

**UNIVERSITATEA “POLITEHNICA” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE CHIMIE INDUSTRIALĂ ȘI INGINERIA
MEDIULUI**

Ing. Alina Ramona CROITORU

**TEZA DE DOCTORAT
REZUMAT**

**UTILIZAREA LIPAZELOR IMOBILIZATE PENTRU
SINTEZA ESTERILOR DE OLIGO-
ȘI POLIZAHARIDE**

Conducător științific:

Prof.dr.ing. Corneliu Mircea DAVIDESCU

2012

CUPRINS

Introducere		
Abrevieri		
1.	STUDIUL DE LITERATURĂ	1
1.1.	Introducere. Importanța temei	1
1.2.	Transformări chimice și enzimatică ale unor carbohidrați	2
1.2.1.	Glucoza	3
1.2.2.	Zaharoza	4
1.2.3.	Lactoza	9
1.2.4.	Inulina	11
1.2.5.	Maltodextrinele	13
1.3.	Derivați ai zaharurilor și modificarea lor prin biocataliză	15
1.3.1.	Alcoolii derivați de la zaharuri (alditoli)	15
1.3.1.1.	Xilitolul	17
1.3.1.2.	Sorbitolul	19
1.3.1.3.	Manitolul	21
1.3.1.4.	Lactitolul	22
1.3.1.5.	Maltitolul	23
1.3.2.	Alchilglucozidele	24
1.4.	Utilizarea lipazelor în chimia carbohidraților	26
1.5.	Esterii aromatici ai zaharurilor și derivaților acestora	31
1.6.	Imobilizarea enzimelor prin metoda de entrapare în sol – gel	34
1.7.	Surfactanți pe bază de zaharuri	42
1.7.1.	Surfactanți pe bază de sorbitan	43
1.7.2.	Surfactanți pe bază de zaharoză	44
1.7.3.	Surfactanți pe bază de glucoză	46
1.7.4.	Surfactanți pe bază de inulină	48
1.8.	Concluzii	48
2.	CONTRIBUȚII ORIGINALE	50
2.1.	Introducere	50
2.2.	Selecția biocatalizatorului	50
2.2.1.	Activitatea de transesterificare a lipazelor native	51
2.2.2.	Specificitatea lipazelor native pentru compușii aromatici	53
2.2.3.	Specificitatea lipazelor native pentru hidrații de carbon	58
2.2.3.1.	Studiul acilării carbohidraților cu laurat de vinil	58
2.2.3.2.	Studiul acilării carbohidraților cu compuși aromatici	60
2.2.4.	Concluzii	63
2.3.	Imobilizarea lipazelor prin metoda de entrapare în sol–gel și testarea preparatelor imobilizate ca biocatalizatori pentru reacții de acilare	63
2.3.1.	Studiul eficienței biocatalitice a lipazei imobilizate prin entrapare în sol–gel în reacții de esterificare	64
2.3.2.	Studiul eficienței biocatalitice a lipazei imobilizate prin entrapare în sol–gel în reacții de transesterificare	66
2.3.3.	Concluzii	69
2.4.	Sinteza enzimatică a esterilor aromatici ai alditolilor	70
2.4.1.	Studiul acilării alditolilor cu 3-(4-hidroxifenil) propionat de metil	70
2.4.2.	Studiul acilării alditolilor cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic	74

2.4.2.1.	Influența mediului de reacție	74
2.4.2.2.	Influența temperaturii	75
2.4.2.3.	Influența raportului molar alditol/acid 3-(4-hidroxifenil) propionic	77
2.4.2.4.	Influența raportului enzimă/substrat	78
2.4.2.5.	Influența cantității de site moleculare	79
2.4.2.6.	Studii cinetice	80
2.4.3.	Caracterizarea esterilor aromatici ai alditolilor	83
2.4.4.	Concluzii	92
2.5.	Sinteza enzimatică și caracterizarea esterilor aromatici ai alchilglucozidelor și acetalilor de zaharuri	93
2.5.1.	Sinteza esterilor aromatici ai alchilglucozidelor	93
2.5.2.	Caracterizarea esterilor aromatici ai alchilglucozidelor	94
2.5.3.	Sinteza și caracterizarea esterilor aromatici ai acetalilor de zaharuri	101
2.5.3.1.	Sinteza și caracterizarea 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 1,2-O-izopropilidenglucofuranoză	101
2.5.3.2.	Sinteza și caracterizarea 3-(4-hidroxifenil)-propionatului de mono-O-izopropiliden zaharoză și 6'-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 2,1',4,6-di-O-izopropilidenzaharoză	105
2.5.3.3.	Sinteza și caracterizarea esterilor aromatici ai inulinei	108
2.5.3.4.	Sinteza și caracterizarea 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei și 2,3:5,6:4',6'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei	111
2.5.4.	Concluzii	115
3.	PARTEA EXPERIMENTALĂ	116
3.1.	Materiale	116
3.2.	Aparatură	116
3.3.	Rețete de lucru	117
3.3.1.	Reacția de transesterificare a 1-octanolului cu laurat de vinil	117
3.3.2.	Reacția de acilare a 1-octanolului cu compuși aromatici	118
3.3.3.	Reacția de acilare a zaharurilor cu lauratul de vinil	118
3.3.4.	Reacția de acilare a zaharurilor cu compuși aromatici	119
3.3.5.	Imobilizarea lipazelor prin metoda de entrapare în sol-gel	119
3.3.6.	Reacția de transesterificare a alditolilor cu 3-(4-hidroxifenil) propionat de metil	120
3.3.7.	Reacția de esterificare a alditolilor cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic	120
3.3.8.	Reacția de acetalizare a glucozei	121
3.3.9.	Reacția de acetalizare a zaharozei	121
3.3.10.	Reacția de acetalizare a lactozei	122
3.3.11.	Reacția de acetalizare a inulinei	122
3.3.12.	Reacția de esterificare a alchilglucozidelor și acetalilor de zaharuri cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic	122
3.4.	Metode de analiză	123
3.4.1.	Analiza cantitativă prin cromatografie de gaze	123
3.4.2.	Analiza cantitativă prin cromatografie de lichide	124
3.4.3.	Determinarea proteinelor prin metoda Bradford	125
3.4.4.	Cromatografia în strat subțire	128
3.4.5.	Cromatografia pe coloană cu silica gel	128
3.4.6.	Analiza FTIR (spectroscopia de infraroșu cu transformată Fourier)	129
3.4.7.	Spectrometria de masă	129
3.4.8.	Analiza RMN (spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară)	129
4.	CONCLUZII FINALE	130

BIBLIOGRAFIE	133
ANEXE	141
LISTA DE LUCRĂRI	173

Problema abordată

Esterii zaharurilor și derivaților acestora sunt tot mai mult utilizați ca biosurfactanți în industria alimentară, farmaceutică și cosmetică. De asemenea, anumiți esteri aromatici ai zaharurilor au demonstrat activitate biologică ceea ce a devenit un subiect foarte interesant pentru diferite procese biologice. Totuși, potențialul acestor compuși nu a fost pe deplin explorat deoarece utilizarea esterilor naturali ai acizilor aromatici cu polioli este restricționată de disponibilitatea lor redusă, drept consecință a dificultății de izolare a acestora din plante și complexității sintezei lor cât și a formării produșilor secundari.

Sinteza esterilor de zaharuri poate fi realizată în principal pe cale chimică și pe cale enzimatică. Sinteza chimică tradițională a esterilor de zaharuri presupune utilizarea unor procese care au loc la temperaturi și presiuni ridicate, care utilizează catalizatori chimici corozivi, solvenți organici toxici care nu pot fi îndepărtați complet rezultând necesitatea unor etape suplimentare de purificare și care au ca rezultat amestecuri complexe de produși și cantități mari de deșeuri. Biocataliza a devenit o metodă tot mai utilă pentru producerea unor compuși cu valoare ridicată. Principalele avantaje ale metodelor enzimatică în comparație cu sinteza chimică includ transformări regio-, chemo- și stereoselective, în condiții blânde de reacție, utilizarea de catalizatori și solvenți netoxici și consum de energie redus.

S-a arătat că lipazele sunt biocatalizatori foarte utili și importanți pentru chimia organică de sinteză, în sisteme neapoase. Potențialul sintetic al lipazelor este foarte vast deoarece acestea, în comparație cu majoritatea enzimelor, pot să accepte o gamă largă de substraturi, sunt stabile în solvenți organici neapoși și pot fi aplicate în reacții de hidroliză sau în sinteza esterilor, prin alegerea unui solvent adecvat. În plus, lipazele pot transforma o serie largă de substraturi diferite de trigliceride, cum ar fi esteri alifatici, aliciclici, biciclici și aromatici chiar și cu esteri pe bază de amestecuri de compuși organometalici. Utilizarea eficientă a diferitelor lipaze pentru sinteza esterilor alifatici de zaharuri și a derivaților acestora este descrisă extensiv în literatură. Oricum, costul produsului final sintetizat pe cale enzimatică este mai ridicat comparativ cu metodele care utilizează catalizatori chimici obișnuiți.

O alternativă o reprezintă imobilizarea enzimelor în scopul creșterii stabilității operaționale, reutilizării biocatalizatorului pe termen lung, ceea ce face ca procesul biocatalitic să devină eficient din punct de vedere economic și competitiv cu procesele convenționale. Imobilizarea prin metoda de entrapare în sol-gel s-a dovedit a fi o tehnică ideală pentru o varietate largă de biomolecule. Principalul avantaj al utilizării silicagelurilor pentru imobilizarea enzimelor constă în faptul că pot fi ușor adaptate la o mare varietate de texturi poroase, rețele, funcțiuni de suprafață și condiții de reacție. Mai mult, pH-ul, timpul de gelificare sau hidrofobicitatea matricei pot fi particularizate pentru o anumită enzimă sau aplicație.

Randamentul de obținere a esterilor de zaharuri depinde mult de tipul de enzimă și de condițiile de reacție, ceea ce face ca optimizarea parametrilor, în special a biocatalizatorului și solventului, să fie esențială pentru eficiența procesului. De asemenea, solubilitatea redusă a zaharurilor în solvenții organici nepolari, în care lipazele își mențin activitatea catalitică, face dificilă sinteza esterilor de di- și oligozaharide. O alternativă atractivă în acest sens o reprezintă metodele chemo-enzimatică, care implică etape de protejare a grupărilor hidroxil secundare cu grupări hidrofobe, ceea ce duce la creșterea solubilității zaharurilor, urmate de esterificarea enzimatică a grupărilor hidroxil primare, iar apoi deprotejarea prin hidroliză în mediu acid.

Obiectivele tezei și structura

Obiectivele tezei de doctorat au fost:

- Selecția biocatalizatorului pentru sinteza esterilor aromatici ai zaharurilor și derivaților de zaharuri
- Imobilizarea lipazelor prin metoda de entrapare în sol-gel
- Testarea preparatelor imobilizate în reacții de esterificare și transesterificare
- Sinteza enzimatică a esterilor aromatici ai zaharurilor
- Sinteza enzimatică a esterilor aromatici ai derivaților de zaharuri (alditoli, alchilglucozide, acetali de zaharuri)
- Optimizarea parametrilor de reacție, studii cinetice
- Caracterizarea intermediarilor și produșilor finali prin spectrometrie de masă, spectroscopie de infraroșu și spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară

Teza de doctorat este structurată în patru părți:

- **Studiu de literatură**, în care este detaliat stadiul actual al cunoașterii în domeniul modificării chimice și enzimatică a carbohidraților și derivaților acestora, importanța temei, noțiuni generale despre chimia carbohidraților și derivaților acestora, aplicațiile lipazelor în chimia carbohidraților precum și aplicațiile industriale ale surfactanților pe bază de zaharuri.
- **Contribuții originale**, în care sunt prezentate rezultatele obținute pe parcursul cercetărilor experimentale cuprinzând selecția biocatalizatorului, imobilizarea lipazelor prin entrapare în sol-gel și testarea preparatelor imobilizate în reacții de acilare, sinteza enzimatică a esterilor aromatici ai alditolilor, derivaților alchilați și acetalilor de zaharuri și caracterizarea intermediarilor și produșilor finali de reacție prin metodele fizico-chimice specifice substanțelor organice.
- **Partea experimentală**, în care sunt descrise procedurile experimentale utilizate în reacțiile de acilare și derivatizare ale zaharurilor studiate, la imobilizarea lipazelor prin entrapare în sol-gel precum și metodele de analiză folosite.
- **Concluzii finale** rezultate în urma studiilor experimentale în conformitate cu obiectivele stabilite.

1. Date de literatură

Esterii de oligo- și polizaharide (esteri de polizaharide cu grupări alchil sau alchil-aryl) formează o clasă de polimeri cu proprietăți excepționale. Aceștia funcționează ca surfactanți polimerici păstrând majoritatea proprietăților materialelor polimerice inițiale și anume proprietatea de a forma emulsii, geluri, filme, combinată cu solubilitatea parțială în apă sau permeabilitatea. Proprietățile lor funcționale pot fi modificate prin ajustarea raportului dintre partea hidrofilă (carbohidratul polimeric sau oligomeric) și partea hidrofobă (cantitatea și lungimea catenei restului alchil). Datorită proprietăților unice, esterii amfifilici de oligo- și polizaharide pot avea aplicații multiple:

- ca surfactanți neionici, atât în industria alimentară cât și în alte industrii.
- ca și componente structurale în produsele alimentare datorită influenței lor asupra texturii alimentelor și caracteristicilor bioactive și de aromatizare.
- pentru creșterea solubilității medicamentelor insolubile sau greu solubile și ca purtători biocompatibili pentru preparate de proteine și peptide.
- pentru transportul și eliberarea controlată a agrochimicelor (fungicide și insecticide), deoarece datorită caracterului lipofil îmbunătățesc aderența acestora pe suprafața hidrofobă a frunzelor plantei și scad lavabilitatea.

Modificarea regioselectivă a carbohidraților s-a dovedit a fi o mare provocare datorită prezenței multiplelor grupări hidroxil din unitățile de zahăr. Sinteza esterilor de zaharuri poate fi realizată în principal pe cale chimică și pe cale enzimatică.

În prezent, aceste materiale se obțin în principal prin metode chimice utilizând solvenți toxici și catalizatori organici și anorganici care lasă urme reziduale în produsul final. Mai mult, metodele sintetice chimice nu sunt selective și au ca rezultat amestecuri de produși de compoziție variabilă, structuri și proprietăți necontrolabile. În cele mai multe cazuri, metodele chimice convenționale necesită etape dificile și costisitoare de purificare pentru eliminarea produșilor secundari și reziduurilor toxice și de asemenea produc cantități mari de deșeuri și săruri de la etapele de neutralizare și spălare. Datorită condițiilor drastice de reacție necesare (temperatură, catalizator bazic), degradarea parțială a catenei polimerice nu poate fi evitată.

Procesele enzimatice oferă o metodă alternativă atractivă pentru sinteza esterilor de zaharuri. În comparație cu sinteza chimică clasică, sinteza enzimatică prezintă avantajele sintezei într-o singură etapă, fără a recurge la etape suplimentare de protecție și deprotecție a polioliilor și condițiile de reacție moderate. Procesele selective catalizate de enzime pot fi realizate în condiții blânde de temperatură și presiune, evitând astfel degradarea polimerului. Utilizarea enzimelor pentru modificarea polizaharidelor are avantajul specificității și regioselectivității de reacție ridicată, care va genera produși cu structură și funcționalitate controlată. Deoarece formarea legăturii esterice este favorizată termodinamic într-un mediu cu conținut scăzut de apă, metodele enzimatice alternative trebuie să implice solvenți organici ca mediu de reacție. Diversitatea și complexitatea moleculelor organice în natură reflectă puterea remarcabilă a catalizei enzimatice. Accelerarea fenomenală a vitezei de reacție, împreună cu selectivitatea unică și condițiile blânde de reacție oferite de enzime, face ca acestea să fie foarte atractive ca și catalizatori pentru sintezele organice. În plus, tehnicile de producție îmbunătățite reduc prețul enzimelor și astfel crește disponibilitatea lor la scară largă. Multe aplicații practice ale enzimelor au fost dezvoltate nu numai pentru cercetarea academică dar și pentru fabricarea la scară largă a produselor farmaceutice și produselor chimice. Chiar dacă proprietățile enzimelor sunt bine documentate, potențialul acestora este departe de a fi complet explorat. Un motiv pentru utilizarea limitată a enzimelor este opinia greșită a multor chimiști organicieni că dezvoltarea unei noi reacții biocatalitice necesită dezvoltarea laborioasă a

unei noi enzime specifice, care să catalizeze doar reacția dată. S-a descoperit că multe enzime catalizează o multitudine de reacții, care pot fi foarte diferite de reacția cu care enzimele respective sunt asociate în natură. Mai mult, progrese recente au făcut posibilă chiar precizarea specificității unei enzime pe baza structurii terțiare, permițând astfel utilizarea rațională a acesteia.

Printre enzimele utilizate în sinteza organică, lipazele s-au dovedit a fi cele mai versatile. Deoarece aceste enzime sunt concepute în natură pentru a opera la interfața ulei-apă, ele sunt, în general, compatibile cu solvenții organici. Este bine cunoscut faptul că, deși lipazele, esterazele și unele proteaze catalizează în mod normal reacția de hidroliză a esterilor, în anumite condiții pot cataliza și reacțiile inverse hidrolizei. Marele avantaj al lipazelor față de celelalte două clase de enzime îl reprezintă o combinație între domeniul larg de substraturi pe care acestea le acceptă, regio- și enantioselectivitatea ridicată, stabilitatea în solvenți organici și specificitatea de substrat ridicată. Enzimele reprezintă cele mai promițătoare biomolecule cu potențiale aplicații la scară largă în sinteza organică chimică, dar prețul ridicat al biocatalizatorului și stabilitatea operațională nesatisfăcătoare limitează aplicațiile industriale la compuși cu valoare ridicată, cum sunt intermediarii farmaceutici sau produșii chirali.

Imobilizarea s-a dovedit a fi una dintre cele mai bune tehnici pentru menținerea activității biologice în condiții potențial adverse, pentru o perioadă de timp mai îndelungată. Principalul avantaj al imobilizării este facilitarea izolării biocatalizatorului din mediul de reacție și reutilizarea acestuia în mai multe cicluri de reacție, în scopul creșterii productivității sale. Diferite metode de imobilizare au fost dezvoltate de-a lungul timpului dar o serie de cerințe trebuie îndeplinite pentru a putea selecta metoda optimă pentru o aplicație specifică:

- imobilizarea nu trebuie să implice resturile de aminoacizi din centrul catalitic al enzimei
- condițiile de imobilizare nu trebuie să inhibe enzima
- pierderea enzimei din suport în timpul operării trebuie să fie minimă
- procedura de imobilizare trebuie să fie ieftină și reproductibilă

Imobilizarea prin metoda de entrapare în sol-gel s-a dovedit a fi o tehnică ideală pentru o varietate largă de biomolecule. Entraparea în sol-gel este o metodă de imobilizare care implică entraparea enzimei într-o matrice poroasă de polimer care permite difuzia substraturilor și produșilor. Procesele sol-gel sunt bine studiate în chimia materialelor. Principalul avantaj al utilizării silicagelurilor pentru imobilizarea enzimelor constă în faptul că pot fi ușor adaptate la o mare varietate de texturi poroase, rețele, funcțiuni de suprafață și condiții de reacție. Mai mult, pH-ul, timpul de gelifiere sau hidrofobicitatea matricei pot fi particularizate pentru o anumită enzimă sau aplicație.

2. Contribuții originale

Teza de doctorat este consacrată sintezei enzimatică a esterilor aromatici ai zaharurilor și derivaților de zaharuri, în mediu de solvent organic, utilizând ca și biocatalizatori lipaze native și imobilizate prin entrapare în sol-gel și preparate comerciale. Rezultatele sunt prezentate și discutate în cele 4 subcapitole cuprinse în partea de contribuții originale.

2.1. Selecția biocatalizatorului

Pentru a evalua activitatea catalitică a lipazelor în reacțiile zaharidelor și derivaților acestora, a fost studiată legarea compușilor aromatici printr-o legătură esterică de molecula unui carbohidrat. Gama largă de substraturi, regioselectivitatea și enantioselectivitatea mare precum și proprietățile bune de imobilizare fac ca lipazele să fie cel mai des folosite pentru formarea de legături esterice. Datorită acestor proprietăți, lipazele (triacilglicerol acil hidrolazele) au o importanță industrială deosebită. Utilizarea lipazelor în medii de reacție neapoase propune o metodologie excelentă pentru prepararea unor compuși cu valoare mare prin reacții de hidroliză enzimatică, transesterificare sau reacții de aminoliză.

Deoarece lipaze diferite pot avea specificitate de substrat diferită și eficiență catalitică diferită, pentru a determina care este cel mai eficient catalizator pentru modificarea zaharurilor au fost evaluate lipaze native din diferite surse, pe mai multe substraturi, în reacții de transesterificare și esterificare. Specificitatea lipazelor atât față de zaharuri cât și față de compusul aromatic a fost testată prin înlocuirea treptată a unor substraturi model cu substraturile de interes. Mai întâi a fost determinată activitatea de transesterificare a lipazelor native în reacția de acilare a 1-octanolului cu laurat de vinil, apoi a fost determinată activitatea catalitică a acestora prin înlocuirea esterului alifatic cu compuși aromatici. Alcoolul primar a fost apoi înlocuit cu diferiți carbohidrați, determinându-se activitatea catalitică a lipazelor native în reacția de acilare a carbohidraților cu lauratul de vinil, respectiv cu compușii aromatici.

Rezultatele au arătat că dintre cele zece lipaze native testate doar lipazele provenind din *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia* și lipaza din pancreas de porc au fost catalitic active în reacția de transesterificare studiată, în timp ce lipazele din *Candida rugosa*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* și germeni de grâu nu au prezentat activitate catalitică nici după 24 ore de reacție. Dintre substraturile aromatice testate, în condițiile de reacție studiate, doar 3-(4-hidroxifenil) propionatul de metil și acidul 3-(4-hidroxifenil) propionic au dus la formarea esterilor corespunzători. S-a demonstrat că în reacțiile de transesterificare a 1-octanolului cu compușii aromatici doar lipazele din *Candida antarctica* B, *Thermomyces lanuginosus* și *Pseudomonas fluorescens* prezintă activitate catalitică. Cea mai eficientă lipază a fost cea din *Candida antarctica* B, urmată de lipaza din *Thermomyces lanuginosus* și apoi cea din *Pseudomonas fluorescens*.

Se poate concluziona că specificitatea lipazelor testate este aceeași atât pentru esterul alifatic cât și pentru esterul aromatic, dar valorile activităților specifice sunt mult mai mari în reacția cu esterul alifatic decât în reacția cu esterul aromatic, chiar dacă în cea de-a doua reacție cantitatea de enzimă utilizată a fost de 10 ori mai mare și timpul de reacție mai îndelungat. Acest lucru poate fi datorat unor probleme de împiedicare sterică la centrul activ al enzimei din cauza nucleului aromatic, voluminos și rigid, care probabil interacționează mai greu cu centrul activ al lipazei.

Specificitatea lipazelor native pentru carbohidrați a fost determinată în reacții de transesterificare, prin înlocuirea alcoolului primar utilizat anterior (1-octanol), cu carbohidrați având lungimea catenei și secvență de monozaharide diferită iar apoi esterul alifatic a fost înlocuit cu 3-(4-hidroxifenil) propionatul de metil. Ca biocatalizatori s-au utilizat lipazele native din *Candida antarctica* B, *Thermomyces lanuginosus* și *Pseudomonas fluorescens*, care au demonstrat cea mai mare eficiență în reacțiile de acilare studiate anterior. Amestecurile de reacție au fost analizate prin spectrometrie de masă, utilizând tehnica MALDI-TOF și respectiv metoda UPLC MS în cazul reacțiilor cu compusul cu componentă aromatică. Analizele de masă au arătat formarea monoesterilor,

pentru toate zaharurile testate. În cazul inulinei și maltodextrinei, au fost detectați produși la grade de polimerizare între 2 și 5.

Cea mai mare activitate s-a înregistrat în cazul α -D-glucozei, urmată de dizaharide, iar cel mai puțin reactive au fost oligozaharidele. Acest lucru se datorează faptului că glucoza, fiind o moleculă mai mică, ajunge mai ușor la centrul activ al enzimei. Lipazele din *Pseudomonas fluorescens* și *Thermomyces lanuginosus* au avut activitate catalitică în reacțiile cu toate zaharurile studiate. Pe ansamblu, în reacțiile de transesterificare studiate, cele mai bune rezultate s-au obținut cu lipaza din *Thermomyces lanuginosus*.

În cazul tuturor reacțiilor catalizate de lipaza din *Candida antarctica* B, s-au observat în spectrele de masă picuri pseudomoleculare cu $m/z = 387$ și respectiv 329 care pot corespunde unor esteri formați cu sorbitolul sau manitolul. Deoarece este cunoscut faptul că acești alditoli sunt folosiți ca aditivi în soluțiile enzimatică, soluția de lipază *Candida antarctica* B folosită în reacții a fost supusă unei analize prin cromatografie cu schimb de anioni (HPAEC/PAD), metodă prin care au fost identificate cantități mari de sorbitol respectiv manitol. Astfel acești compuși care sunt mai reactivi decât zaharurile, datorită structurii liniare în comparație cu structura ciclică a zaharurilor, au reacționat cu lauratul de vinil și cu esterul cu componentă aromatică, formându-se esterii corespunzători. Astfel se explică lipsa activității catalitice a lipazei din *Candida antarctica* B în reacțiile de transesterificare a zaharurilor studiate.

Estimările cantitative au arătat conversii foarte mici pentru reacțiile cu esterul cu componentă aromatică, deși au fost studiate diferite condiții de reacție (diferite medii de reacție, diferite concentrații de zahar, diferite concentrații de biocatalizator, diferite rapoarte molare). Aceste rezultate conduc la ideea creșterii solubilității substratului în mediul de reacție, creștere ce poate fi realizată prin introducerea de grupări hidrofobe și ușor de îndepărtat ulterior, compatibilizând astfel substratul cu medii de reacție mai hidrofobe, mediile de reacție polare fiind toxice pentru enzimă. De asemenea, lipaza din *Candida antarctica* B pare a fi foarte activă față de alditoli, astfel că studiul obținerii unor esteri aromatici ai alditolilor prin cataliză cu lipaze reprezintă o oportunitate pentru o clasă nouă de compuși.

2.2. Imobilizarea lipazelor prin metoda de entrapare în sol – gel și testarea preparatelor imobilizate ca biocatalizatori pentru reacții de acilare

Datorită faptului că studii anterioare au arătat că lipazele imobilizate în matrici de silice reprezintă biocatalizatori eficienți pentru reacțiile de esterificare și transesterificare, în acest studiu au fost evaluate lipazele din *Thermomyces lanuginosus*, *Pseudomonas fluorescens* și *Candida antarctica* B, imobilizate prin metoda de entrapare în sol-gel.

A fost de asemenea testată eficiența structurii lichidelor ionice utilizate ca aditivi de imobilizare. Au fost investigate lichide ionice cu cation de imidazoliu cu diferite hidrofobicități și anioni organici și anorganici. Imobilizarea lipazelor în matrici sol-gel formate cu amestecuri de trei silani precursori și PEG ca aditiv de imobilizare a avut ca rezultat biocatalizatori cu eficiență catalitică ridicată, în special la un raport molar mai ridicat de feniltrimetoxisilan. De asemenea utilizarea lichidelor ionice ca aditivi de imobilizare a dus la valori mari ale activității, în special în cazul preparatului obținut cu octiltrimetoxisilan. Eficiența catalitică a preparatelor imobilizate obținute cu diferiți silani precursori a fost investigată în reacția de acilare a 1-octanolului, utilizând ca agent de acilare atât un ester fenolic (HPPME), care nu este un substrat natural pentru lipază, cât și un ester alifatic reactiv (laurat de vinil). Aceeași reacție a fost efectuată și cu lipaza nativă, pentru a permite calculul eficienței de imobilizare exprimată prin activitatea specifică

relativă, care reprezintă raportul dintre activitatea specifică a enzimei imobilizate și activitatea specifică a enzimei native. Toate preparatele obținute prin metoda de entrapare în sol-gel au prezentat activitate catalitică în reacțiile de transesterificare cu laurat de vinil ca donor acil, dar majoritatea dintre ele nu au prezentat activitate catalitică în reacțiile cu HPPME. Chiar și în cazul preparatelor imobilizate care au demonstrat activitate catalitică pentru ambele substraturi, valorile activităților specifice au fost mult mai mari în reacția cu esterul alifatic. Specificitatea scăzută față de esterul fenolic ca și substrat poate fi datorată unor împiedicări sterice ale compusului fenolic cu structură aromatică, voluminoasă și rigidă, care duc la limitarea accesului la centrul activ al enzimei.

Preparatele imobilizate obținute cu diferiți silani precursori au demonstrat o influență considerabilă a structurii grupării nehidrolizabile asupra eficienței catalitice a acestora. În reacția de acilare a 1-octanolului cu lauratul de vinil, unele preparate imobilizate au demonstrat activități specifice mai mari în comparație cu enzima nativă (combinația de trei silani și combinațiile tetrametoxisilanului cu octiltrimetoxisilan, propiltrimetoxisilan, feniltrimetoxisilan, viniltrimetoxisilan și dimetildimetoxisilan), în timp ce altele au prezentat activitate mai mică (combinațiile tetrametoxisilanului cu metiltrimetoxisilan, 3-aminopropiltrimetoxisilan, fenil-metil-trimetoxisilan și izobutiltrimetoxisilan). Inactivarea parțială a enzimei în timpul procesului de imobilizare nu este un fenomen neobișnuit deoarece condițiile de imobilizare pot genera modificări ale conformației situsului activ sau chiar denaturarea structurii enzimei. În cazul imobilizării prin entrapare în sol-gel cu implicarea metoxisilanului ca și precursor, când rezultă metanol ca produs secundar în reacția de policondensare, poate apărea un efect de inhibare. Prezența grupării octil nehidrolizabile în matricea de sol-gel, care induce o hidrofobicitate crescută a matricei, a dus la cele mai ridicate valori ale activității. Cea mai mare eficiență catalitică a fost demonstrată de preparatul obținut cu OcTMOS:TMOS (1:1) fără aditiv de imobilizare. În reacțiile cu esterul fenolic ca donor acil, doar preparatele imobilizate având grupări octil în compoziție au avut activitate catalitică. Cea mai mare activitate relativă comparativ cu lipaza nativă a avut-o preparatul imobilizat obținut fără aditiv, care a prezentat o activitate relativă de 33%. Este binecunoscută activarea lipazelor în medii hidrofobe, deci și grupările hidrofobe aparținând matricei sol-gel ar putea acționa în acest sens. O posibilă explicație pentru absența activității majorității preparatelor imobilizate ar putea fi o restricție însemnată a accesului inelului aromatic voluminos în matricea de sol-gel și prin urmare imposibilitatea difuziei la centrul activ al enzimei.

Lipaza din *Candida antarctica* B a fost imobilizată prin metoda de entrapare în sol-gel folosind aceeași rețetă, iar ca silani precursori un amestec binar de tetrametoxisilan și un alchiltrimetoxisilan.

Preparatul pe bază de octiltrimetoxisilan a fost cel mai eficient, urmat de cele cu izobutiltrimetoxisilan și aminopropiltrimetoxisilan. Se observă un efect de activare în cazul preparatului cu grupare octil nehidrolizabilă, în sensul că preparatul imobilizat respectiv a avut activitate specifică de trei ori mai mare decât enzima nativă. Este evident faptul că eficiența imobilizării este influențată în mare măsură și de natura enzimei, nu numai de natura silanilor și rețeta de imobilizare aleasă. Folosindu-se aceiași precursori (tetrametoxisilan și octiltrimetoxisilan) și aceleași condiții de imobilizare, preparatul obținut cu lipază din *Candida antarctica* B a avut o activitate specifică de 6 ori mai mare decât cel din *Thermomyces lanuginosus*, în condițiile în care activitățile celor două enzime native au fost aproximativ egale. Așadar, pentru obținerea esterilor aromatici, trebuie utilizată lipaza din *Candida antarctica* B.

2.3. Sinteza enzimatică a esterilor aromatici ai alditolilor

Au fost investigate două lipaze, din *Thermomyces lanuginosus* și din *Candida antarctica* B, sub formă nativă, de preparate comerciale imobilizate (Lipozyme TL IM și Novozyme 435) și de preparate imobilizate prin metoda de entrapare în sol-gel: TL (OcTMOS:TMOS = 1:1, fără aditiv), C1 (OcTMOS:TMOS = 1:1), C2 (iBuTMOS:TMOS = 1:1) și C3 (3-NH₂PrTMOS:TMOS = 1:1), în reacțiile de acilare ale unor alditoli cu cinci, respectiv șase grupări hidroxil având orientare sterică diferită (xilitol, arabitol, sorbitol și manitol) cu un ester fenolic, 3-(4-hidroxifenil) propionatul de metil (HPPME), într-un sistem binar de solvent, 10% dimetilsulfoxid și 90% *terț*-butanol. Donorul de acil aromatic a fost cel selectat anterior pentru acilarea zaharurilor nederivatizate. Amestecul de solvenți a fost ales pentru a asigura atât o solubilitate ridicată a alditolilor cât și o activitate rezonabilă a lipazei. Într-o primă etapă, a fost determinată activitatea catalitică a lipazelor investigate în reacția de transesterificare a 1-octanolului cu HPPME în *terț*-butanol, iar pe baza activității totale calculată în această reacție s-a determinat cantitatea de biocatalizator utilizată pentru reacția de acilare a alditolilor.

Se poate observa că în cazul acestor substraturi lipaza *Candida antarctica* B a fost mult mai activă decât cea din *Thermomyces lanuginosus*, indiferent dacă a fost utilizată în formă nativă sau imobilizată. Deși specificitatea lipazelor studiate față de esterul fenolic este destul de redusă, prin prelungirea timpului de reacție s-au putut obține conversii de peste 50% în cazul lipazei din *Candida antarctica* B. În cazul lipazei din *Thermomyces lanuginosus*, preparatul imobilizat prin entrapare în sol-gel conținând o grupare hidrofobă (octil) nehidrolizabilă în matricea de silice a demonstrat o eficiență catalitică mai ridicată decât preparatul imobilizat comercial și decât lipaza nativă. Acest lucru atestă eficiența metodei de imobilizare prin entrapare în sol-gel. Lipazele dețin un "capac" hidrofob care obstrucționează transportul substratului la centrul activ al enzimei și care poate fi îndepărtat în mod favorabil în timpul procesului de imobilizare. Preparatul comercial din *Candida antarctica* B (Novozyme 435), imobilizat pe suport acrilic macroporos, a dus la cele mai ridicate conversii după 72 h de reacție, demonstrând performanțe catalitice excelente. Dintre preparatele din *Candida antarctica* B imobilizate prin entrapare în sol-gel, cea cu grupare nehidrolizabilă izo-butil s-a dovedit a fi cea activă în comparație cu ceilalți silani precursori și a avut o activitate comparabilă cu cea a preparatului imobilizat comercial (Novozyme 435). Așadar, în comparație cu substratul de 1-octanol, a fost înregistrată o diferență semnificativă, în sensul că creșterea hidrofobității matricei de sol-gel datorită prezenței unor grupări alchil cu lungime de catenă mai mare de 4 atomi de carbon a avut ca efect reducerea semnificativă a activității. Acest lucru confirmă faptul că optimizarea naturii și raportului silanilor precursori din care se obține sol-gelul trebuie realizată pentru fiecare caz în parte, iar printr-o selecție corespunzătoare se pot obține preparate ce performanțe catalitice excelente.

În spectrele de masă (MALDI TOF) s-au observat valorile $m/z = 323,3$ care corespund maselor moleculare ale aducțiilor cu sodiu ai monoesterilor xilitolului și arabitolului, valorile $m/z = 353,3$ care corespund maselor moleculare ale aducțiilor cu sodiu ai manitolului și sorbitolului, în timp ce valori $m/z = 471$ și 501 corespunzătoare maselor moleculare ale aducțiilor cu sodiu ai diesterilor alditolilor nu au fost detectate.

A fost de asemenea investigat efectul diferiților parametri de reacție asupra eficienței sintezei esterilor aromatici ai alditolilor utilizând acidul 3-(4-hidroxifenil)-propionic ca donor de acil și lipaza Novozyme 435 ca și biocatalizator. Au fost determinate conversiile, vitezele inițiale de reacție și distribuția mono- și diesterilor obținuți. Selecția preparatului comercial Novozyme 435 pentru această reacție s-a făcut pe baza studiului anterior în care această enzimă a demonstrat cea mai mare eficiență catalitică, dar și pe

experimente anterioare realizate în grupul nostru, care au dus la concluzia că această enzimă este cea mai potrivită pentru reacții de esterificare directă.

Sinteza enzimatică a esterilor aromatici a patru alditoli (xilitol, arabitol, manitol și sorbitol) a fost realizată în mediu de *terț*-butanol pur și în amestecuri binare de *terț*-butanol și dimetilsulfoxid. Deoarece studiile preliminare au arătat că esterificarea directă a avut loc cu conversii mai mari decât transesterificarea, la același timp de reacție (72 de ore), aceasta a fost studiată mai detaliat. A fost investigată influența unor parametri de reacție precum timpul de reacție, temperatura, raportul molar, cantitatea de enzimă și cantitatea de site moleculare asupra conversiei și distribuției produșilor de reacție.

Evoluția reacției de esterificare a fost monitorizată cu ajutorul cromatografiei de lichide, iar identificarea și caracterizarea produșilor de reacție s-au realizat utilizând spectrometria de masă (metoda MALDI TOF), spectroscopia de infraroșu și spectroscopia de rezonanță magnetică nucleară.

Influența mediului de reacție

Rezultatele au arătat că pentru toți alditolii studiați, cele mai mari conversii totale au fost obținute în *terț*-butanol pur, iar odată cu creșterea procentului de dimetilsulfoxid în mediul de reacție conversiile au scăzut. Activitatea enzimei a fost aproape total inhibată la un conținut de dimetilsulfoxid de 20%. Acest comportament poate fi datorat interacțiunilor dintre apă și dimetilsulfoxid, peste o anumită concentrație a apei. Cele mai ridicate conversii totale după 72 ore de reacție au fost cuprinse între 92% pentru xilitol și 64% pentru manitol. În aceleași condiții de reacție, pentitolii au fost esterificați cu conversii mai ridicate decât hexitolii. Utilizând exces de HPPA, selectivitatea a fost observată față de esterificarea grupărilor hidroxil primare, cu formarea mono- și diesterilor în cantități comparabile. Doar cu manitol ca și substrat, produsul format conține un procent mai mare de diester (cel puțin 70%). Formarea triesterilor a fost detectată prin analiza MALDI TOF MS dar nu a putut fi cuantificată în cromatograma HPLC a produșilor de reacție. Analizele RMN au arătat că monoesterii și diesterii alditolilor au fost substituiți doar la grupările hidroxil primare. Monosubstituția grupărilor hidroxil primare ale sorbitolului și arabitolului poate da doi diastereoizomeri, dar investigația stereochemică a monoesterilor formați nu a fost efectuată în acest studiu.

Influența temperaturii

Pentru optimizarea conversiilor a fost investigată influența temperaturii de reacție asupra esterificării directe a alditolilor cu HPPA, între 40°C și 70°C, în *terț*-butanol. Reacțiile au fost monitorizate în timp, până la 72 ore. La creșterea temperaturii de reacție se obțin conversii mai ridicate datorită scăderii energiei de activare, creșterii solubilității alditolului în *terț*-butanol, reducerii vâscozității și reducerii limitării transferului de masă. În acest studiu, temperatura optimă pentru sinteza enzimatică a esterilor aromatici ai alditolilor a fost de 60°C. La 70°C conversia a scăzut, probabil datorită unei inactivări termice parțiale a enzimei. Indiferent de temperatura de reacție și de natura alditolilor, randamentele de esterificare au crescut în timp, în perioada de incubare studiată (până la 72 ore), dar la 70°C la un timp de reacție prelungit (de la 48 la 72 ore) se observă doar o creștere mică a conversiilor. Conversiile cele mai ridicate obținute pentru pentitoli (98% pentru arabitol și 94% pentru xilitol), în condițiile optime de reacție, pot fi explicate prin difuzia facilă a moleculelor mici de substrat la centrul catalitic activ al enzimei. Chiar dacă timpul de reacție necesar pentru atingerea conversiei maxime a fost mai mare, aceste rezultate sunt comparabile cu valorile raportate pentru esterificarea alditolilor cu acizii grași alifatici.

Influența raportului molar alditol/acid 3-(4-hidroxifenil) propionic

În acest studiu a fost utilizat atât exces de HPPA cât și de alditol, în condițiile de reacție optime determinate anterior, la 60°C în *terț*-butanol. Concentrația reactantului limitativ a fost setată la 50 mM și aceeași cantitate de enzimă s-a folosit în toate investigațiile și anume 0,5 g/mol reactant limitativ. Randamentele au fost raportate la reactantul limitativ, la acid în cazul excesului molar de alditol și la alditol în cazul excesului molar de acid. Pentru toți alditolii studiați, cele mai ridicate conversii totale au fost obținute la un exces molar de HPPA de trei ori. Creșterea excesului de HPPA de la două la trei ori a dus la îmbunătățirea conversiei totale fără formarea triesterului. Atât excesul molar de acid cât și de alditol (până la trei ori) a fost benefic pentru conversia totală, aceasta fiind mai mare decât în cazul raportului molar de 1:1. La utilizarea excesului de HPPA, produsul principal de reacție format a fost diesterul, în timp ce utilizarea excesului de alditol a dus la randamente ridicate de monoester și conversii totale mai mici. Conversia la monoester a fost mai puțin dependentă de raportul molar al reactanților decât conversia la diester, care a fost mai mică de 10% în cazul excesului de alditol și mai mare de 60% la utilizarea unui exces de acid. Evoluția în timp a formării mono- și diesterului a fost investigată în studiul cinetic.

Influența raportului enzimă/substrat

Concentrația de enzimă a fost raportată la reactantul limitativ (în acest studiu fiind alditolul) și a fost exprimată ca g/mol alditol. În cazul pentitolilor (arabitol și xilitol), conversia a crescut cu creșterea încărcării cu enzimă, până la 1 g/mol alditol, deși jumătate din cantitatea de enzimă (0,5 g/mol) a fost suficientă pentru atingerea unei conversii de 90% în intervalul de timp studiat. Prezența unei cantități mai mari de enzimă furnizează mai multe situsuri active pentru formarea complexului acil-enzimă, ceea ce duce la conversii mai ridicate. Pentru sinteza esterilor hexitolilor (manitol și sorbitol), a fost observată o scădere foarte mică a conversiei prin creșterea cantității de enzimă peste 0,5 g/mol alditol. După cum s-a menționat anterior, moleculele de pentitoli pot difuza mai ușor la centrul activ al enzimei decât hexitolii și echilibrul reacției este atins mai repede. Creșterea concentrației de enzimă peste o anumită valoare a avut ca rezultat conversii mai mici, probabil datorită limitării transferului de masă.

Influența cantității de site moleculare

În cazul reacțiilor fără adaos de site moleculare au fost înregistrate cele mai mici randamente, fiind cunoscut faptul că reacția de esterificare este favorizată termodinamic de un conținut redus de apă. Creșterea cantității de site moleculare până la 0,04 g a avut ca rezultat creșterea randamentelor de reacție, iar la cantități mai mari de 0,04 g randamentele au scăzut. În general, scăderea conversiei prin adăugarea unei cantități de site moleculare peste o anumită limită se poate datora unei eliminări excesive a apei, fiind astfel îndepărtată și o parte din apa necesară pentru menținerea conformației active a enzimei.

Studii cinetice

A fost studiată evoluția în timp a sintezei mono- și diesterilor de alditoli cu HPPA ca donor acil, la o concentrație de alditol de 50 mM. În primele ore, viteza de reacție pentru sinteza monoesterilor a fost mult mai mare decât cea pentru sinteza diesterilor. Apoi, conținutul de monoester a rămas constant, de la timpul de 24 ore până la sfârșitul monitorizării reacției. În ceea ce privește concentrația de diester, creșterea lentă din primele 8 ore a fost urmată de îmbunătățiri semnificative în intervalul de timp 8 – 24 ore de reacție și o creștere aproape liniară până la 72 ore. Studiile cinetice au fost efectuate pentru acilarea xitolului, arabitolului, manitolului și sorbitolului cu acidul 3-(4-

hidroxifenil) propionic în mediu de *terț*-butanol, la 50°C, la diferite concentrații de alditol (10 – 150 mM) menținând constantă concentrația de biocatalizator la 1 g/mol alditol. Valorile constantei Michaelis – Menten (K_M) și vitezei maxime (V_{max}) au fost obținute pe baza diagramelor Lineweaver – Burk și au fost utilizate pentru calculul constantelor cinetice k_{cat} și eficienței catalitice (k_{cat}/K_M).

Parametri cinetici au fost analizați pentru formarea monoesterului. Vitezele inițiale de reacție, calculate pentru fiecare concentrație de substrat, au permis determinarea constantelor K_M și V_{max} , prezentate în Tabelul 2.10. Valorile K_M au crescut de la 83 la 93 indicând o ușoară scădere a afinității enzimei pentru alditoli, în ordinea: arabitol > xilitol > sorbitol > manitol. Eficiența catalitică a enzimei a crescut în aceeași ordine fiind de peste 2,5 ori mai ridicată pentru arabitol decât pentru manitol.

Caracterizarea esterilor aromatici ai alditolilor

Prođușii de reacție obținuți au fost separați folosind cromatografia în strat subțire, cromatografia de lichide (HPLC), și caracterizați folosind spectrometria de masă (MALDI TOF), spectroscopia FT – IR și RMN. Analizele MALDI TOF MS au arătat formarea monoesterilor, diesterilor și cantități mici de triesteri pentru toți alcoolii de zaharuri studiați. În vederea identificării și confirmării structurilor esterilor aromatici ai alditolilor, s-au efectuat analizele ^1H -RMN, ^{13}C -RMN și DEPT 135 pentru produșii de reacție obținuți în urma separării pe coloană cromatografică. Spectrele FT – IR confirmă structura esterilor obținuți, regăsindu-se semnalele caracteristice ale alditolului și respectiv acidului cu componentă aromatică dar mai ales ale legăturii esterice formate. Semnalele cele mai semnificative pentru grupările funcționale ale esterilor aromatici ai alditolilor sunt cele ale vibrației de valență ale grupărilor hidroxil provenite din polioli dar și din compusul fenolic (aproximativ 3400), grupările metilenice, care prezintă benzi de valență între 2800 și 3000 cm^{-1} și grupările carbonil provenind din legătura esterică (1700-1730). În Figura 1 sunt redată comparativ spectrele FT – IR pentru arabitol, monoesterul aromatic al arabitolului și diesterul aromatic al arabitolului.

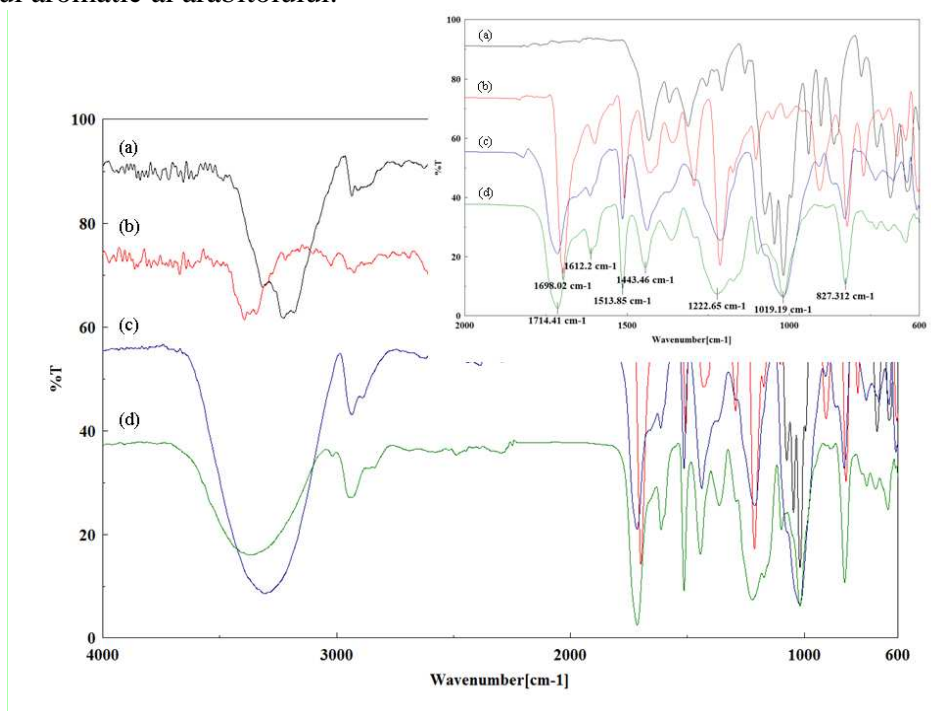


Figura 1. Spectrele FT – IR pentru a) arabitol; b) HPPA; c) 1-arabitil-3-(4-hidroxifenil)-propionat; d) 1,6-arabitil-di-3-(4-hidroxifenil)-propionat.

Structurile esterilor aromatici ai alditolilor confirmate sunt prezentate în Figura 2.

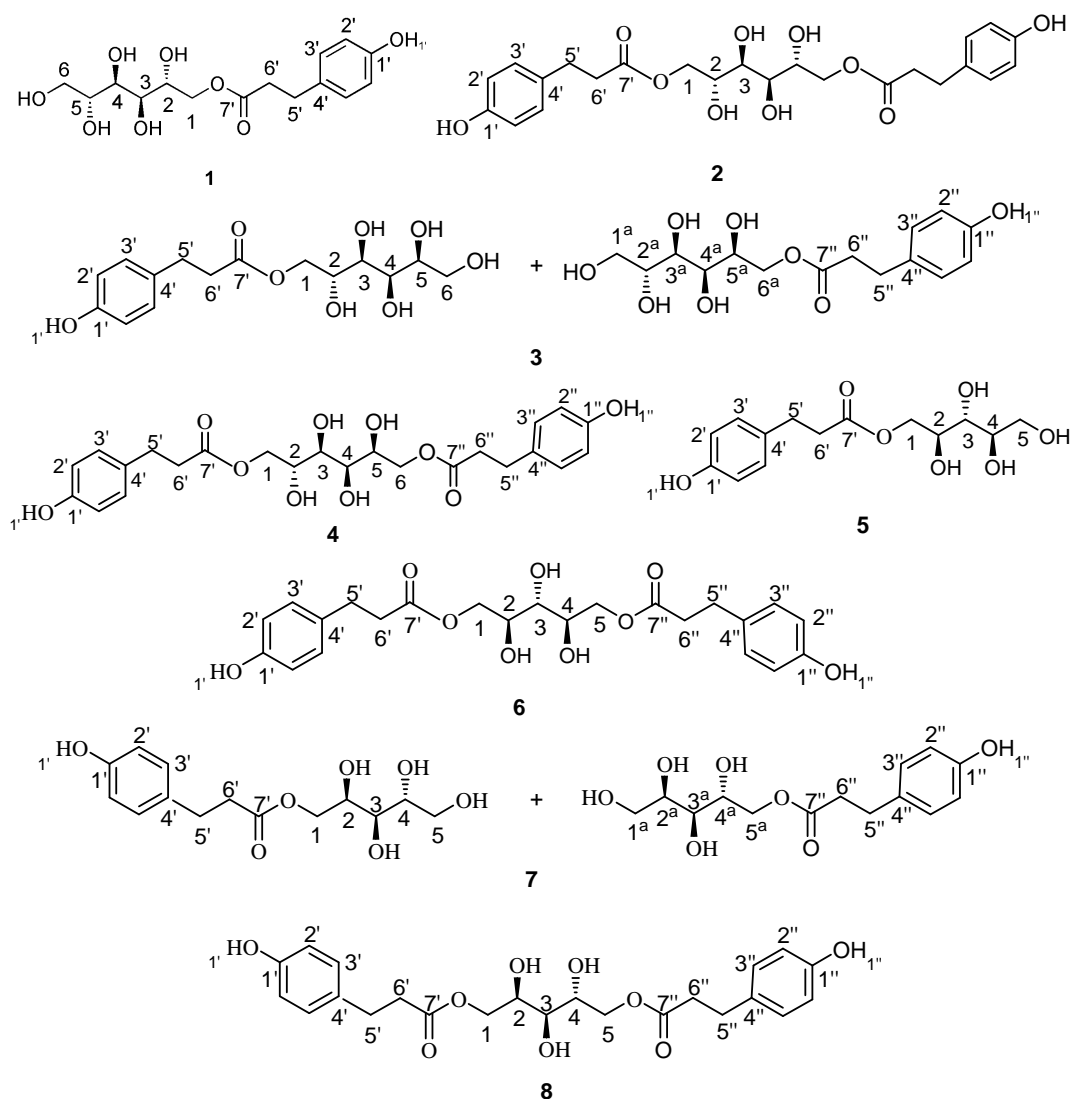


Figura 2. Structura 1-manitol-3-(4-hidroxiifenil)-propionat (1); 1,6-manitol di-3-(4-hidroxiifenil)-propionat (2); 1-sorbitil-3-(4-hidroxiifenil)-propionat și 6-sorbitil-3-(4-hidroxiifenil)-propionat (3); 1,6-sorbitil di-3-(4-hidroxiifenil)-propionat (4); 1-xilitil-3-(4-hidroxiifenil)-propionat (5); 1,5-xilitil di-3-(4-hidroxiifenil)-propionat (6); 1-arabitol-3-(4-hidroxiifenil)-propionat și 5-arabitol-3-(4-hidroxiifenil)-propionat (7); 1,5-arabitol di-3-(4-hidroxiifenil)-propionat (8).

Spectrele RMN au arătat că substituția a avut loc numai la grupările hidroxil primare ale alditolilor.

2.4. Sinteza enzimatică și caracterizarea esterilor aromatici ai alchilglucozidelor și acetalilor de zaharuri

Importanța introducerii selective și îndepărtării grupărilor protectoare în sinteza organică este bine cunoscută și alegerea unei metode corespunzătoare depinde de stabilitatea grupărilor protectoare în diferitele condiții de reacție pentru o linie de sinteză dată. Protejarea grupărilor hidroxil cu grupări eterice este recunoscută ca o alternativă de mare utilitate. Printr-o astfel de abordare, au fost sintetizați și caracterizați esterii aromatici ai alchilglucozidelor și acetalilor de zaharuri utilizând diferite linii de sinteză ce vor fi discutate în subcapitolele următoare.

Sinteza esterilor aromatici ai alchilglucozidelor

Alchil glucozidele au fost supuse reacției de esterificare cu acidul 3-(4-hidroxifenil) propionic în prezența lipazei Novozyme 435, cu formarea esterilor aromatici corespunzători. Aceste reacții au avut loc cu randamente de 63% în cazul α -metil glucozei și de 77% în cazul β -octil glucozei după 72 ore de reacție, iar după 5 zile de reacție conversia a fost aproape totală (91% și respectiv 93%). Solubilitatea alchilglucozidelor în mediul de reacție (*terț*-butanol) este mai ridicată comparativ cu cea a glucozei, datorită grupărilor alchil hidrofobe din moleculă, astfel că reactivitatea acestora crește considerabil. Timpul de reacție necesar pentru atingerea conversiei maxime a fost mai îndelungat comparativ cu cel necesar în reacțiile de esterificare a alditolilor, studiate în această lucrare, aceștia din urmă având o structură liniară, mai accesibilă pentru enzimă decât structura ciclică a alchilglucozidelor. Reacțiile au fost monitorizate prin cromatografie în strat subțire și cromatografie de lichide (HPLC). Producții de reacție au fost identificați cu ajutorul spectrometriei de masă (MALDI TOF) și caracterizați prin spectroscopie IR și RMN, după purificarea prin separare pe coloană cu silicagel. Spectrele RMN au arătat că reacțiile au avut loc cu regioselectivitate mare, deoarece substituția a avut loc exclusiv la gruparea hidroxil primară a alchilglucozidelor testate. Randamentele au fost determinate din analizele HPLC, pe baza dreptelor de etalonare ale produșilor puri.

Caracterizarea esterilor aromatici ai alchilglucozidelor

Spectrele de masă MALDI TOF au arătat formarea monoesterilor aromatici a celor două alchilglucozide. Spectroscopia în infraroșu a fost utilizată pentru caracterizarea monoesterilor aromatici ai alchilglucozidelor obținuți în urma separării pe coloană gravitațională cu silicagel. Spectrele FT – IR confirmă structura esterilor obținuți, regăsindu-se benzile caracteristice ale alchilglucozei și acidului aromatic, dar și ale legăturii esterice formate. Benzile care confirmă prezența grupărilor funcționale semnificative din structura esterilor aromatici ai alchilglucozidelor sunt cele ale vibrațiilor de valență ale grupărilor hidroxil, provenite din molecula glucozei dar și din compusul fenolic ($3300\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$), ale grupărilor metilen la aproximativ 2900 cm^{-1} și ale grupărilor carbonil esterice (1715 și 1719 cm^{-1}). În vederea identificării și confirmării structurilor esterilor aromatici ai alchilglucozidelor, s-au efectuat analizele ^1H -RMN, ^{13}C -RMN și DEPT 135 pentru producții de reacție obținuți în urma separării pe coloană cromatografică. Atribuirea semnalelor în spectrele ^{13}C -RMN și ^1H -RMN ale 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de β -octil-glucoză a fost efectuată și pe baza experimentelor 2D-COSY și 2D-HSQC (Figura 3).

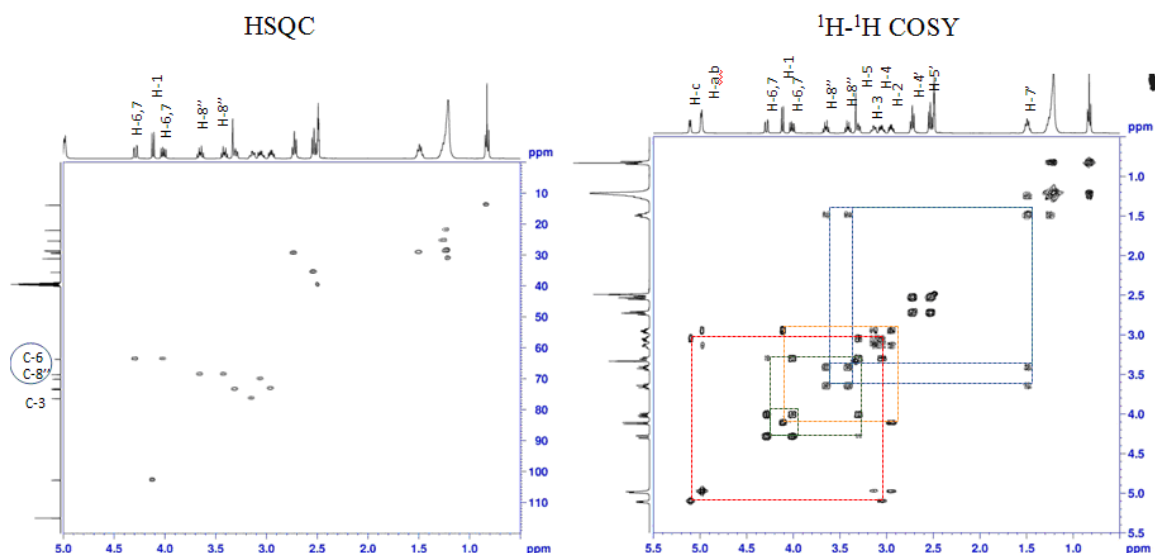


Figura 3. Spectrele 2D-HSQC și 2D-COSY pentru 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatul de β -octil-glucoză (DMSO-d₆).

Sinteza și caracterizarea 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 1,2-O-izopropilidenglucofuranoză

Strategia de sinteză ce s-a avut în vedere pornește de la D-glucoză și presupune diacetonarea în cataliză acidă (cu acid sulfuric concentrat) pentru a obține derivatul di-izopropilidenic al glucozei. Hidroliza în mediu acid a acestuia, urmată de neutralizare, a dus la deprotejarea selectivă a grupărilor hidroxil din pozițiile 5 și 6, obținându-se astfel derivatul mono-izopropilidenic al glucozei, cu randament de 56%. Gruparea hidroxil primară din poziția 6 a fost astfel eliberată în vederea esterificării cu acidul 3-(4-hidroxifenil) propionic, în *terț*-butanol, catalizată de lipaza Novozyme 435, obținându-se esterul aromatic al monoacetalului de glucoză. Analizele cantitative prin HPLC au arătat un randament de monoester la reacția de esterificare enzimatică de 60% după 72h, iar după 5 zile o conversie aproape totală (92%). Randamentul de esterificare a fost calculat pe baza analizelor HPLC, cu ajutorul dreptei de etalonare pentru esterul pur.

Etapele de izopropilidenare a glucozei și cea de hidroliză selectivă a grupării acetal din pozițiile 5,6 au fost monitorizate cu ajutorul cromatografiei în strat subțire. Spectrele ¹³C-RMN, ¹H-RMN și DEPT 135 au confirmat structura 1,2-O-izopropilidenglucofuranozei. În spectrele FT – IR se observă diminuarea considerabilă a intensității benzii corespunzătoare grupărilor hidroxil (la aproximativ 3400 cm⁻¹) în urma izopropilidenării acestora în pozițiile 1,2 și 5,6, concomitent cu intensificarea semnalelor caracteristice legăturii eterice de la 1377 cm⁻¹.

Etapele de esterificare enzimatică a 1,2-O-izopropilidenglucofuranozei a fost monitorizată atât prin cromatografie în strat subțire cât și prin cromatografie de lichide (HPLC). Produsul final al reacției a fost purificat prin separare pe coloană cu silicagel, identificat prin spectrometrie de masă (MALDI TOF) și caracterizat prin spectrofotometrie în infraroșu (Figura 4) și spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară. Atribuirea semnalelor în spectrele ¹³C-RMN și ¹H-RMN ale 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 1,2-O-izopropilidenglucofuranoză a fost efectuată și pe baza experimentelor 2D-COSY și 2D-HSQC.

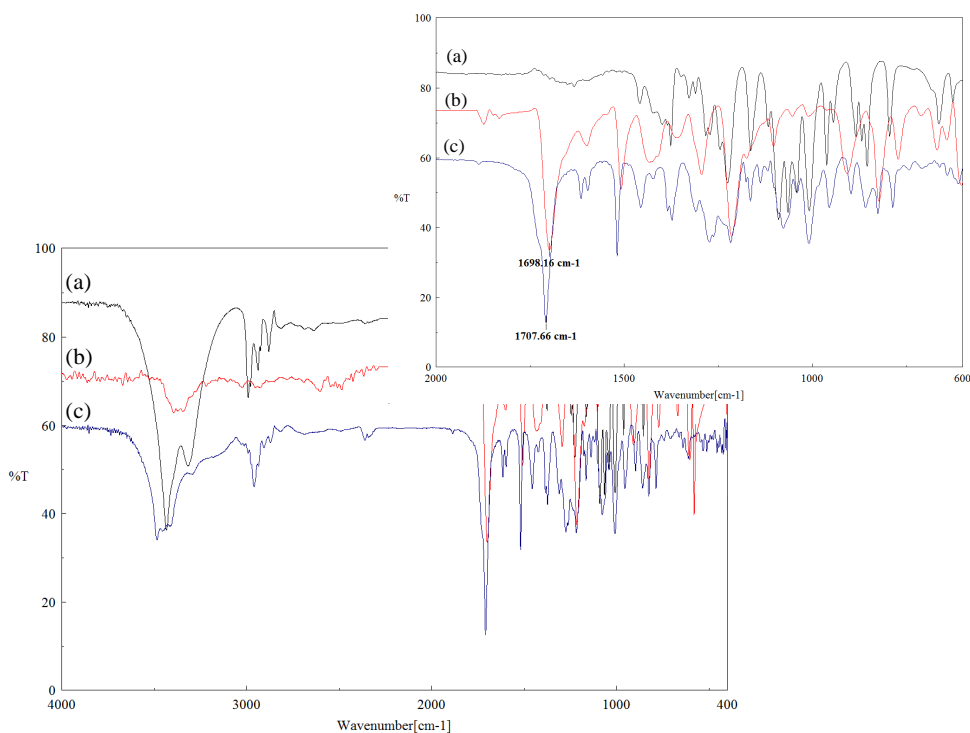


Figura 4. Spectrele FT-IR pentru a) 1,2-O-izopropiliden-glucofuranoza, b) HPPA, c) 6-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatul de 1,2-O-izopropiliden-glucofuranoza.

Sinteza și caracterizarea 3-(4-hidroxifenil)-propionatului de mono-O-izopropilidenzaharoză și 6'-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 2,1':4,6-di-O-izopropilidenzaharoză

Zaharoza a fost derivatizată prin izopropilidenare în cataliză acidă (acid p-toluensulfonic) cu 2,2-dimetoxipropan, cu obținerea unui amestec format din derivatul mono-izopropilidenic și di-izopropilidenic al acesteia (2,1':4,6-di-O-izopropilidenzaharoză). Conversia totală a zaharozei în această etapă a fost de 64%. În a doua etapă, amestecul format din derivații izopropilidenici ai zaharozei a fost supus esterificării enzimatică cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic, în prezența lipazei Novozyme 435, în *terț*-butanol, cu formarea monoesterului aromatic de mono-O-izopropilidenzaharoză și 6'-O-3-(4-hidroxifenil)-propionatului de 2,1':4,6-di-O-izopropilidenzaharoză, conversia totală în această etapă fiind de 27%, după 4 zile de reacție. Conversia totală în etapa de esterificare enzimatică a fost determinată cu ajutorul cromatografiei de lichide (HPLC), pe baza consumării HPPA. Reacția de acetalizare a zaharozei a fost monitorizată cu ajutorul cromatografiei în strat subțire, iar reacția enzimatică prin cromatografie de lichide (HPLC). Spectrometria de masă (MALDI TOF) a fost utilizată pentru identificarea intermediarilor de reacție și produșilor finali (Figura 5).

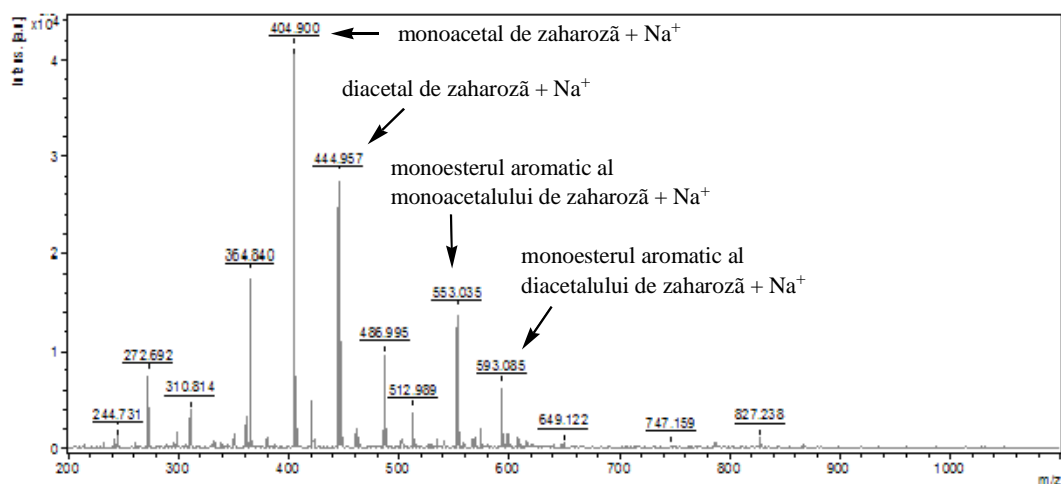


Figura 5. Spectrul (+) MALDI TOF MS al amestecului de reacție de la acilarea amestecului de mono-izopropilidenzaharoză și 2,1',4,6-di-O-izopropiliden zaharoză cu HPPA, catalizată de Novozyme 435, după 72 ore de reacție.

Derivatul di-izopropilidenic al zaharozei a fost purificat prin separare pe coloană și apoi caracterizat prin spectroscopie de infraroșu și spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară.

Sinteza și caracterizarea esterilor aromatici ai inulinei

Schema de reacții avută în vedere a pornit de la inulină (amestec de oligozaharide cu DP = 2 – 7, cele mai abundente fiind cele cu DP = 3, 4 și 5) și a presupus izopropilidenarea acesteia în cataliză acidă (acid p-toluensulfonic) cu 2,2-dimetoxipropan obținându-se un amestec de derivați izopropilidenici ai inulinei. Amestecul brut a fost supus mai departe esterificării enzimatică cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic, în *terț*-butanol, în prezența Novozyme 435. Spectrele de masă au arătat formarea derivaților mono-, di- și tri-izopropilidenici la DP = 2 – 5 precum și a mono- și diesterului aromatic al monoacetalului de inulină la gradul de polimerizare 2 și monoesterului aromatic al monoacetalului de inulină la gradul de polimerizare 3. Conversia totală în etapa de acetalizare a inulinei a fost de 52%, iar în etapa de esterificare enzimatică a fost de 24% după 4 zile de reacție. Reacția de acetalizare a inulinei a fost monitorizată în timp cu ajutorul cromatografiei în strat subțire, iar reacția de esterificare enzimatică a acetalilor de inulină a fost monitorizată prin cromatografie de lichide (HPLC). Conversia totală în etapa enzimatică a fost determinată pe baza analizelor HPLC, pe baza consumării HPPA. Pentru identificarea intermediarilor de reacție și a produșilor finali a fost utilizată spectrometria de masă (MALDI TOF). În spectrul de masă al amestecului de reacție de la acilarea enzimatică a acetalilor inulinei cu HPPA au fost identificate valorile m/z corespunzătoare aducțiilor cu sodiul ai esterilor aromatici formați cu derivații izopropilidenici de inulină și anume la gradul de polimerizare 2 au fost identificați aducții cu sodiul ai monoesterului și diesterului aromatic cu monoacetalul (compusul 1 cu $m/z = 553$, compusul 3 cu $m/z = 701$), monoesterului aromatic cu diacetalul (compusul 2 cu $m/z = 593$) iar la gradul de polimerizare 3 a fost identificat aductul cu sodiu al monoesterului aromatic cu monoacetalul (compusul 3 cu $m/z = 717$).

Sinteza și caracterizarea 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei și 2,3:5,6:4',6'-tri-O-izopropiliden dimetil lactozei

S-a propus derivatizarea lactozei prin izopropilidenare în mediu acid (acid p-toluensulfonic) cu 2,2-dimetoxipropan, la reflux, cu obținerea unui amestec format din doi derivați tri-izopropilidenici și anume 2,3:5,6:4',6'-tri-O-izopropiliden dimetil lactoza și 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil lactoza. Acești compuși au fost purificați prin cromatografie pe coloană cu silica gel, iar 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil lactoza a fost supusă mai departe esterificării enzimatică cu HPPA, în *terț*-butanol, la 60°C, în prezența Novozyme 435. Reacția de acetalizare a lactozei a fost monitorizată prin cromatografie în strat subțire iar reacția de esterificare enzimatică a fost monitorizată atât prin cromatografie în strat subțire cât și prin cromatografie de lichide (HPLC) și spectrometrie de masă (MALDI TOF). Pe baza analizei HPLC și a spectrului de masă s-a concluzionat că esterificarea enzimatică a grupării hidroxil primare a derivatului tri-O-izopropilidenic nu a avut loc, probabil datorită unor fenomene de împiedicare sterică având în vedere prezența grupării acetal în pozițiile 3',4' și structura mai voluminoasă a acidului cu componentă aromatică. Acetalii de lactoză purificați au fost caracterizați prin spectroscopie de infraroșu și spectroscopie de rezonanță magnetică nucleară.

În Figura 6 sunt ilustrate comparativ spectrele FT – IR ale lactozei și 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil acetalului de lactoză. Dacă lactoza prezintă un semnal intens la aproximativ 3400 cm⁻¹ corespunzând grupărilor hidroxil libere, la izopropilidenarea grupărilor hidroxil din diferite poziții se remarcă diminuarea considerabilă a acestei benzi concomitent cu intensificarea semnalelor caracteristice legăturii eterice de la aproximativ 1370 cm⁻¹.

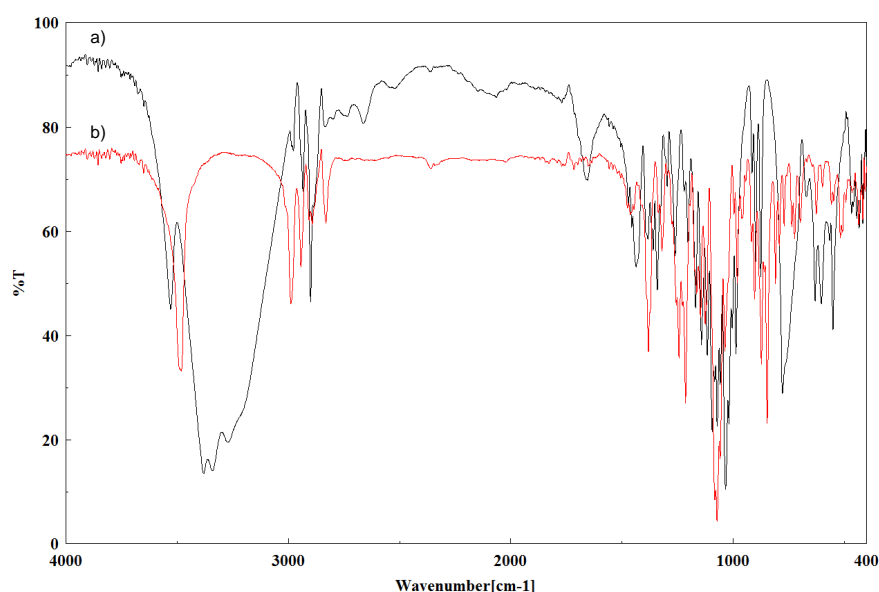


Figura 2.62. Spectrele FT – IR pentru a) lactoză și b) 2,3:5,6:3',4'-tri-O-izopropiliden dimetil acetalului de lactoză.

3. Partea experimentală

În acest capitol sunt prezentate procedurile experimentale folosite pentru imobilizarea lipazelor prin metoda de entrapare în sol-gel, reacțiile de acilare catalizate de aceste lipaze, reacțiile de sinteză a esterilor aromatici ai zaharurilor și derivaților de zaharuri precum și metodele de analiză folosite.

4. Concluzii finale

Din studiile experimentale, efectuate în conformitate cu obiectivele stabilite, au rezultat următoarele concluzii:

Determinarea specificității lipazelor native și immobilizate prin entrapare în sol-gel față de substraturi alifatic și aromatic

1. Dintre zece lipaze native testate, cele provenind din *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia* și lipaza din pancreas de porc au demonstrat activitate catalitică în reacția de transesterificare a 1-octanolului cu laurat de vinil, în timp ce în reacția de acilare a 1-octanolului cu 3-(4-hidroxifenil) propionatul de metil, doar lipazele din *Candida antarctica* B, *Thermomyces lanuginosus* și *Pseudomonas fluorescens* au fost active catalitic.
2. Dintre substraturile fenolice testate, doar 3-(4-hidroxifenil) propionatul de metil și acidul 3-(4-hidroxifenil) propionic au dus la formarea produșilor de reacție în condițiile studiate.
3. Specificitatea lipazelor testate a fost aceeași atât pentru esterul alifatic cât și pentru esterul cu componentă aromatică, dar valorile activităților specifice au fost mult mai mari în reacția cu esterul alifatic decât în reacția cu esterul cu componentă aromatică, ceea ce atestă că acizii cu componentă aromatică sunt substraturi mai dificile în comparație cu acizii alifatici.
4. Lipaza din *Thermomyces lanuginosus* a demonstrat specificitate pentru diferite zaharuri studiate și activitatea catalitică cea mai mare pentru reacția cu esterul cu componentă aromatică ca donor acil. Lipaza din *Candida antarctica* B pare a fi foarte activă față de alditoli ca și substraturi, ceea ce reprezintă o posibilitate nouă în vederea obținerii unor esteri aromatici ai alditolilor.
5. S-a realizat imobilizarea eficientă a mai multor lipaze microbiene prin metoda de entrapare în sol-gel, folosind amestecuri binare și ternare de silani precursori, în diferite rapoarte molare.
6. Preparatele immobilizate cu lichide ionice ca aditivi au dovedit activitate de esterificare ridicată și randamente de regăsire a activității totale după imobilizare mai mari de 100%, în majoritatea cazurilor, creșterea lungimii catenei hidrocarbonate din lanțul alchil legat de gruparea imidazolică având efect favorabil asupra activității.
7. Pentru reacția de acilare a 1-octanolului cu laurat de vinil s-a observat influența favorabilă a unei matrici mai hidrofobe, conținând grupări octil nehidrolizabile, provenite din precursorul silanic.
8. Acilarea 1-octanolului cu un ester cu componentă aromatică (HPPME) are loc mult mai greu decât reacția similară cu esterul alifatic, dar preparatul cel mai activ a fost și în acest caz cel obținut pe bază de octiltrimetoxisilan. Natura enzimei care se supune imobilizării este foarte importantă, lipaza din *Candida antarctica* B immobilizându-se cu eficiență mult mai mare decât cea din *Thermomyces lanuginosus*.

Sinteza enzimatică și caracterizarea esterilor aromatici ai alditolilor

1. În reacția de transesterificare a alditolilor cu HPPME lipaza din *Candida antarctica* B a demonstrat cea mai mare eficiență catalitică, în special preparatul comercial Novozyme 435.
2. Preparatele imobilizate prin entrapare în sol – gel s-au dovedit a fi biocatalizatori mai eficienți catalitic decât enzima nativă, demonstrând eficiența ridicată a metodei de entrapare în matrici hibride organice/anorganice.
3. Pentru lipaza din *Candida antarctica* B imobilizată prin metoda sol-gel, prezența grupării izobutil nehidrolizabilă în matricea de silice a fost cea mai favorabilă, obținându-se o activitate apropiată de cea a preparatului comercial Novozyme 435.
4. Mono- și diesterii aromatici ai xilitolului, arabitolului, sorbitolului și manitolului au fost sintetizați utilizând Novozyme 435 în mediu de solvent organic, cu conversii ridicate.
5. S-a realizat optimizarea parametrilor care influențează reacția: temperatura, timpul de reacție, raportul enzimă/substrat, raportul molar alditol/HPPA, cantitatea de site moleculare, obținându-se conversii aproape totale în condițiile de reacție cele mai favorabile.
6. Studiile cinetice efectuate au arătat că în primele ore, viteza de reacție pentru formarea monoesterului este mai mare decât viteza de reacție pentru producerea diesterului, iar după acest interval de timp concentrația diesterului crește liniar în timp iar concentrația monoesterului rămâne aproximativ constantă.
7. Parametri cinetici ai reacției de acilare arată că enzima prezintă afinitatea cea mai mare pentru arabitol, urmată de xilitol, sorbitol iar afinitatea cea mai mică față de manitol.
8. Analizele de masă au demonstrat formarea mono-, di- și chiar triesterilor la un timp prelungit de reacție pentru toți alditolii studiați, iar spectrele RMN au arătat că substituția a avut loc numai la grupările hidroxil primare ale alditolilor.
9. Controlul parametrilor reacției permite producerea de monoesteri sau diesteri ca produși principali.

Sinteza enzimatică și caracterizarea esterilor aromatici ai alchilglucozidelor și acetalilor de zaharuri

1. Prezența grupărilor alchil și respectiv izopropilidenice în structura zaharurilor a dus la creșterea solubilității lor în mediul de reacție și astfel la creșterea reactivității lor, comparativ cu zaharurile neprotejate.
2. Monoesterii aromatici ai α -metil-glucozei și β -octil-glucozei au fost sintetizați enzimatic în mediu de solvent organic, cu randamente ridicate.
3. Derivatizarea zaharurilor cu grupări izopropilidenice a avut loc cu randamente de peste 50%, iar grupările hidroxil primare (din poziția 6 în cazul glucozei și din poziția 6' în cazul lactozei și zaharozei) au rămas neprotejate, în vederea esterificării enzimatic.
4. Prin spectroscopie RMN s-a demonstrat că acilarea cu acidul cu componentă aromatică a avut loc numai la grupările hidroxil primare.
5. Monoesterul aromatic al monoacetonglucozei a fost obținut enzimatic cu randament de peste 90%, după 5 zile de reacție.

6. În cazul zaharozei, spectrele de masă au arătat formarea monoesterilor aromatici ai derivaților mono- și di-izopropilidenati.
7. Spectrometria de masă a arătat formarea derivaților mono- și di-izopropilidenici ai inulinei la grade de polimerizare cuprinse între 2 și 6 precum și a derivaților tri-izopropilidenici la grade de polimerizare între 3 și 5. Prin esterificare cu acid 3-(4-hidroxifenil) propionic s-au format esterii aromatici ai mono- și diacetalilor de inulină, la grad de polimerizare 2 și esterul aromatic al monoacetalului, la grad de polimerizare 3.
8. Confirmarea structurii esterilor aromatici sintetizați, prin spectrometrie de masă, spectroscopie de FT – IR și spectroscopie RMN, demonstrează valabilitatea metodei chemo-enzimatice elaborate pentru sinteza esterilor aromatici ai zaharurilor.

Bibliografie selectivă

- [1]. Plou F. J., Cruces M. A., Ferrer M., Fuentes G., Pastor E., Bernabé M., Christensen M., Comelles F., Parra J. L., Ballesteros A., *Journal of Biotechnology*, **2002**, 96, 55 – 66
- [2]. Arcos J. A., Bernabé M., Otero C., *Biotechnology and Bioengineering*, **1998**, 57 (5), 505 – 509
- [3]. Anderson E. M., Larsson K. M., Kirk O., *Biocatalysis and Biotransformations*, **1998**, 16, 181 – 204
- [4]. Zarcuța C., Kiss C., Corici L., **Croitoru R.**, Csunderlik C., Peter F., *Revista de Chimie*, **2009**, 60 (9), 922 – 927
- [5]. Zarcuța C., Corici L., **Croitoru R.**, Ursoiu A., Peter F., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2010**, 65, 79 – 86
- [6]. Ganske F., Bornscheuer U. T., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2005**, 36, 40 – 42
- [7]. Van Oosterom M. W., Van Rantwijk F., Sheldon R. A., *Biotechnology and Bioengineering*, **1996**, 49, 328 – 333
- [8]. Sarney D. B., Barnard M. J., MacManus D. A., Vulfson E. N., *Journal of the American Oil Chemist's Society*, **1996**, 73 (11), 1481 – 1487
- [9]. Baer H.H., Abbas S.A., *Carbohydrate Research*, **1979**, 77, 117 – 129
- [10]. Ter Haar R., Schols H. A., Van den Broek L. A. M., Saglam D., Frissen A. E., Boeriu C. G., Gruppen H., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2010**, 62, 183 – 189
- [11]. Otto R. T., Bornscheuer U. T., Syldatk C., Schmid R. D., *Biotechnology Letters*, **1998**, 20 (4), 437 – 440
- [12]. Rufino A. R., Biaggio F. C., Santos J. C., de Castro H. F., *International Journal of Biological Macromolecules*, **2010**, 47, 5 – 9
- [13]. Pierre R., Adam I., Fitremann J., Jérôme F., Bouchu A., Courtois G., Barrault J., Queneau Y., *Comptes Rendus Chimie*, **2004**, 7, 151 – 160
- [14]. van Rantwijk F., Woudenberg-van Oosterom M., Sheldon R. A., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **1999**, 6, 511 – 532
- [15]. Reetz M. T., Jaeger K. E., *Topics in Current Chemistry*, **1999**, 200, 31 – 57
- [16]. Otto R. T., Bornscheuer U. T., Syldatk C., Schmid R. D., *Journal of Biotechnology*, **1998**, 64, 231 – 237
- [17]. Stamatis H., Sereti V., Kollis F. N., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2001**, 11, 323 – 328
- [18]. Otto R. T., Scheib H., Bornscheuer U. T., Pleiss J., Syldatk C., Schmid R. D., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2000**, 8, 201 – 211
- [19]. Gill I., Ballesteros A., *Tibtech*, **2000**, 18, 469 – 479

- [20]. Zarcu C., **Croitoru R.**, Corici L., Csunderlik C., Peter F., *International Journal of Chemical and Biomolecular Engineering*, **2009**, 2 (3), 138 – 144
- [21]. Peter F., Zarcu C., Kakasi-Zsurka S., **Croitoru R.**, Davidescu C., Csunderlik C., *Journal of Biotechnology*, **2008**, 136S, S356 – S401
- [22]. Brem J., Turcu M. C., Paizs C., Lundell K., Toşa M. I., Irimie F. D., Kanerva L. T., *Process Biochemistry*, **2012**, 47 (1), 119 – 126
- [23]. **Croitoru R.**, van den Broek L. A. M., Friessen A. E., Davidescu C. M., Peter F., Boeriu C. G., *World Academy of Science, Engineering and Technology*, **2011**, 76, 484 – 489
- [24]. Bornscheuer U. T., Kazlauskas R. J., *Hydrolases in Organic Synthesis - Regio- and Stereoselective Biotransformations*, **1999**, Wiley - WCH
- [25]. Cao L., Bornscheuer U. T., Schmid R. D., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **1999**, 6, 279 – 285

Lucrări publicate sau comunicate pe problematica tezei de doctorat

1. R. Croitoru, C. Paul, A. L. van den Broek, A. E. Friessen, F. Peter and C. G. Boeriu, “Immobilized sol-gel lipase catalyst for efficient esterification”, Netherlands Biotechnology Congress, Ede Wageningen, The Netherlands, p. 112, March 2010.
2. R. Croitoru, C. Paul, A. L. van den Broek, A. E. Friessen, F. Peter and C. G. Boeriu, “Ionic liquids as template compounds for sol-gel entrapment of lipases”, 2th International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Timisoara, Romania, p. 39, May 2010.
3. C. Zarcu, L. Corici, R. Croitoru, A. Ursoiu and F. Peter, “Preparation and properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during the immobilization of lipase by the sol-gel method”, *Journal of Molecular Catalysis: B Enzymatic*, vol. 65 (1 – 4), pp. 79 – 86, August 2010.
4. R. Croitoru, C. Paul, A. L. van den Broek, A. E. Friessen, F. Peter and C. G. Boeriu, “Screening of free and sol-gel immobilized lipases in transesterification reactions”, 5th International Congress on Biocatalysis, Hamburg, Germany, p. 143, August 2010.
5. R. Croitoru, L. A. M. van den Broek, A. E. Friessen, C. M. Davidescu, F. Peter and C. G. Boeriu, “Lipase catalyzed synthesis of aromatic esters of sugar alcohols”, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, vol. 76, pp. 426 – 431, April 2011.
6. R. Croitoru, L. A. M. van den Broek, A. E. Friessen, C. M. Davidescu, F. Peter and C. G. Boeriu., “Enzymatic synthesis of phenyl esters of polyhydric alcohols”, 12th Edition of Timisoara’s Academic Days, Chemistry, Timisoara, Romania, pp. 115, May 2011.
7. R. Croitoru, F. Fiţigău, L. A. M. van den Broek, A. E. Friessen, F. Peter, C. M. Davidescu and C. G. Boeriu, “Biocatalytic acylation of sugar alcohols by 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid”, *Process Biochemistry*, 2012, in press.