
CREȘTEREA EFICIENȚEI CATALITICE ȘI STABILITĂȚII OPERAȚIONALE ȘI TERMICE A LIPAZELOR PRIN IMOBILIZARE, FOLOSIND METODE BAZATE PE TEHNICA SOL-GEL

- Rezumat -

Chimia verde este un subiect intens discutat în ultimii ani. Această se bazează pe utilizarea unui set de principii care reduc sau elimină folosirea substanțelor periculoase în proiectarea, sinteza și aplicarea unor produse chimice.

Rezoluția amestecurilor racemice prin biocataliză cu hidrolaze este una dintre cele mai folosite strategii pentru obținerea la scară industrială a compușilor optic activi. Majoritatea biotransformărilor sunt efectuate cu preparate comerciale, iar lipazele din *Candida antarctica* și *Pseudomonas fluorescens* sunt cele mai enantioselective față de alcoolii secundari. Aceștia din urmă sunt de mare importanță, fiind compuși de pornire des utilizați în industria farmaceutică. Majoritatea metodelor convenționale de sinteză a medicamentelor sunt relativ costisitoare. Este necesară parcurgerea unui mare număr de etape sintetice în urma cărora rezultă amestecuri greu de purificat. Din acest motiv, biocataliza cu lipaze s-a dovedit a fi un procedeu convenabil. În cazul proceselor biocatalitice numărul etapelor este redus considerabil și nu mai sunt necesare purificări ulterioare.

Utilizarea enzimelor imobilizate în practica biocatalitică oferă o serie de avantaje față de cele solubile. Aceste avantaje includ activitate și selectivitate ridicate, stabilitate îmbunătățită și posibilitatea de reutilizare. Există multe lucrări de specialitate dedicate descrierii metodelor de imobilizare a enzimelor și celulelor. Dintre acestea, entraparea în matrici de tip sol-gel este o tehnică ușor de realizat și cu o reproductibilitate ridicată.

Această teză de doctorat este structurată în patru părți:

- ❖ **1. Studiu de literatură** – în care este prezentat stadiul actual al cercetărilor în domeniul biocatalizei cu lipaze, importanța temei, structura proteinelor, cinetica enzimatică, metode de imobilizare a enzimelor și metode de caracterizare a morfologiei preparatelor enzimatic.
- ❖ **2. Contribuții originale** – în această parte sunt cuprinse rezultatele obținute pe parcursul cercetărilor experimentale efectuate, cuprinzând și obținerea unor noi lipaze imobilizate pentru rezoluția cinetică a alcoolilor secundari.
- ❖ **3. Partea experimentală** – prezintă procedurile experimentale folosite la imobilizarea lipazelor cu ajutorul tehnicilor de tip sol-gel, precum și metodele de analiză utilizate.
- ❖ **4. Concluzii finale** – în această secțiune sunt prezentate concluziile rezultate pe baza studiilor experimentale în conformitate cu obiectivele stabilite în cadrul programului de cercetare științifică.

Principalele obiective urmărite în cadrul acestei teze de doctorat au fost obținerea de catalizatori stabili și eficienți cu aplicabilitate în sinteza compușilor optic activi și imobilizarea unor lipaze microbiene în matrici de sol-gel sau prin entrapare combinată cu adsorbție folosind sisteme terțiare de silani precursori. De asemenea, s-a dorit optimizarea unei noi metode de imobilizare prin entrapare în sol-gel, respectiv prin entrapare combinată

cu adsorbție, în prezență de lichide ionice ca aditivi. În urma imobilizării s-a urmărit creșterea stabilității termice, operaționale și a numărului posibil de reutilizări a biocatalizatorilor obținuți prin entrapare în sol-gel folosind lichide ionice ca aditivi. Lipazele imobilizate prin tehnici sol-gel au fost caracterizate fizico-chimic folosind microscopia electronică de scanare (SEM), metoda BET de determinare a suprafeței specifice și microscopia cu fluorescență.

În prima parte a tezei este prezentat un studiu de literatură cu privire la structura și proprietățile enzimelor, biocataliza cu lipaze, tehnici de imobilizare, în special entraparea în matrici de sol-gel și imobilizarea prin entrapare combinată cu adsorbție, posibilitatea de utilizare a lichidelor ionice ca aditivi, precum și modalități de caracterizare morfologică a preparatelor enzimatic obținute. Acest studiu a reprezentat fundamentul științific pentru obiectivele urmărite în partea de cercetări experimentale.

Studiile realizate în cadrul contribuțiilor originale au avut următoarele obiective:

- Elaborarea unei metode de imobilizare prin entrapare în sol-gel, respectiv prin entrapare combinată cu adsorbție a unor lipaze microbiene.
- Optimizarea parametrilor de imobilizare în scopul obținerii unor preparate enzimatic cu activitate și stabilitate ridicate.
- Influența adsorbentului folosit la dubla imobilizare asupra eficienței catalitice a biocatalizatorilor obținuți.
- Influența lichidelor ionice folosite ca aditivi la imobilizarea prin entrapare în sol-gel, respectiv la dubla imobilizare asupra eficienței catalitice a preparatelor enzimatic.
- Influența mediului de reacție asupra eficienței catalitice a lipazei B din *Candida antarctica* imobilizată prin entrapare în sol-gel.
- Influența mediului de reacție asupra enantioselectivității lipazei B din *Candida antarctica* dublu imobilizată.
- Studiul stabilității operaționale a lipazei imobilizate din *Candida antarctica* la diferite temperaturi.
- Studiul termostabilității lipazelor microbiene imobilizate prin diferite tehnici.
- Stabilitatea în solvenți organici a lipazei B din *Candida antarctica*.
- Caracterizarea morfologică a unor lipaze microbiene imobilizate prin diferite tehnici.

Din studiile experimentale realizate, efectuate în conformitate cu obiectivele stabilite, se pot concluziona următoarele:

1. Imobilizarea prin entrapare în matrici de sol-gel a unor lipaze de origine microbiană:

Cunoașterea valorii optime a încărcării matricii cu proteină este esențială. În urma imobilizării, enantioselectivitatea biocatalizatorilor a fost excelentă comparativ cu lipaza nativă. Având în vedere atât activitatea enzimatică, raportul enantiomeric (E) cât și costul biocatalizatorului, se poate spune că valoarea optimă a încărcării cu enzimă a fost de 17,44. Biocatalizatorii testați în studiile ulterioare au fost obținuți cu o încărcare a matricii cu proteină de 17,44 mg la un gram de xerogel.

Reglarea fină a compoziției sistemului de silani precursori și a structurii lichidului ionic permite dezvoltarea unor biocatalizatori performanți pentru aplicații specifice. În cazul acilării enantioselective a 2-octanolului, protocolul de imobilizare cel mai eficient a implicat

utilizarea unui sistem ternar de silani precursori, format din PhTMOS, MeTMOS și TMOS în raport echimolar și lichidul ionic [Omim]BF₄ ca aditiv.

Folosirea unui silan precursor cu grupări vinil nehidrolizabile a avut un efect pozitiv asupra proprietăților catalitice ale lipazei imobilizate. În cazul folosirii unui sistem binar de silani precursori s-a obținut o valoare mai ridicată a activității catalitice atunci când concentrația de grupări vinil în amestecul de silani a fost mai mare (raport molar 2:1).

Atunci când la imobilizare s-a folosit un sistem ternar de silani precursori s-au obținut valori și mai ridicate ale activității enzimatică. Eficiența catalitică exprimată prin randamentul de regăsire a activității enzimatică a fost mai ridicată la folosirea unui sistem ternar de silani precursori, la un raport molar de 1,6:0,4:1, ceea ce înseamnă că o concentrație mai mică a grupării vinil nehidrolizabile în matricea gelului este benefică.

În cazul testării biocatalizatorilor pe substratul 2-octanol, atât în cazul sistemelor binare cât și al celor ternare, s-a observat că o concentrație mai mare a radicalului vinil din precursorul silanic a avut un efect favorabil. În ceea ce privește eficiența catalitică, se poate observa că s-au obținut valori excelente în cazul tuturor biocatalizatorilor testați, acestea fiind de 3 până la 6 ori mai mari decât în cazul lipazei native. În cazul preparatelor enzimatică obținute cu sistem binar de silani, cele mai bune valori ale enantioselectivității s-au obținut la raportul molar de 2:1 al VTMO:TMOS, pe când în cazul celor obținute cu sistem ternar de precursori, valoarea cea mai mare a raportului enantiomeric (E) a fost dată de preparatul obținut cu silanii precursori PhTMOS:VTMO:TMOS la un raport molar de 0,4:1,6:1.

Pentru lipaza Amano AK din *Pseudomonas fluorescens* s-a optimizat cantitatea de lichid ionic utilizat ca aditiv la imobilizarea prin entrapare în sol-gel. Cele mai ridicate valori ale activității de transesterificare au fost obținute la un raport molar de 0,2 între lichidul ionic și silanii precursori. Enantioselectivitatea biocatalizatorilor obținuți nu a fost influențată semnificativ de cantitatea de lichid ionic, dar a fost ușor îmbunătățită comparativ cu lipaza nativă.

În cazul lipazei B din *Candida antarctica*, mai multe lichide ionice au fost testate ca aditivi de imobilizare la entraparea în matrice sol-gel. Este important de menționat faptul că performanțele lipazei imobilizate nu depind doar de aditiv, ci și de metoda de imobilizare și de substratul testat.

În cazul lichidelor ionice, influența mediului de reacție a fost mult mai importantă. Conversia a fost foarte redusă în [Emim]COOCF₃, singurul lichid ionic testat care este miscibil cu apa. Ținând cont atât de activitate cât și de enantioselectivitate, lichidele ionice cu anioni de tip BF₄⁻ s-au dovedit a fi un mediu de reacție mai eficient decât [Bmim]PF₆. Din grupul lichidelor ionice cu acest tip de anion (BF₄⁻), cele mai bune rezultate au fost obținute atunci când în partea cationică este prezentă o grupare alchil mai hidrofobă (octil). În cazul reacției investigate, acilarea enantioselectivă a 2-octanolului, lichidul ionic optim a fost [Omim]BF₄, care a dus la obținerea unor rezultate comparabile cu cele în solvenți organici tradiționali.

2. Imobilizarea prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție a unor lipaze microbiene:

Performanțele catalitice ale lipazelor imobilizate prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție depind foarte mult de încărcarea cu enzimă, de raportul molar al silanilor precursori, precum și de tipul și cantitatea adsorbentului.

S-au obținut valori ridicate la încărcări de 9,48, 10,72 și 11,68 mg proteină/g biocatalizator. Trebuie menționat că indiferent de valoarea încărcării cu enzimă, valorile raportului enantiomeric au fost superioare comparativ cu lipaza nativă. Ținând cont atât de

activitatea enzimatică, raportul enantiomeric (E) cât și de costul biocatalizatorului, se poate spune că valoarea optimă a încărcării cu enzimă necesară la imobilizarea prin metoda sol-gel combinată cu adsorbție este de 10,72 mg proteină/g biocatalizator. Biocatalizatorii care vor fi utilizați în studiile următoare vor fi cei obținuți la o încărcare a matricii cu proteină de 10,72. Randamentul de imobilizare a fost independent de încărcarea cu lipază.

Indiferent de substratul testat, raportul optim dintre cantitatea de suport și numărul de moli de silani precursori la care s-au înregistrat cele mai bune valori ale conversiei a fost de 83,3. Atunci când reacțiile au fost efectuate într-un mediu de reacție polar (acetona), s-a obținut o ușoară scădere a conversiei. În această situație, a fost avantajată reacția de acilare enantioselectivă a 2-hexanolului.

După imobilizare activitatea totală a fost mai mare la lipaza din *Burkholderia cepacia*, de până la 8 ori mai mare decât a celorlalte lipaze imobilizate. Lipaza din *Candida antarctica* a prezentat valori ridicate ale randamentului de regăsire a activității, iar cea din *Pseudomonas fluorescens* a dat valorile cele mai mici ale randamentului de regăsire. Folosind un raport molar al precursorilor silanici de 1,6:0,4:1 s-au obținut cele mai bune valori ale activității totale. Atunci când s-a folosit [Emim]BF₄ ca aditiv de imobilizare, pentru toate preparatele enzimatic obținute, valorile randamentului de regăsire au fost aproape duble comparativ cu imobilizarea în prezența lui OmimBF₄ ca agent de modelare a structurii gelului. Folosind un raport molar al precursorilor silanici de 1:1:1 s-au obținut cele mai bune valori ale enantioselectivității pentru toate preparatele enzimatic obținute.

Valorile randamentului de regăsire – parametru care caracterizează eficiența catalitică a preparatelor obținute, au fost excelente (între 250 și 560%) pentru toți biocatalizatorii testați, indiferent de protocolul de imobilizare folosit. Indiferent de adsorbentul folosit, se observă o creștere a randamentului de regăsire de la 2-pentanol la 2-heptanol, apoi doar o ușoară creștere sau chiar o scădere pentru 2-octanol și apoi o creștere pronunțată în cazul 2-nonanolului.

Lichidele cu același anion, tetrafluoroborat, au dus la activități ridicate ale preparatelor imobilizate odată cu scăderea lanțului alchil din partea cationică. În ceea ce privește lichidele ionice cu același cation, [Emim], prezența în partea anionică a unor substituenți mai voluminoși (trifluoroacetat, acetat), a dus la scăderea randamentului de regăsire a activității și a enantioselectivității preparatelor enzimatic obținute.

Privind comparativ cele două metode de imobilizare studiate, se poate observa că valorile raportului enantiomeric au fost similare, cu două excepții. În cazul în care s-a folosit metoda 3, valoarea cea mai ridicată a lui E pentru acilarea 2-hexanolului s-a obținut pentru lichidul ionic [Bmim]PF₆. Atunci când biocatalizatorii au fost sintetizați conform metodei 4, cea mai ridicată valoare a lui E s-a înregistrat pentru acilarea 2-octanolului cu lipaza CaLB dublu imobilizată în prezența aditivului [Hmim]BF₄.

Activitatea enzimatică este condiționată de alegerea unui mediu de reacție adecvat, deoarece unii solvenți organici inactivează enzima. Cele mai ridicate valori ale activității de transesterificare s-au obținut atunci când acetona sau dioxanul au fost utilizați ca mediu de reacție, iar cele mai mici valori s-au obținut în cazul THF.

Cele mai ridicate valori ale randamentului și activității de transesterificare s-au obținut atunci când toluenul a fost utilizat ca mediu de reacție, iar cele mai mici valori s-au obținut în cazul acetonei. Enantioselectivitatea preparatului enzimatic utilizat la rezoluția cinetică a 2-pentanolului este puternic influențată de natura mediului de reacție. Diclorometanul și 1,4-dioxanul, solvenți cu polaritate intermediară, s-au dovedit a fi foarte eficienți, ducând la obținerea unor valori ale raportului enantiomeric mai mari de 100, ceea ce poate fi considerată o rezoluție cinetică excelentă. Valori mai mici ale enantioselectivității s-au obținut în cazul solvenților nepolari, cum ar fi hexan sau ciclohexan.

În cazul acilării enantioselective a 2-octanolului, natura mediului de reacție nu a avut o influență semnificativă asupra eficienței catalitice a biocatalizatorului folosit.

3. Creșterea stabilității lipazelor prin imobilizare în sol-gel:

Creșterea numărului posibil de reutilizări a enzimei este un alt obiectiv important, urmărit prin orice metodă de imobilizare. Tehnicile de imobilizare studiate și-au demonstrat eficiența și sub acest aspect. Astfel s-a obținut o creștere însemnată a stabilității enzimei, preparatele imobilizate prezentând o activitate relativă ridicată care s-a menținut la peste 90% pe tot parcursul celor 34 de cicluri de reutilizare, în timp ce pentru enzima nativă această valoare a fost de numai 11% după 8 reutilizări. Enantioselectivitatea preparatelor imobilizate a fost ridicată pe durata studiului de reutilizare, iar excesul enantiomeric s-a menținut la valoarea inițială de 95%.

Un rezultat foarte important al acestui studiu este că în timp ce eficiența catalitică a lipazei native reutilizate a scăzut considerabil mai repede la creșterea temperaturii de reacție de la 40°C la 60°C, în cazul lipazei imobilizate prin metoda sol-gel ea a rămas aproape nemodificată. Prin urmare, stabilitatea operațională excelentă a lipazei se menține și la temperaturi mai ridicate, ceea ce este un argument important pentru utilizarea industrială a acestor biocatalizatori.

Creșterea stabilității operaționale la temperaturi mai ridicate reprezintă una dintre principalele avantaje ale imobilizării. Astfel, în cadrul studiului de termostabilitate a lipazelor imobilizate prin metodele prezentate anterior, s-a observat că valorile activității și enantioselectivității au fost menținute constante pe tot intervalul de temperatură studiat.

Chiar și în condiții mai dure (incubare la 80° C timp de 5 zile), biocatalizatorii obținuți cu lipază B din *Candida antarctica* au prezentat valori ale activității practic neschimbate, pe când enzima nativă a pierdut 50% din activitate după 5 zile. Nu s-au înregistrat diferențe semnificative între tehnicile de imobilizare studiate. De asemenea, enantioselectivitatea lipazei nu a fost afectată, rămânând constantă (exces enantiomeric de 94-95%).

Tipul solventului folosit pentru un anumit tip de reacție este esențial, deoarece acesta afectează atât stabilitatea cât și specificitatea biocatalizatorilor.

Activitatea de transesterificare nu a fost influențată semnificativ de natura solventului în care au fost incubăți biocatalizatorii, cu excepția cazului în care lipaza nativă CaLB a fost incubată în 1,4-dioxan, situație în care s-a înregistrat o activare pronunțată. Preparatele enzimatice obținute prin entrapare în sol-gel, respectiv prin entrapare în sol-gel combinată cu adsorbție au prezentat activități catalitice ridicate.

Dintre metodele de imobilizare studiate, cele mai bune rezultate s-au înregistrat în cazul entrapării în sol-gel, indiferent de solventul în care au fost incubăți biocatalizatorii. Valorile cele mai ridicate ale enantioselectivității s-au obținut în cazul incubării lipazei imobilizate prin entrapare în sol-gel solvenți polari sau cu polaritate medie (acetona, *terț*-butanol, metil-*terț*-butil eter și toluen).

4. Caracterizarea morfologică a unor lipaze microbiene imobilizate prin diferite tehnici:

Caracterizarea morfologică a lipazelor imobilizate prin diferite tehnici este foarte importantă deoarece poate oferi informații privind structura biocatalizatorilor care se pot corela cu proprietățile catalitice.

În urma analizei prin microscopie electronică de scanare (SEM) s-a observat o structură poroasă tipică materialelor nanocompozite de tip silice. Formarea rețelei

tridimensionale este rezultatul înrețelării particulelor de sol formate inițial. Aceasta structură cu pori ordonați este corelată cu o valoare ridicată a activității catalitice, ceea ce înseamnă că substratul poate ajunge cu ușurință în centrul activ al lipazei, fără a exista împiedicare din partea matricii sol-gel. În cazul preparatului obținut la entraparea în matrici de TMOS a lipazei din *Pseudomonas fluorescens* s-a obținut o structură diferită, formată din blocuri compacte, aceasta explicând parțial valoarea scăzută a activității catalitice.

Analiza prin microscopie de fluorescență a demonstrat o distribuție uniformă a lipazei în interiorul matricii sol-gel indiferent de aditivul folosit sau de tehnica de imobilizare.

În urma analizei BET s-a obținut în cazul tuturor preparatelor enzimice testate un diametru al porilor cuprins între 2-50 nm, care conform IUPAC corespunde substanțelor mezoporoase. Valorile suprafeței specifice BET sunt foarte variate, acoperind un domeniu larg.

Tehnicile pentru imobilizarea enzimelor sunt extrem de diverse și nu există o metodologie general aplicabilă, din cauza diversității structurale și funcționale a enzimelor și cerințelor specifice ale procesului catalizat. Optimizarea metodei de imobilizare trebuie realizată pentru fiecare aplicație în parte, chiar dacă este vorba de aceeași enzimă, dar provenită din surse diferite. De aceea, elaborarea unor metode de imobilizare eficiente, simple și reproductibile, care să producă o enzimă imobilizată cu stabilitate mărită, reprezintă un obiectiv științific de mare importanță. Principalele contribuții originale sunt următoarele:

- Elaborarea unei metode de imobilizare a lipazelor, bazate pe tehnica sol-gel combinată cu adsorbție, care se găsește în fază de brevetare, incluzând ca elemente originale condițiile de imobilizare specifice și folosirea lichidelor ionice ca aditivi;
- Stabilirea valorilor optime ale unor parametri care influențează procesul de imobilizare și care asigură activitate și stabilitate ridicată pentru preparatele obținute: încărcarea cu enzimă (17 mg proteină/g suport), compoziția sistemului ternar de silani precursori (PhTMOS:MeTMOS:TMOS în raport molar 1:1:1), natura lichidului ionic utilizat ca aditiv (de preferință [Omim] BF₄), raportul dintre silani și suport în cazul metodei combinate (1 mol la 83 de grame);
- Demonstrarea menținerii activității lipazelor, imobilizate prin ambele metode, într-o serie de solvenți organici de polaritate diferită;
- Demonstrarea creșterii deosebite a stabilității operaționale a lipazelor în urma imobilizării în sol-gel folosind metodele elaborate de doctorandă, concretizată prin menținerea activității și enantioselectivității în zeci de cicluri de reutilizare, atât la 40°C cât și la 60°C;
- Demonstrarea creșterii stabilității termice a lipazelor în urma imobilizării în sol-gel folosind metodele elaborate de doctorandă, concretizată prin menținerea activității și enantioselectivității după incubare timp de 7 zile la 80°C în mediu de solvent organic.