* a furnizat valori k_{cat} ușor crescute (pentru *rac-7a,c*) sau analoage (pentru *rac-7b,d*), așa cum se observă în **Tabelul 10**, rezultate care confirmă potențialul său biocatalitic.

Tabelul 10. Datele cinetice pentru *PpS-TA* și *SrR-TA* în comparație cu *CvS-TA* (W60C) pentru substraturile *rac-7a-d*

	<i>PpS-TA</i>			<i>SrR-TA</i>			<i>CvS-TA</i> (W60C)		
	K_M [μM]	v_{max} [$\mu M/s$]	k_{cat} [s^{-1}]	K_M [μM]	v_{max} [$\mu M/s$]	k_{cat} [s^{-1}]	K_M [μM]	v_{max} [$\mu M/s$]	k_{cat} [s^{-1}]
<i>rac-7a</i>	448	0.212	0.085	531	0.047	0.017	32	0.014	0.007
<i>rac-7b</i>	161	0.041	0.016	126	0.058	0.021	128	0.028	0.014
<i>rac-7c</i>	952	0.541	0.217	341	0.237	0.085	40	0.047	0.024

<i>rac-7d</i>	899	0.453	0.182	175	0.057	0.020	38	0.044	0.022
---------------	-----	-------	-------	-----	-------	-------	----	-------	-------

Parametrii cinetici reprezintă constantele de viteză aparentă determinate la o concentrație fixă de piruvat (0.6 mM).

În continuare, s-au determinat parametrii cinetici ai noilor TA prin fixarea concentrației de *rac-7b* (0.6 mM) și modificarea cantității de piruvat în reacții (**Tabelul 11**). Este de remarcă faptul că în măsurătorile cinetice pentru *rac-7b*, valorile ridicate ale k_{cat} confirmă, de asemenea, eficiența catalitică ridicată a noilor TA. Constanta catalitică pentru piruvat (**Tabelul 11**) este în toate cazurile superioară celor obținute în cadrul screening-ului *rac-7a-d* (**Tabelul 10**) cu CvS-TA W60C. În cazul cineticii transaminării piruvatului, varianta investigată a CvS-TA a prezentat o afinitate mai mare pentru *rac-7b* ($K_M = 128 \mu\text{M}$ – **Tabelul 10**), similară cu cea prezentată pentru piruvat ($K_M = 399 \mu\text{M}$ – **Tabelul 11**). PpS-TA a funcționat invers, cu afinitate mare pentru piruvat ($K_M = 43 \mu\text{M}$ – **Tabelul 11**) și afinitate scăzută ($K_M = 161 \mu\text{M}$ – **Tabelul 10**) față de *rac-7b*. SrR-TA a funcționat la fel în ambele cazuri comparate (**Tabelul 10, 11**).

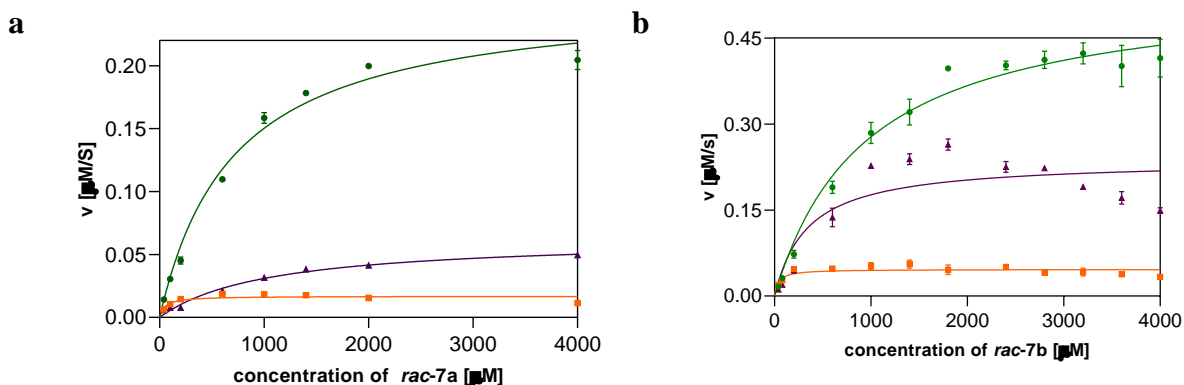
Tabelul 11. Datele cinetice pentru PpS-TA și SrR-TA comparate cu W60C CvS-TA în cazul utilizării piruvatului ca substrat.

	piruvat		
	K_M [μM]	v_{max} [$\mu\text{M/s}$]	k_{cat} [s^{-1}]
PpS-TA	43	0.195	0.078
SrR-TA	121	0.202	0.072
CvS-TA (W60C)	399	0.067	0.034

Parametrii cinetici reprezintă constantele de viteză aparentă determinate la o concentrație fixă de piruvat (0.6 mM).

3.4.2.5.1. Determinarea inhibiției de substrat

În măsurătorile cinetice, curbele determinate au sugerat o inhibiție de substrat minoră în cazul CvS-TA cu *rac-7a*, care nu a fost detectată în cazul PpS- și SrR-TA (**Figura 24**).



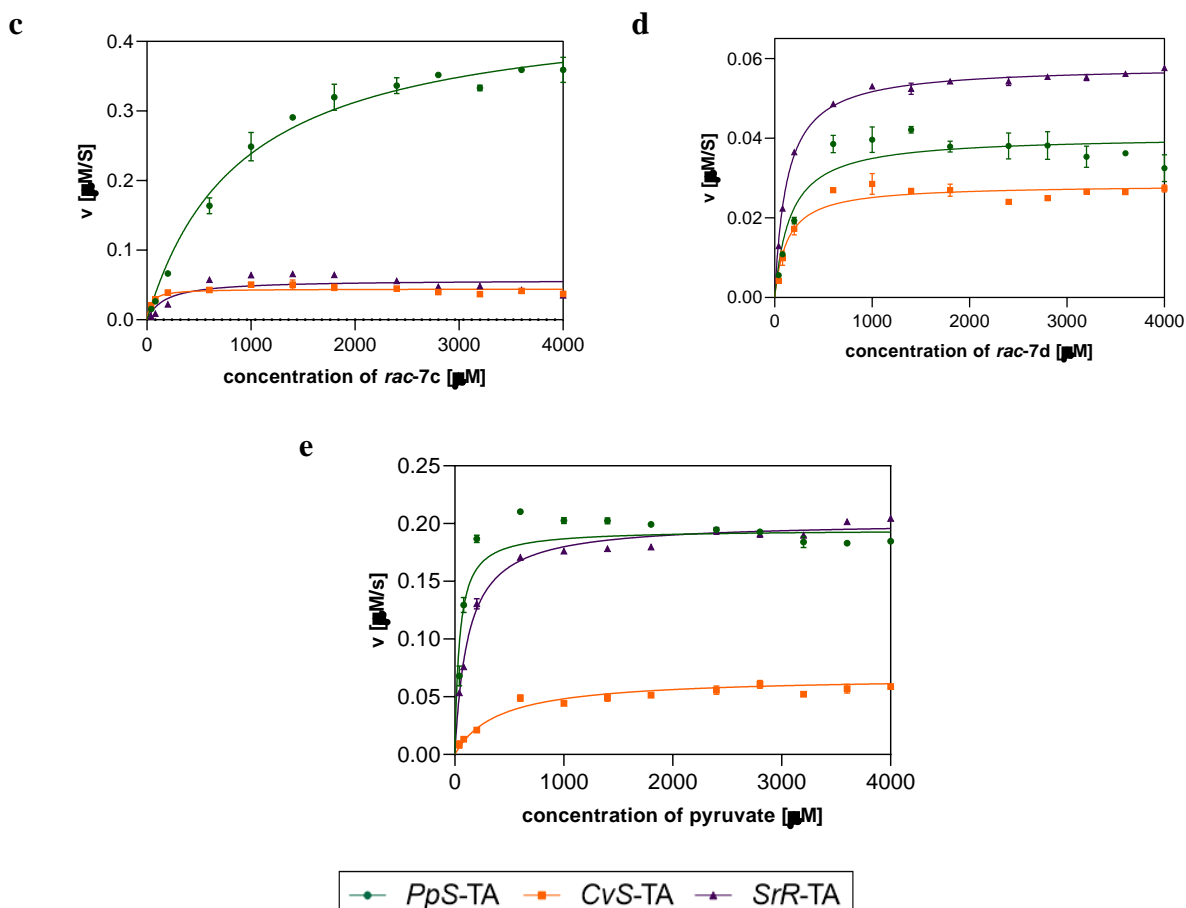


Figura 24. Măsurători de inhibiție de substrat pentru rac -7a-d și piruvat

Pentru rac -7b,c s-a observat o inhibiție de substrat medie în cazul SrR -TA, cu toate acestea nu a fost cazul și pentru PpS - și CvS -TA (Figura 24b, c). În transaminarea rac -7d catalizată de PpS -TA s-a observat o inhibiție de substrat minoră (Figura 24d.). S-au efectuat investigații și din punctul de vedere al acceptorului de grupare amino, piruvatul, unde se poate observa o inhibiție moderată în cazul PpS -TA. Pentru acest biocatalizator, îndepărtarea piruvatului din mediul de reacție poate fi un factor important de luat în considerare, pentru a obține performanța catalitică optimă. SrR - și CvS -TA nu au fost inhibitate de creșterea concentrației de piruvat (Figura 24e.).

3.4.2.5.2. Măsurători de inhibiție de produs

Pentru acest set de experimente s-a dorit să se verifice efectul inhibitor al cetonei generate din KR, deoarece se știe că aceste substanțe pot acționa ca inhibitori⁷⁷ ai reacției. Astfel, s-a utilizat o metodă de spectroscopie UV pentru a verifica dacă inhibiția de produs este prezentă folosind aminele rac -7a-d ca substraturi. Acetofenonele formate au fost inhibitori mai buni pentru toate TA investigate decât substraturile (Figura 25a-d). În cazul CvS -TA și SrR -

TA acetofenona, **6a**, a provocat o inhibiție pronunțată chiar și la concentrație de 0.3 mM, la care activitatea enzimelor a fost redusă cu 68% și 86%. *PpS*-TA a funcționat la ~ 50% în aceleași condiții cu **6a** (**Figura 25a**).

CvS-TA a arătat o inhibiție de produs semnificativă cu toate acetofenonele investigate, având activitate reziduală de 59% la concentrația de 0.5 mM **6b** (**Figura 25b**), 36% la 0.5 mM **6c** (**Figura 25c**) și 30% la 0.5 mM **6d** (**Figura 25d**).

În screening-urile efectuate cu *SrR*-TA, cetonele **6b** și **6c** au provocat o inhibiție moderată, activitatea inițială a scăzut la 45% la concentrații de cetone de 0.6 mM (**Figura 25b, c**). Cu toate acestea, în intervalul de concentrație testat pentru **6d**, s-a observat 10% din pierderea activității pentru TA (*R*)-selectivă (**Figura 25d**), concentrații mai mari neputând fi testate din cauza limitărilor condițiilor de analiză date.

PpS-TA a fost inhibată cel mai mult de **6c**, având ~ 33% activitate rămasă la 0.6 mM **6c** (**Figura 25c**), în același timp, în cazul **6d**, ~ 50% din activitatea inițială a fost pierdută (**Figura 25d**). În cazul **6b** s-a observat un impact minor asupra activității enzimei, ~75% activitate reziduală înregistrându-se la o concentrație de 0.5 mM a **6b** (**Figura 25b**).

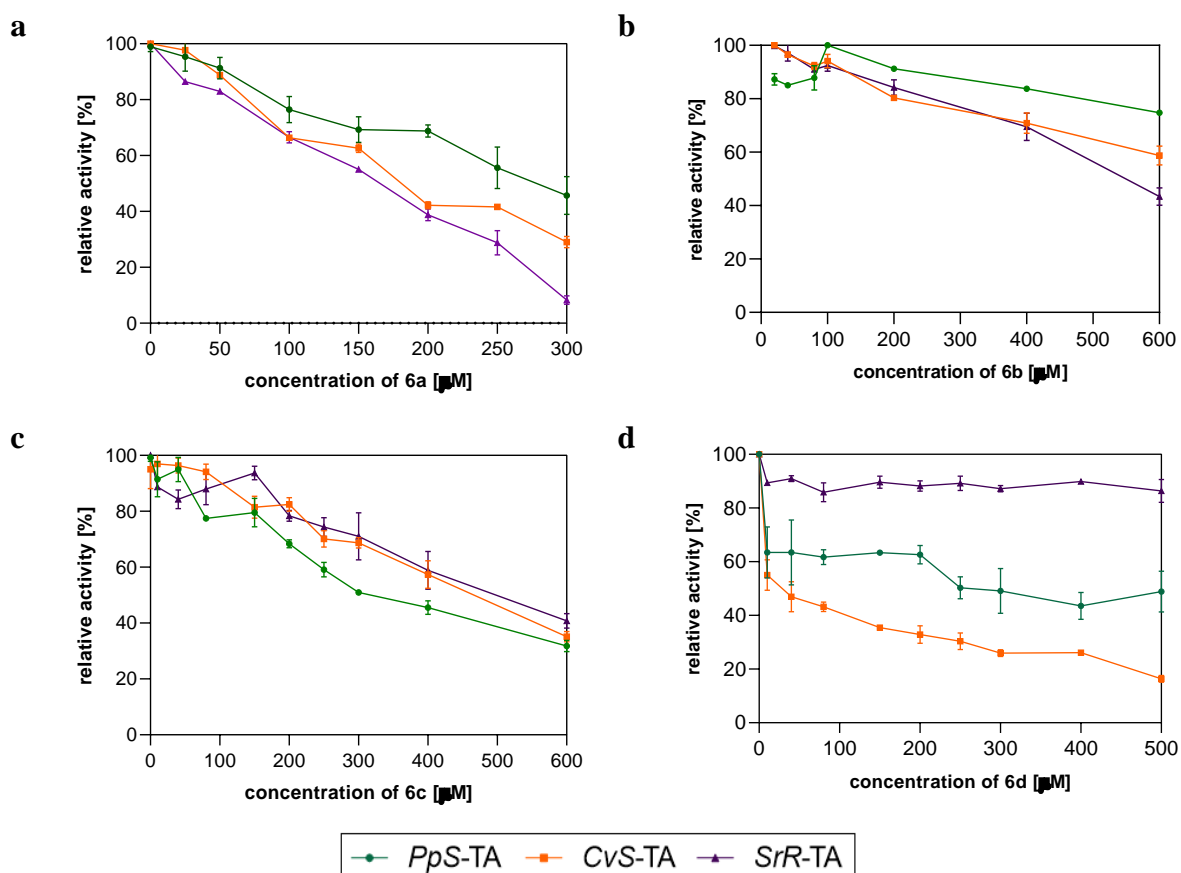


Figure 25. Inhibiția de produs a TA testate la diferite concentrații de cetone a) **6a**, b) **6b**, c) **6c**, d) **6d**

3.4.3. Concluzii

Folosind instrumentele de căutare a genelor transaminazelor (*R*)- și (*S*)-selective din bazele de date, și motivele bine conservate ale secvențelor situsurilor lor de legare a cofactorului PLP, 2 transaminaze, *Shinorizobium* sp. TA (*SrR*-TA) și *Pseudomonas psychrotolerans* TA (*PpS*-TA) au fost selectate. Testele de stabilitate operațională a transaminazelor au arătat că pH=7 este cel mai bun pentru determinarea activităților pe bază de conversie a *rac*-**7a**.

La investigarea influenței temperaturii reacției de transaminare asupra stabilității operaționale a biocatalizatorilor, s-a evidențiat că pentru *PpS*-TA 22 de ore de preincubare au dus la pierderea completă a activității, totuși la 40 °C s-a observat o scădere a conversiei de doar 5% între biocatalizatorul neincubat și cel care a fost incubat timp de 22 de ore înainte de reacție. *SrR*-TA a prezentat un optim operațional la 35 °C și, din păcate, la 40 °C și la 22 de ore de preincubare s-a observat o pierdere de activitate de 5 ori.

Incubarea enzimei (*S*)-selective cu DMSO a dus la o stabilitate scăzută pe termen lung a TA, s-a observat că după incubarea timp de 22 de ore în cantitatea de co-solvent menționată de 5-50% DMSO (v/v), s-au obținut valori de conversie mai mici decât fără DMSO. Pentru TA (*R*)-selectivă, conversia reacției nu a fost influențată negativ chiar și cu un conținut de 35% DMSO (v/v). În mod surprinzător, prin incubarea enzimei timp de 22 de ore cu 35% DMSO, s-au înregistrat valori ale conversiei mai mari decât în cazul absenței incubării, dar în prezența aceleiași cantități de co-solvent.

Măsurătorile cinetice au evidențiat că noua TA (*S*)-selectivă, *PpS*-TA, a depășit în termeni de eficiență catalitică, reprezentată de constanta catalitică (k_{cat}), varianta bine caracterizată W60C a *CvS*-TA în rezoluția cinetică a aminelor studiate *rac*-**7a-d**. Din măsurătorile de inhibiție de substrat și produs a reieșit toleranța îmbunătățită față de concentrația de substrat a acestor TA. Cu toate acestea, **6a** inhibă puternic toate enzimele, în timp ce pentru **6b-d** s-au măsurat valori medii ale inhibiției *SrR*- și *CvS*-TA, totuși *PpS*-TA este mai puțin sensibilă la concentrații crescute de **6b-d**.

În general, aceste rezultate dovedesc că cele două noi TA sunt biocatalizatori promițători, cu stabilitate operațională ridicată pentru producerea de amine enantiomeric îmbogățite.

4. Concluzii generale

În acest studiu, s-a urmărit dezvoltarea de noi proceduri (prin enzime noi sau prin configurări noi de sisteme de reacție) pentru producția de amine și alcooli optic puri.

În primul rând, a fost dezvoltată o procedură de imobilizare a CaL-B care a furnizat un biocatalizator stabil, robust și activ, permițând producerea de alcooli secundari optic puri pe o scară de sute de grame. Rezultatele obținute au evidențiat aplicabilitatea biocatalizatorului atât în sistem discontinuu cât și continuu. Acest lucru a deschis calea pentru o optimizare rapidă și o manipulare ușoară a catalizatorului. Folosind această metodă, validată pe diverse substraturi, s-au obținut valori excelente de enantioselectivitate în rezoluțiile cinetice investigate, reprezentând o alternativă pentru sinteza la scară multigram a alcoolilor secundari.

În al doilea rând, pentru a dezvolta un sistem de reacție de rezoluție cinetică dinamică complet continuă a diferitelor amine optic active, s-a folosit enzima CaL-B și un catalizator de racemizare (paladiu pe aminopropil-silice). În această lucrare, s-a demonstrat cât de utilă poate fi legarea în serie a coloanelor de racemizare pentru a obține potențialul maxim al sistemului. Acest sistem stabil a fost utilizat cu succes pe diverse amine, obținându-se enantioselectivități și randamente excelente.

Nu în ultimul rând, au fost caracterizate două noi TA. Acestea au acționat cu enantioselectivități excelente în procesele de rezoluție cinetică ale aminelor racemice testate. Determinarea parametrilor cinetici și a limitelor operaționale a ajutat la explorarea performanței catalizatorilor. TA (*S*)-selectivă (*PpS*-TA) a dat rezultate impresionante în compararea parametrilor cinetici cu varianta bine caracterizată a *Chromobacterium violaceum* TA, W60C. Toleranța la co-solvent a TA (*R*)-selective (*SrR*-TA), este o abilitate rezonabilă care ar putea fi dezvoltată și exploatată în continuare. Proprietățile acestor TA sunt remarcabile, prezentând interes pentru investigații ulterioare.

5. Referințe bibliografice

- ¹ Tucker, J.L. and Faul, M.M., 2016. Industrial research: Drug companies must adopt green chemistry. *Nature News*, 534(7605), p.27-29.
- ² Zaks, A. and Klibanov, A.M., 1984. Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science*, 224(4654), pp.1249-1251.
- ³ Wender, P., 1997. Towards the ideal synthesis. *Chemistry and Industry*, (19), p.765-769.
- ⁴ Bruggink, A., Schoevaart, R. and Kieboom, T., 2003. Concepts of nature in organic synthesis: cascade catalysis and multistep conversions in concert. *Organic process research & development*, 7(5), pp.622-640.
- ⁵ Abu, R. and Woodley, J.M., 2015. Application of enzyme coupling reactions to shift thermodynamically limited biocatalytic reactions. *ChemCatChem*, 7(19), pp.3094-3105.
- ⁶ Sheldon, R.A. and Brady, D., 2019. Broadening the scope of biocatalysis in sustainable organic synthesis. *ChemSusChem*, 12(13), pp.2859-2881.
- ⁷ Aslan, S., Noor, E. and Bar-Even, A., 2017. Holistic bioengineering: rewiring central metabolism for enhanced bioproduction. *Biochemical Journal*, 474(23), pp.3935-3950.
- ⁸ Bryan, M.C., Dunn, P.J., Entwistle, D., Gallou, F., Koenig, S.G., Hayler, J.D., Hickey, M.R., Hughes, S., Kopach, M.E., Moine, G. and Richardson, P., 2018. Key Green Chemistry research areas from a pharmaceutical manufacturers' perspective revisited. *Green Chemistry*, 20(22), pp.5082-5103.
- ⁹ Sheldon, R.A., Brady, D. and Bode, M.L., 2020. The Hitchhiker's guide to biocatalysis: recent advances in the use of enzymes in organic synthesis. *Chemical science*, 11(10), pp.2587-2605.
- ¹⁰ Plutschack, M.B., Pieber, B., Gilmore, K. and Seeberger, P.H., 2017. The hitchhiker's guide to flow chemistry. *Chemical reviews*, 117(18), pp.11796-11893.
- ¹¹ Gutmann, B., Cantillo, D. and Kappe, C.O., 2015. Continuous-flow technology—a tool for the safe manufacturing of active pharmaceutical ingredients. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(23), pp.6688-6728.
- ¹² Martin, L.L., Peschke, T., Venturoni, F. and Mostarda, S., 2020. Pharmaceutical industry perspectives on flow chemocatalysis and biocatalysis. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 25, p.100350.
- ¹³ Santi, M., Sancineto, L., Nascimento, V., Braun Azeredo, J., Orozco, E.V., Andrade, L.H., Gröger, H. and Santi, C., 2021. Flow biocatalysis: a challenging alternative for the synthesis of APIs and natural compounds. *International journal of molecular sciences*, 22(3), p.990.
- ¹⁴ Thompson, M.P., Peñafiel, I., Cosgrove, S.C. and Turner, N.J., 2018. Biocatalysis using immobilized enzymes in continuous flow for the synthesis of fine chemicals. *Organic Process Research & Development*, 23(1), pp.9-18.
- ¹⁵ De Vitis, V., Dall'Oglio, F., Tentori, F., Contente, M.L., Romano, D., Brenna, E., Tamborini, L. and Molinari, F., 2019. Bioprocess intensification using flow reactors: Stereoselective oxidation of achiral 1, 3-diols with immobilized *Acetobacter aceti*. *Catalysts*, 9(3), p.208.
- ¹⁶ Heider, P.L., Born, S.C., Basak, S., Benyahia, B., Lakerveld, R., Zhang, H., Hogan, R., Buchbinder, L., Wolfe, A., Mascia, S. and Evans, J.M., 2014. Development of a multi-step synthesis and workup sequence for an integrated, continuous manufacturing process of a pharmaceutical. *Organic Process Research & Development*, 18(3), pp.402-409.
- ¹⁷ Thomas, C.R. and Geer, D., 2011. Effects of shear on proteins in solution. *Biotechnology letters*, 33(3), pp.443-456.
- ¹⁸ Britton, J., Majumdar, S. and Weiss, G.A., 2018. Continuous flow biocatalysis. *Chemical Society Reviews*, 47(15), pp.5891-5918.
- ¹⁹ Schweidtmann, A.M., Clayton, A.D., Holmes, N., Bradford, E., Bourne, R.A. and Lapkin, A.A., 2018. Machine learning meets continuous flow chemistry: Automated optimization towards the Pareto front of multiple objectives. *Chemical Engineering Journal*, 352, pp.277-282.
- ²⁰ Zhu, Y., Chen, Q., Shao, L., Jia, Y. and Zhang, X., 2020. Microfluidic immobilized enzyme reactors for continuous biocatalysis. *Reaction Chemistry & Engineering*, 5(1), pp.9-32.
- ²¹ Matthey, A.P., Citoler, J., Baldwin, C., Marshall, J., Pamer, R., Turner, N., Cosgrove, S. and Flitsch, S., 2021. Production of high value amine intermediates via biocatalytic cascades in continuous flow.

- ²² Summary of the Pollution Prevention Act. <http://www.epa.gov/laws-regulations/summary-pollution-prevention-act> (accessed on 05.10.2021)
- ²³ De Camp, W.H., 1989. The FDA perspective on the development of stereoisomers. *Chirality*, 1(1), pp.2-6.
- ²⁴ Verho, O. and Bäckvall, J.E., 2015. Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution: a powerful tool for the preparation of enantiomerically pure alcohols and amines. *Journal of the American Chemical Society*, 137(12), pp.3996-4009.
- ²⁵ Tan, Z., Ma, H., Li, Q., Pu, L., Cao, Y., Qu, X., Zhu, C. and Ying, H., 2016. Biosynthesis of optically pure chiral alcohols by a substrate coupled and biphasic system with a short-chain dehydrogenase from *Streptomyces griseus*. *Enzyme and microbial technology*, 93, pp.191-199.
- ²⁶ Hiraishi, T. and Taguchi, S., 2009. Enzyme-catalyzed synthesis and degradation of biopolymers. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 6(1), pp.44-54.
- ²⁷ Patel, R.N., 2011. Biocatalysis: Synthesis of key intermediates for development of pharmaceuticals. *Acs Catalysis*, 1(9), pp.1056-1074.
- ²⁸ Liu, H., De Souza, F.Z.R., Liu, L. and Chen, B.S., 2018. Immobilized and free cells of *Geotrichum candidum* for asymmetric reduction of ketones: stability and recyclability. *Molecules*, 23(9), p.2144.
- ²⁹ Faber, K., 2018. Introduction and background information. In *Biotransformations in organic chemistry* (pp. 1-30). Springer, Cham.
- ³⁰ Resch, V. and Hanefeld, U., 2015. The selective addition of water. *Catalysis Science & Technology*, 5(3), pp.1385-1399.
- ³¹ Yamashita, Y., Yasukawa, T., Yoo, W.J., Kitanosono, T. and Kobayashi, S., 2018. Catalytic enantioselective aldol reactions. *Chemical Society Reviews*, 47(12), pp.4388-4480.
- ³² Bracco, P., Busch, H., von Langermann, J. and Hanefeld, U., 2016. Enantioselective synthesis of cyanohydrins catalysed by hydroxynitrile lyases—a review. *Organic & biomolecular chemistry*, 14(27), pp.6375-6389.
- ³³ Nealon, C.M., Musa, M.M., Patel, J.M. and Phillips, R.S., 2015. Controlling substrate specificity and stereospecificity of alcohol dehydrogenases. *ACS Catal* 5 (4): 2100–2114.
- ³⁴ Adlercreutz, P., 2013. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chemical Society Reviews*, 42(15), pp.6406-6436.
- ³⁵ Steinreiber, A. and Faber, K., 2001. Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations. *Current opinion in Biotechnology*, 12(6), pp.552-558.
- ³⁶ Klein, C. and Hüttel, W., 2011. A Simple Procedure for Selective Hydroxylation of L-Proline and L-Pipecolic Acid with Recombinantly Expressed Proline Hydroxylases. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(8), pp.1375-1383.
- ³⁷ Chen, X.H., Wang, X.T., Lou, W.Y., Li, Y., Wu, H., Zong, M.H., Smith, T.J. and Chen, X.D., 2012. Immobilization of *Acetobacter* sp. CCTCC M209061 for efficient asymmetric reduction of ketones and biocatalyst recycling. *Microbial cell factories*, 11(1), pp.1-14.
- ³⁸ Kazlauskas, R.J., Weissfloch, A.N., Rappaport, A.T. and Cuccia, L.A., 1991. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed by cholesterol esterase, lipase from *Pseudomonas cepacia*, and lipase from *Candida rugosa*. *The Journal of Organic Chemistry*, 56(8), pp.2656-2665.
- ³⁹ Höhne, M. and Bornscheuer, U.T., 2009. Biocatalytic routes to optically active amines. *ChemCatChem*, 1(1), pp.42-51.
- ⁴⁰ Gotor-Fernández, V., Fernández-Torres, P. and Gotor, V., 2006. Chemoenzymatic preparation of optically active secondary amines: a new efficient route to enantiomerically pure indolines. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17(17), pp.2558-2564.
- ⁴¹ Oláh, M., Boros, Z., Hornyánszky, G. and Poppe, L., 2016. Isopropyl 2-ethoxyacetate—an efficient acylating agent for lipase-catalyzed kinetic resolution of amines in batch and continuous-flow modes. *Tetrahedron*, 72(46), pp.7249-7255.
- ⁴² Pilissão, C., de Oliveira Carvalho, P. and da Graça Nascimento, M., 2009. Enantioselective acylation of (RS)-phenylethylamine catalysed by lipases. *Process Biochemistry*, 44(12), pp.1352-1357.
- ⁴³ Päivö, M., Perkiö, P. and Kanerva, L.T., 2012. Solvent-free kinetic resolution of primary amines catalyzed by *Candida antarctica* lipase B: effect of immobilization and recycling stability. *Tetrahedron: Asymmetry*, 23(3-4), pp.230-236.
- ⁴⁴ Ghislieri, D. and Turner, N.J., 2014. Biocatalytic approaches to the synthesis of enantiomerically pure chiral amines. *Topics in Catalysis*, 57(5), pp.284-300.

- ⁴⁵ Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Keßeler, M., Stürmer, R. and Zelinski, T., 2004. Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(7), pp.788-824.
- ⁴⁶ Busto, E., Gotor-Fernández, V. and Gotor, V., 2011. Hydrolases in the stereoselective synthesis of N-heterocyclic amines and amino acid derivatives. *Chemical reviews*, 111(7), pp.3998-4035.
- ⁴⁷ Kroutil, W., Fischereider, E.M., Fuchs, C.S., Lechner, H., Mutti, F.G., Pressnitz, D., Rajagopalan, A., Sattler, J.H., Simon, R.C. and Siirola, E., 2013. Asymmetric preparation of prim-, sec-, and tert-amines employing selected biocatalysts. *Organic process research & development*, 17(5), pp.751-759.
- ⁴⁸ Mourelle-Insua, Á., Méndez-Sánchez, D., Galman, J.L., Slabu, I., Turner, N.J., Gotor-Fernández, V. and Lavandera, I., 2019. Efficient synthesis of α -alkyl- β -amino amides by transaminase-mediated dynamic kinetic resolutions. *Catalysis Science & Technology*, 9(15), pp.4083-4090.
- ⁴⁹ Guan, C., Ribeiro, A., Akkermans, A.D., Jing, Y., van Kammen, A., Bisseling, T. and Pawlowski, K., 1996. Nitrogen metabolism in actinorhizal nodules of *Alnus glutinosa*: expression of glutamine synthetase and acetylornithine transaminase. *Plant molecular biology*, 32(6), pp.1177-1184.
- ⁵⁰ de la Torre, F., Santis, L.D., Suárez, M.F., Crespillo, R. and Cánovas, F.M., 2006. Identification and functional analysis of a prokaryotic-type aspartate aminotransferase: implications for plant amino acid metabolism. *The Plant Journal*, 46(3), pp.414-425.
- ⁵¹ Kohls, H., Steffen-Munsberg, F. and Höhne, M., 2014. Recent achievements in developing the biocatalytic toolbox for chiral amine synthesis. *Current opinion in chemical biology*, 19, pp.180-192.
- ⁵² Simon, R.C., Richter, N., Busto, E. and Kroutil, W., 2014. Recent developments of cascade reactions involving ω -transaminases. *ACS catalysis*, 4(1), pp.129-143.
- ⁵³ Guo, F. and Berglund, P., 2017. Transaminase biocatalysis: optimization and application. *Green Chemistry*, 19(2), pp.333-360.
- ⁵⁴ Stewart, J.D., 2001. Dehydrogenases and transaminases in asymmetric synthesis. *Current opinion in chemical biology*, 5(2), pp.120-129.
- ⁵⁵ Matcham, G.W. and BOWEN, A.S., 1996. Biocatalysis for chiral intermediates: meeting commercial and technical challenges. *Chimica oggi*, 14(6), pp.20-24.
- ⁵⁶ Shin, J.S. and Kim, B.G., 1997. Kinetic resolution of α -methylbenzylamine with ω -transaminase screened from soil microorganisms: Application of a biphasic system to overcome product inhibition. *Biotechnology and bioengineering*, 55(2), pp.348-358.
- ⁵⁷ Shin, J.S. and Kim, B.G., 2001. Comparison of the ω -transaminases from different microorganisms and application to production of chiral amines. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 65(8), pp.1782-1788.
- ⁵⁸ Bencze, L.C., Bartha-Vári, J.H., Katona, G., Toşa, M.I., Paizs, C. and Irimie, F.D., 2016. Nanobioconjugates of *Candida antarctica* lipase B and single-walled carbon nanotubes in biodiesel production. *Bioresource technology*, 200, pp.853-860.
- ⁵⁹ Bartha-Vári, J.H., Toşa, M.I., Irimie, F.D., Weiser, D., Boros, Z., Vértessy, B.G., Paizs, C. and Poppe, L., 2015. Immobilization of Phenylalanine Ammonia-Lyase on Single-Walled Carbon Nanotubes for Stereoselective Biotransformations in Batch and Continuous-Flow Modes. *ChemCatChem*, 7(7), p.1122.
- ⁶⁰ Paroul, N., Grzegozeski, L.P., Chiaradia, V., Treichel, H., Cansian, R.L., Oliveira, J.V. and de Oliveira, D., 2011. Solvent-free geranyl oleate production by enzymatic esterification. *Bioprocess and biosystems engineering*, 34(3), pp.323-329.
- ⁶¹ Mozingo, R., 2003. Palladium catalysts. *Organic Syntheses*, 26, pp.77-77.
- ⁶² Kim, M.J., Kim, W.H., Han, K., Choi, Y.K. and Park, J., 2007. Dynamic kinetic resolution of primary amines with a recyclable Pd nanocatalyst for racemization. *Organic letters*, 9(6), pp.1157-1159.
- ⁶³ Boros, Z., Weiser, D., Márkus, M., Abaháziová, E., Magyar, Á., Tomin, A., Koczka, B., Kovács, P. and Poppe, L., 2013. Hydrophobic adsorption and covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on mixed-function-grafted silica gel supports for continuous-flow biotransformations. *Process Biochemistry*, 48(7), pp.1039-1047.
- ⁶⁴ Weiser, D., Nagy, F., Bánóczy, G., Oláh, M., Farkas, A., Szilágyi, A., László, K., Gellért, Á., Marosi, G., Kemény, S. and Poppe, L., 2017. Immobilization engineering—How to design advanced sol-gel systems for biocatalysis?. *Green Chemistry*, 19(16), pp.3927-3937.

-
- ⁶⁵ Shin, J.S., Yun, H., Jang, J.W., Park, I. and Kim, B.G., 2003. Purification, characterization, and molecular cloning of a novel amine: pyruvate transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(5), pp.463-471.
- ⁶⁶ Truppo, M.D. and Turner, N.J., 2010. Micro-scale process development of transaminase catalysed reactions. *Organic & biomolecular chemistry*, 8(6), pp.1280-1283.
- ⁶⁷ Chen, S., Campillo-Brocal, J.C., Berglund, P. and Humble, M.S., 2018. Characterization of the stability of *vibrio fluvialis* JS17 amine transaminase. *Journal of biotechnology*, 282, pp.10-17.
- ⁶⁸ Chen, S., Berglund, P. and Humble, M.S., 2018. The effect of phosphate group binding cup coordination on the stability of the amine transaminase from *Chromobacterium violaceum*. *Molecular Catalysis*, 446, pp.115-123.
- ⁶⁹ Galman, J.L., Gahloth, D., Parmeggiani, F., Slabu, I., Leys, D. and Turner, N.J., 2018. Characterization of a putrescine transaminase from *Pseudomonas putida* and its application to the synthesis of benzylamine derivatives. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6, p.205.
- ⁷⁰ Xie, D.F., Fang, H., Mei, J.Q., Gong, J.Y., Wang, H.P., Shen, X.Y., Huang, J. and Mei, L.H., 2018. Improving thermostability of (R)-selective amine transaminase from *Aspergillus terreus* through introduction of disulfide bonds. *Biotechnology and applied biochemistry*, 65(2), pp.255-262.
- ⁷¹ Huang, J., Xie, D.F. and Feng, Y., 2017. Engineering thermostable (R)-selective amine transaminase from *Aspergillus terreus* through in silico design employing B-factor and folding free energy calculations. *Biochemical and biophysical research communications*, 483(1), pp.397-402.
- ⁷² Heckmann, C.M., Gourlay, L.J., Dominguez, B. and Paradisi, F., 2020. An (R)-Selective Transaminase From *Thermomyces stellatus*: Stabilizing the Tetrameric Form. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, p.707.
- ⁷³ Land, H., Campillo-Brocal, J.C., Svedendahl Humble, M. and Berglund, P., 2019. B-factor Guided Proline Substitutions in *Chromobacterium violaceum* Amine Transaminase: Evaluation of the Proline Rule as a Method for Enzyme Stabilization. *ChemBioChem*, 20(10), pp.1297-1304.
- ⁷⁴ Böhmer, W., Knaus, T., Volkov, A., Slot, T.K., Shiju, N.R., Cassimjee, K.E. and Mutti, F.G., 2019. Highly efficient production of chiral amines in batch and continuous flow by immobilized ω -transaminases on controlled porosity glass metal-ion affinity carrier. *Journal of biotechnology*, 291, pp.52-60.
- ⁷⁵ Zhang, P., Liao, X., Ma, C., Li, Q., Li, A. and He, Y., 2019. Chemoenzymatic conversion of corncob to furfurylamine via tandem catalysis with tin-based solid acid and transaminase biocatalyst. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(21), pp.17636-17642.
- ⁷⁶ Gao, S., Su, Y., Zhao, L., Li, G. and Zheng, G., 2017. Characterization of a (R)-selective amine transaminase from *Fusarium oxysporum*. *Process Biochemistry*, 63, pp.130-136.
- ⁷⁷ Yun, H., Hwang, B.Y., Lee, J.H. and Kim, B.G., 2005. Use of enrichment culture for directed evolution of the *Vibrio fluvialis* JS17 ω -transaminase, which is resistant to product inhibition by aliphatic ketones. *Applied and environmental microbiology*, 71(8), pp.4220-4224.