

Program PARTENERIATE

Subprogram ”Proiecte Colaborative de Cercetare Aplicativă”

PN-II-PT-PCCA-2013-4-1006

CONTRACT NR. 65/2014

Raport tehnic și științific

Sistem tehnologic ecologic integrat pentru obținerea biocombustibililor avansați (AdvBioFuels)

CUPRINS

Program PARTENERIATE	1
1. Obiectivele etapei.....	3
2. Cadrul tehnic.....	3
Activitate I.1	4
Materie prima: Melasa	5
Acidul piruvic	5
Etapele glicolizei.....	7
Etapa 1. Activarea glucozei prin conversia in glucozo-6-fosfat	7
Etapa 2. Conversia glucozo-6-fosfat in fructozo-6-fosfat.....	8
Etapa 3. Fosforilarea fructozo-6-fosfatului.....	8
Etapa 4. Scindarea fructozo-1,6-difosfatului	8
Etapa 5. Conversia dihidroxi acetona-fosfat in gliceraldehida-3-fosfat	9
Etapa 6. Oxidarea fosforilantă a gliceraldehid-3-fosfatului	9
Etapa 7. Conversia 1,3-difosfo-gliceratului in 3-fosfoglicerat.....	9
Etapa 8. Mutarea gruparii de fosfat de la atomul de carbon 3 la atomul de carbon 2	9
Etapa 9. Conversia in fosfoenolpiruvat.....	9
Etapa 10. Obținerea acidului piruvic.	10
Condensarea acidului piruvic cu HMF	10
Activitate I.2	16
Materie prima: Glicerina.....	16
Condensarea glicerinei cu gruparea aldehydica din 5-hidroximetil-furfural.....	18
Bibliografie	19

1. Obiectivele etapei. Rezumatul etapei.

Etapa I : „Dezvoltarea modelelor experimentale de obținere a unui sistem eficient, cu suspensii celulare de drojdie pentru etapa biochimică, a metodei de obținere a HMF. „
Etapa I este structurată pe două activități:

„**Activitate I.1** Dezvoltarea de modele experimentale pentru sinteza acidului piruvic din melasă și condensarea aldolică a acidului cu HMF în suspensie celulară de drojdie alimentară.”

Această activitate prevede un raport de model experimental pentru obținerea acidului piruvic (piruvatului) și condensarea aldolică a 5-hidroximetil-furfural.

„**Activitate I.2** Dezvoltarea de modele experimentale de condensare (acetalizare) a 1-(5-(hidroxil-metil)-furan-2-il) propan-1,2-diolului cu aldehide și a glicerinei cu HMF.”

În a doua activitate, rezultatul va cuprinde un raport de model experimental pentru obținerea furfurilidenglicerolului, care este produsul de condensare a HMF cu glicerol.

2. Cadrul tehnic

Una din cele mai actuale probleme economice este diminuarea resurselor de energie în sectorul de transport. Scăderea depozitelor de petrol și prin urmare creșterea prețului acestuia pe piața mondială influențează în mare parte economia globală. De aceea Uniunea Europeană a pus accentul pe dezvoltarea tehnologiilor care folosesc ca materie primă surse regenerabile, ajutând la independența energetică a țărilor membre. Față de petrocombustibili, biocombustibili din sursele regenerabile, prezintă încă un avantaj suplimentar, că folosind ca materie primă vegetală, dioxidul de carbon eliberat în atmosferă se reutilizează de plante pentru sinteza carbohidraților, astfel reducându-se emisiile gazelor cu efect de seră. În Europa accentul cade pe producția de biodiesel, ce se obține prin transesterificarea uleiurilor vegetale, pe când în America de Nord și Sud accentul cade pe bioetanol, ce se obține prin fermentația zaharozei din sfecla de zahăr, trestia de zahăr și a amidonului obținut din porumb. Bioetanolul, are o putere calorică mai scăzută, în raport cu biodieselul .

În același timp, obținerea biodieselului prin transesterificare din uleiurile vegetale are mai multe dezavantaje. Plantele tehnice necesită terenuri pentru cultivare, care pot crea obiectul unei competiții cu terenurile destinate culturilor pentru alimentație. În Uniunea Europeană producția

de biodiesel utilizează astăzi aproximativ 3.2 milioane de hectare de teren arabil¹, fiind un factor pozitiv pentru sectorul de agricultură. Producția de biodiesel de generația I în UE atinge 8.5 Mt în 2010 și reprezintă 55% din producția mondială, alți mari producători de biodiesel sunt Brazilia și Argentina. Prin introducerea biodieselului s-a economisit în total de 22.6 Mtone echivalente de CO₂, care reprezintă o creștere economică de 53% față de situația în care s-ar fi folosit combustibil fosil. Prin tehnologia de transesterificare, pe lângă biodiesel se mai obține și glicerină, aproximativ 10% raportat la produsul. Cantitatea uriașă de glicerină nu numai că acopera cantitatea necesară dar este și în exces. De aceea se caută valorificarea glicerinei în diferite produse cu valoare adăugată.

În proiectul AdvBioFuels materia primă este melasa obținută din procedurile de obținere a zahărului și a glicerinei. În prima fază se obține HMF dintr-o melasă prin-un sistem catalitic heterogen. După care se obține acid piruvic (piruvat) prin fermentarea melasei folosind o suspensie de drojdie alimentară, și condensarea acestuia cu gruparea aldehidică 5-hidroximetil-furfural. Prin această metodă se obține un produs dihidroxilat cu nouă atomi de carbon, care mai departe pot fi convertiți într-un produs de acetalizare, pentru eliminarea grupărilor hidroxi. În continuare compuși cu structură furanică, care vor fi mai departe extinși prin transesterificare cu diverși donatori de acil folosind hidrolaze ca biocatalizatori. O altă abordare a problemei este cea prin condensarea glicerinei cu 5-hidroximetil-furfural.

Activitate I.1

„Dezvoltarea de modele experimentale pentru sinteza acidului piruvic din melasă și condensarea aldolică a acidului cu HMF în suspensie celulară de drojdie alimentară.”

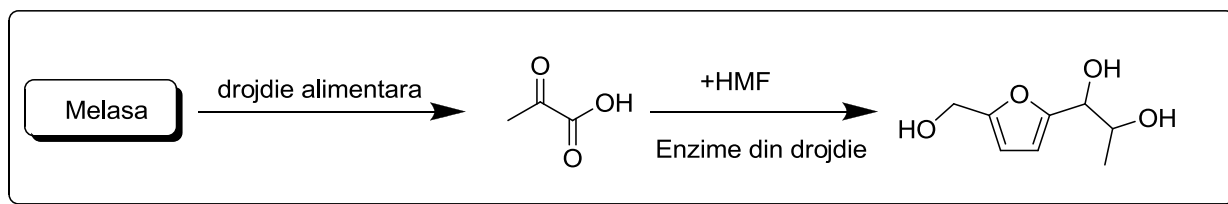


Fig. 1 Obiectivul activității I.1

¹ 2013 Renewable Energy Progress Report [COM(2013) 175]

Materie primă: Melasa

Melasa este un produs secundar din producția de zahăr. Este o materie primă importantă în industria distilării și industria fermentării, dar și ca hrană pentru animale. Este folosită ca nutritiv în tehnologia de obținere a drojdiei alimentare². În medie melasa conține 80 – 85 % solide, este un lichid cu vâscozitate mare. În medie conține 48 – 60 % zahăruri, 10 % produse cu conținut de azot (aminoacizi), 20 % apă și restul este cenușă și alte substanțe organice.

Avantajele majore ale folosirii melasei ca materie primă în tehnologia de obținere a acidului piruvic catalizat cu drojdie alimentară³:

- ✓ Zaharurile din melasă sunt mai ieftine decât alte zaharuri obținute din alte materiale
- ✓ Nu există o limitare legală a prețului melasei
- ✓ Melasa conține substanțe nutritive importante, cum ar fi vitamine, macro- și microelemente
- ✓ Zaharurile din melasă pot fi folosite de mai multe microorganisme,
- ✓ Procesul de fermentație nu necesită instalație tehnologică complexă

Dezavantajele folosirii melasei ca materie primă în tehnologia propusă în proiect⁴:

- ✓ Nu poate fi stocată o perioadă lungă de timp, din cauza instabilității chimice și mecanice (cristale de zahăr precipită). Stocarea adecvată oferă o stabilitate microbiologică mai mare.
- ✓ O compoziție foarte variabilă, în funcție din ce materie primă și tehnologia care a fost utilizată.

Acidul piruvic

Acidul piruvic este cel mai simplu alfa ceto acid. Numele derivă din faptul ca se poate obține prin piroliza acidului tartric, care era inițial procesul industrial⁵ folosit. Este un compus esențial în biologie și biochimie. În literatură s-au raportat diferite metode de obținere a acidului piruvic, majoritatea lor prin biocataliză. Sunt preferate diferite tipuri de biocatalizatori: prin

² Calculation of the Specific Technological Parameters for the Technological Process to Produce Baking Yeast in Shorter Multiplication Cycle, Mihaela Begea, Mariana Vlădescu, Cristina Stoicescu, Daniela Simion, Paul Begea, *Journal of Agroalimentary Processes and Technology*, s 2010, 16 (2), 196-199

³ Tehnologia zahărului, Culache, D., Platon, V., 1984, Ed. Tehnică, București

⁴ idem

⁵ Howard, J.W. and Fraser, W. A.: Preparation of pyruvic acid. *Org. Synth. Coll.*, 1, 475–480 (1932).

fermentație directă cu celule intacte, enzime imobilizate, sau celule vii care sunt dezactivate metabolic păstrând numai activitatea enzimatică dorită. S-a raportat biosinteze cu rezultate bune și acceptabile catalizate de *Saccharomyces cerevisiae* TAM, 135 g/L⁶ cu un randament de 54 %, *Torulopsis glabrata* RS23⁷, 94 g cu o conversie de 65 %, *Yarrowia lipolytica* 374/4⁸, cu 61.3 g/L cu randament de 71 % , *E. coli* YYC202 *ldhA::Kan*⁹, 110 g/L cu un randament de 87 %. Procesul biochimic de sinteză a acidului piruvic este glicoliza. Acidul piruvic este un intermediar cheie de metabolism fiind o placă turnantă pentru obținerea de energie dar și de metaboliți.

Glicoliza este procesul de bază pentru obținerea energiei celulelor eucariote, este arhetipul universal cunoscut proceselor metabolice și poate fi găsit în aproape toate celulele organismelor vii. S-a format cu miliarde de ani în urmă, când cantitatea de oxigen liber în atmosferă era încă redusă. Glicoliza poate să se desfășoare anaerob și aerob, dar doar cea anaerobă oferă avantajul folosirii catalizatorului în tot volumul reactorului. Glicoliza decurge în citosol, celulele folosesc glicoliza pentru a obține energie rapid, anaerobic, dintr-o moleculă de glucoză se obține 2 moli de piruvat, 2 ATP și 2NADH. Pentru a obține piruvatul și energia necesară celulelor, se folosește un șir de enzime pentru transformarea biochimică, de ordinul kinazelor și izomerazelor. Are trei etape principale:

- i. glucoza este fosforilată și convertită în 1,6-bisfosfat-fructoza. Pentru cele două reacții trebuie folosită energie sub formă de ATP. (Consumul de energie)
- ii. 1,6-bisfosfat-fructoza se descompune în două triozo-fosfat, care sunt capabile să se transforme unul în celălalt prin izomerizare.
- iii. Glicerinaldehida-3 fosfat se oxidează la piruvat, formând 4 ATP și 2NADH (recuperare de energie).

⁶ van Maris, A. J., Geertman, J. M., Vermeulen, A., Groothuizen, M. K., Winkler, A. A., Piper, M. D., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T.: Directed evolution of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*, yielding a C2-independent, glucose-tolerant, and pyruvate-hyperproducing yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 159–166 (2004).

⁷ Liu, L. M., Xu, Q. L., Li, Y., Shi, Z. P., Zhu, Y., Du, G. C., and Chen, J.: Enhancement of pyruvate production by osmotic-tolerant mutant of *Torulopsis glabrata*. *Biotechnol. Bioeng.*, 97, 825–832 (2007).

⁸ Morgunov, I.G., Kamzolova, S. V., Perevoznikova, O. A., Shishkanova, N. V., and Finogenova, T. V.: Pyruvic acid production by a thiamine auxotroph of *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem.*, 39, 1469–1474 (2004).

⁹ Zelić, B., Gostovic, S., Vuorilehto, K., Vasić-Racki, D., and Takors, R.: Process strategies to enhance pyruvate production with recombinant *Escherichia coli*: from repetitive fedbatch to in situ product recovery with fully integrated electrodialysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 85, 638–646 (2004).

Etapele glicolizei

Etapa 1. Activarea glucozei prin conversia în glucozo-6-fosfat

Primul pas în descompunerea glucozei este activarea care se realizează prin atașamentul unei grupări fosfat la moleculă. Această etapă are mai multe obiective, printre care cea mai importantă este faptul că gruparea polară este un „maner” excelent pentru ca enzimele să pot lega puternic substratul în situsuri active. Până la ultimele trepte ale glicolizei gruparea fosfata se menține legată de moleculă. Primul pas este catalizat de enzima hexochinaza. (Fig. 2)

Procesul de activare necesită energie, pentru care se sacrifică o moleculă de ATP (gruparea de fosfat din ATP este transferată la substrat). La sfârșitul etapei 1 se obține glucozo-6-fosfat.

Etapa 2. Conversia glucozo-6-fosfat în fructozo-6-fosfat.

Pentru că celălalt capăt al moleculei poate fi activat, aldoza este transformată în ketoză folosind o enzimă de izomerază, numită fosfohexoz izomeraza. Glucozo-6-fosfat este transformată în fructozo-6-fosfat (Fig. 2)

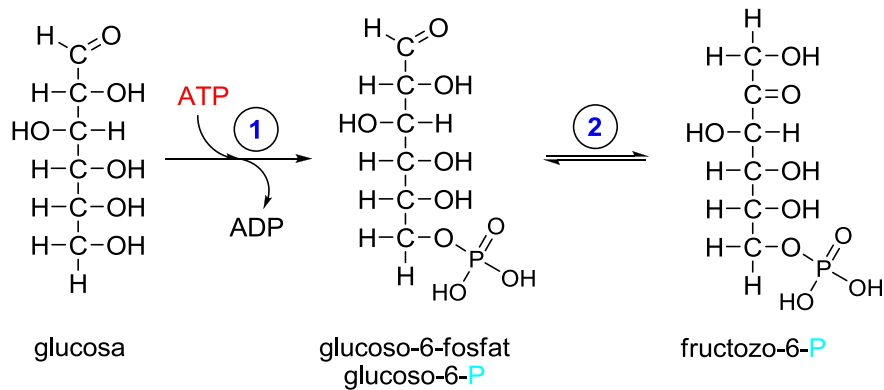


Fig.2. Activarea glucozei(1) și izomerizarea aldozei în cetoză(2)

Etapa 3. Fosforilarea fructozo-6-fosfatului

Celălalt capăt al moleculei este activat, cu scopul ca enzimele să fie capabile să lucreze cu cele două părți ale fructozo-1-6-fosfatului după scindare. În această fază se folosește încă o moleculă de ATP ca donor al grupului fosfat. Enzima de catalizare în etapa 3 este fosfofructokinaza, din ordinul kinazelor, care sunt responsabile pentru fosforilarea substratelor.

(Fig. 3). Produsul intermediar este fructozo-1,6-difosfat care este activat pe cele două capete ale moleculei.

Etapa 4. Scindarea fructozo-1,6-difosfatului

Hexoza se rupe în două molecule, aldotrioza și izomerul lui cetotrioza. Sensul divizării este dat de faptul că aceeași enzimă se pot realiza de două ori mai multi pași de obținere a energiei din glucoză. Totodată triozele sunt materiale mai versatile pentru anabolism, dar nu toate moleculele trec în întregul proces de glicoliză. Dacă este necesar o parte din glicerina aldehydă poate participa la alte sinteze ale celulei. Enzima care catalizează scindarea fructozei activate este o aldolază. (Fig.3)

Etapa 5. Conversia dihidroxi acetona-fosfat în glicerinaldehida-3-fosfat

Fosfatul dihidroxiacetona (cetotrioza) este convertit de o enzimă izomerază în glicerinaldehida-3-fosfat (aldotrioza), care este materia primă pentru următorul pas. De la Etapa 5 toate reacțiile au loc de două ori (cele două părți). Enzima responsabilă de izomerizare este trifosfat izomeraza. (Fig.3)

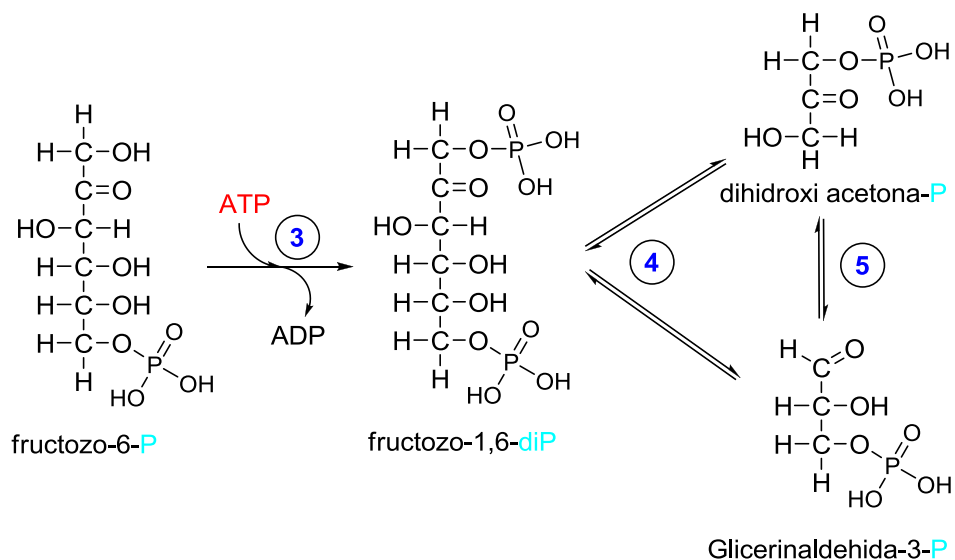


Fig. 3. Fosfatarea fructozo-6-fosfat (3), scindarea fructozei activate(4) și izomerizarea cetotriozei în aldotrioza(5)

Etapa 6. Oxidarea fosforilantă a glicerinaldehid-3-fosfatului

Este prima etapă în care începe producerea de energie. În această etapă carbonul nr.1 este oxidat, în timp ce un fosfat liber (anorganic) (Pi = "fosfat anorganic") este atașat. Aldehida

este convertită în acid carboxilic (mai precis, un ester de fosfat al acidului carboxilic). Numărul de oxidare al acestui atom de carbon a crescut de la +1 la +3. Agentul de oxidare în acest caz, coenzima NAD^+ , este redus, prin legarea de atomii de hidrogen. Catalizatorul enzimatic este gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza. (Fig. 3)

Etapa 7. Conversia 1,3-difosfo-gliceratului în 3-fosfoglicerat

Energia din etapa de oxidare(6) anterioară, este stocată sub formă de ATP prin legarea unui fosfat pe un ADP. Oxigenul din legatura esterică va rămâne pe carbon, hidrogenul este transferat de la grupului de fosfat pe terminale din ADP. În total sunt generat două ATP, ceea ce face sa fie recuperat, costul inițial de energie pentru activare. Enzima de cataliză este fosfoglicerat-kinaza, care rupe gruparea de fosfat din moleculă. (Fig. 4)

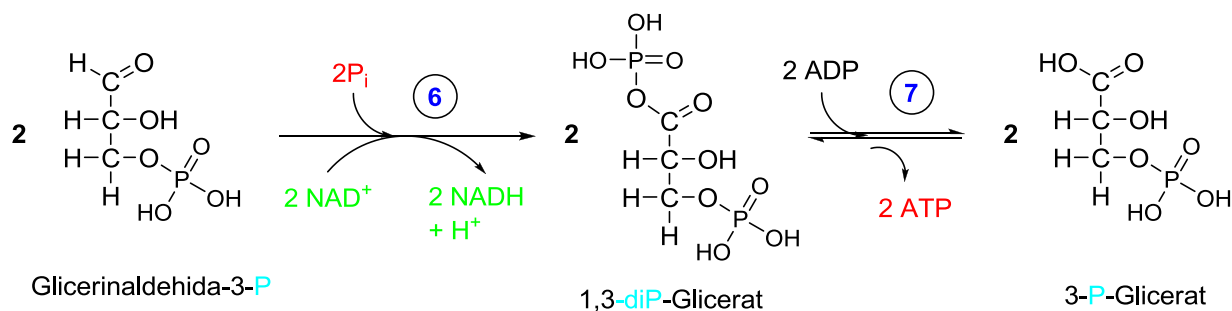


Fig. 4. Oxidarea fosforilantă (6), și conversia esterului de fosfat în acid carboxilic (7)

Etapa 8. Mutarea grupării de fosfat de la atomul de carbon 3 la atomul de carbon 2

Procesul de mutarea a grupării de fosfat de la atomul de carbon 3 la atomul de carbon 2 este catalizată de fosfoglicerat – mutaz.

Etapa 9. Conversia în fosfoenolpiruvat

Se elimină o moleculă de apă formând o legătură dublă. Se formează un fosfoenolat. Cantitatea de apă formată este egală cu cantitatea care este necesară pentru hidrolizarea în etapa 7 a moleculei de ATP, așa se recuperează oxigenul lăsat de grupul de fosfat pe moleculă. Enzima catalizantă este o enolază. (Fig. 5)

Etapa 10. Obținerea acidului piruvic.

Din rearajamentele de legături, sa eliberat încă o cantitate de energie care se poate stoca ca ATP. Asemenator cu etapa 7, grupările de fosfat folosite la activarea moleculelor, sunt stocate pe ADP, obținând ca rezultat ATP. Hidrogenul pe atomul de carbon nr. 3 este derivat din hidrogenul terminal de la lanțul ATP – ului. Enzima catalizatoare este piruvat kinaza. (Fig. 5)

Acidul piruvic poate fi considerat produsul final al glicolizei.

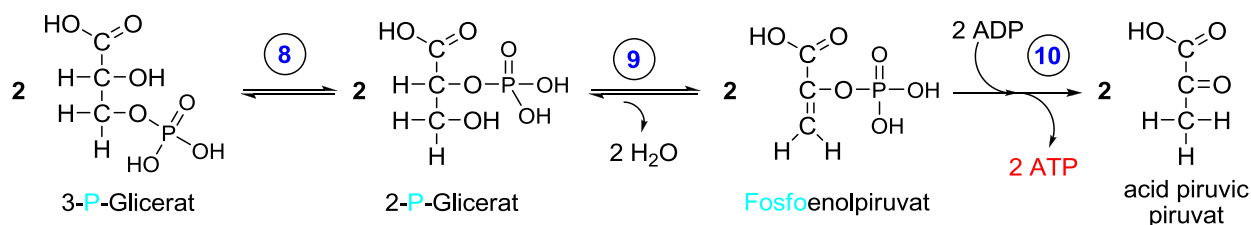


Fig. 5. Etapele de obținere a acidului piruvic din 3-fosfoglicerat

Condensarea acidului piruvic cu HMF

Etapa de condensare a piruvatului cu HMF este interesantă prin analogia pe care o prezintă cu reacțiile din lumea vie. De aceea atenția noastră s-a îndreptat spre biocatalizatori.

Utilizarea biocatalizei a început să se impună în ultimele decade prin avantajele pe care le are față de chemocataliză: (stereo-, regio și chemoselectivitate, compatibilitate deplină cu mediul, condiții blânde de reacție). În plus, armonizarea toleranței față de substrat cu înalta stereoselectivitate, fac din biocatalizatori un instrument util, în unele cazuri de neînlocuit, în laboratorul de sinteză organică a compușilor chirali de înaltă enantiopuritate. Tehnicile actuale permit modularea activității și selectivității biocatalizatorilor prin modificarea parametrilor mediului în care are loc transformarea, sau prin tehnicile de biologie moleculară, modificarea structurii enzimelor, astfel încât performanța de transformare a substraturilor non naturale să se apropie de cea a substraturilor naturale.

Drojdia de bucătărie (*Saccharomyces Cerevisiae*), în forma ei sălbatică a început să fie folosită în sinteza organică la începutul anilor 1900. După anul 1970 publicațiile privind folosirea acestui microorganism în laboratorul de sinteză organică au început să crească exponențial.

Rațiunea interesului constă în faptul că celula întreagă, activă sau în repaus, reprezintă în întregul ei atât un catalizator (stereo)selectiv cât și un reactant (o sursă de hidrură, de piruvat etc). Mai mult, în cazul reacțiilor de reducere selectivă, față de utilizarea oxidoreductazelor purificate, reciclarea cofactorilor redox este rezolvată de la sine. Totodată, eliminarea procedurilor de purificare, laborioase, costisitoare constituie un avantaj de luat în calcul. Spre deosebire de *Escherichia coli*, drojdia are un perete mai rigid, ceea ce o face mai tolerantă în raport cu solvenții organici, comuni în laboratorul de sinteză organică¹⁰.

Până în prezent drojdia de bucătărie a fost utilizată cu succes în reducerea enantiotopselectivă a cetonelor, reacția fiind binecunoscută, stereoselecția fiind statistic prezisă prin regula lui Prelog.

Secundar, cu mai puțin succes, drojdia de bucătărie a fost utilizată pentru reducerea legăturilor C=C.

Biocataliza enzimatică, realizată cu preparate enzimatică cu diferite grade de purificare, obținute din celule este o variantă a biocatalizei care față de utilizarea celulelor întregi are avantajul evitării reacțiilor paralele sau succesive obținerii produsului, ale unor viteze superioare de reacție nelimitate de rezistențele de transport, inevitabile la celulele intacte.

O direcție extrem de atractivă pentru sinteza organică este formarea legăturilor C-C. Enzime care pot realiza această transformare fac parte din clasa ligazelor, liazelor și hidrolazelor¹¹

Condensarea aldolică

Utilizarea drojdiei în sinteza aldolică în care s-ar putea utiliza aldolaza este menționată sporadic în literatură. Mecanismul condensării aldolice catalizat de aldolaza întâlnită în secvența glicolitică este prezentată în schema 1.

¹⁰ T. Matsumoto, S. Takahashi, M. Kaieda, M. Ueda, A. Tanaka, H. Fukuda, A. Kondo, (2001) Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57 515–520.

¹¹ a) Clapes, P., Fessner, W. D., Sprenger, G. A., and Samland, A. K. (2010) Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases, *Curr Opin Chem Biol* 14: 154-167.

b) Brovotto, M., Gamenara, D., Mendez, P. S., and Seoane, G. A. (2011) C-C bond-forming lyases in organic synthesis, *Chem Rev* 111: 4346-4403.

c) Clapés, P., and Garrabou, X. (2011) Current Trends in Asymmetric Synthesis with Aldolases, *Advanced Synthesis & Catalysis* 353: 2263-2283.

d) Dean, S. M., Greenberg, W. A., and Wong, C.-H. (2007) Recent Advances in Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis, *Advanced Synthesis & Catalysis* 349: 1308-1320.

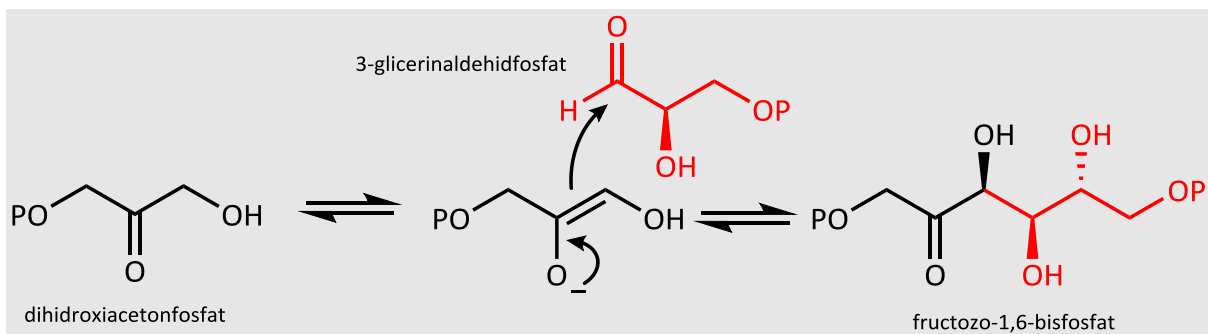


Fig. 2 mecanismul condensării dihidroxiacetofosfatului (DHAP) cu aldehida foafglicerică în glicoliză

Aldolazele din metabolismul glucidic utilizează pentru formarea enolatului fie un ion Zn^{2+} fie un rest ϵ -amino dintr-o lizină. Aceasta face ca enzima să fie mai selectivă la formarea enolatului dar mai tolerantă față de electrofil.

De aceea, fructozo-1,6 bisfosfat aldolazele comerciale (din mușchiul de iepure RAMA – **Rabbit Muscle Aldolase** - , sau din drojdie), care se folosesc în sinteza organice și care au fost exprimate în celule gazdă potrivite, nu accepta drept substrat donor decât fosfodihidroxi acetona (DHAP), dar acceptorul poate fi ales dintr-o paletă largă de aldehide, eventual posedând un heteroatom în α , sau monoglucide. Nu sunt buni acceptori aldehidele aromatice, cele împiedicate steric sau aldehidele α,β nesaturate. Se obțin dioli vicinali în configurație (*D*) treo. Gruparea fosfat se îndepărtează cu fosfataze. Limitarea substratului donor la DHAP și obligativitatea utilizării fosfatazei pentru îndepărtarea fosfatului constituie dejavantaje de luat în seamă la utilizare.

Condensarea aciloinică enzimatică este o metodă cu mare potențial de utilizare în sinteza organică a formării legăturii C-C. A fost investigată pe larg pe modelul piruvat decarboxilazei din drojdia de bucătărie. Această enzimă, face parte din complexul piruvat dehidrogenaza și într-o succesiune de reacții convertește piruvatul mitocondrial în acetil CoA.

Piruvat carboxilaza este capabilă să asiste reacția dintre un α -cetoacid și un compus carbonilic. Cofactorul enzimatic utilizat este tiaminpirofosfatul, pe care are loc decarboxilarea α -cetoacidului cu formare de anion acil, care poate să se adăuneze la o grupare carbonil, formându-se astfel α -hidroxiketonele produs. Reacția, condusă cu celule intacte de drojdie a fost testată pe mai multe substraturi acceptoare, dovedindu-se extrem de utilă. Una dintre realizările

de referință este sinteza precursorului pentru (-)-efedrină: (*R*)-2-hidroxi-1-fenilpropan-1-ona (Fig. 2)¹²

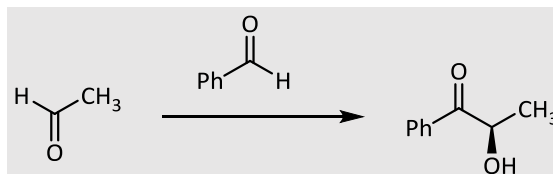


Fig. 3 condensare acolionică între benzaldehidă și acetaldehidă

Mecanismul acestei condensări este prezentat în Fig. 3.

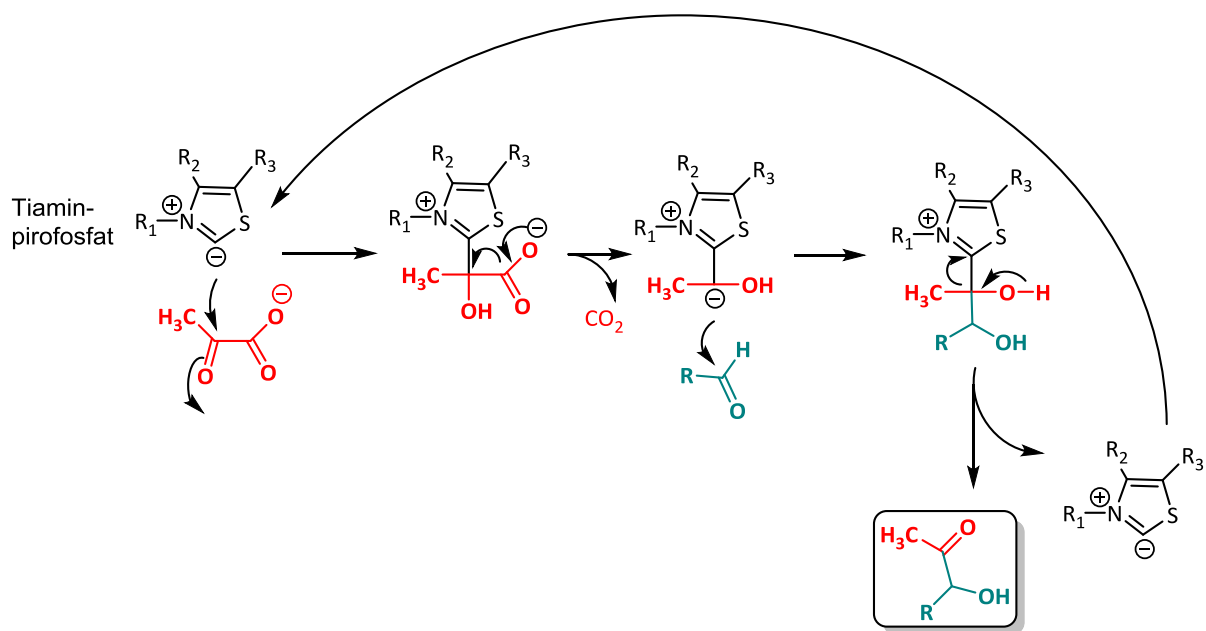


Fig. 4 Mecanismul condensării aciloinice catalizate de piruvat decarboxilaza

Reacții de condensare cu potențial de utilizare în prezentul proiect ar fi cele catalizate de **transcetolaze și transaldolaze**. ”In vivo,, transcetolazele transferă un motiv cetol de pe o cetoză donoare cu configurația S-pe o aldoză acceptoare, într-un proces diastereotopselectiv creându-se o legătură C-C între carbonul aldehydic ce devine carbon hidroxilic și C2 de la cetol. Transcetolazele folosesc tiaminpirofosfatul fosfat drept cofactor. Transaldolazele, catalizează reacții similare de transfer de pe o cetoză donoare pe o aldoză acceptoare, a unui motiv dihidroxicetol, cu formarea unui diol la punctul de joncțiune. Spre deosebire de transcetolaze,

¹² Garcí'a-Urdiales, E., Alfonso, I. and Vicente Gotor, (2005), Enantioselective Enzymatic Desymmetrizations in Organic Synthesis, Chem. Rev. 105, 313-354

transaldolazele nu folosesc cofactori. Și această reacție este diasterotop selectivă. Datele din literatură indică o rigiditate în selecția atât a donorului cât și a acceptorului, ceea ce le face dificil de ales pentru utilizarea în scopurile propuse.

Condensări aldolice asistate de lipaze

Lipazele, poate cele mai abundent folosite enzime în sinteza organică, sunt utile în special la rezoluția alcoolilor secundari chirali, a aminelor secundare, dar și a acizilor carboxilici. Lipazele aparțin serin hidrolazelor, la fel ca și carboxiesterazele, tioesterazele, peptidazele, dehalogenazele, epoxidhidrolazele, haloperoxidazele. Acțiunea lor asupra substraturilor este determinată de existența triadei catalitice Asp-His-Ser. În aceasta triadă, perechea aspartat-histidina facilitează transferul unui proton permițând în primă instanță generarea unui nucleofil, iar mai apoi eliberarea grupării fugace a reacției de alcooliză. Capacitatea de a stabiliza un oxianion precum și abilitatea de a realiza un transfer de protoni a fost exploatată în utilizarea unor substraturi carbonilice, care vor forma cu mai mult sau mai puțină eficiență structuri de tip enolat care vor putea interacționa cu gruparea carbonil a unei molecule de substrat neatașate¹³:

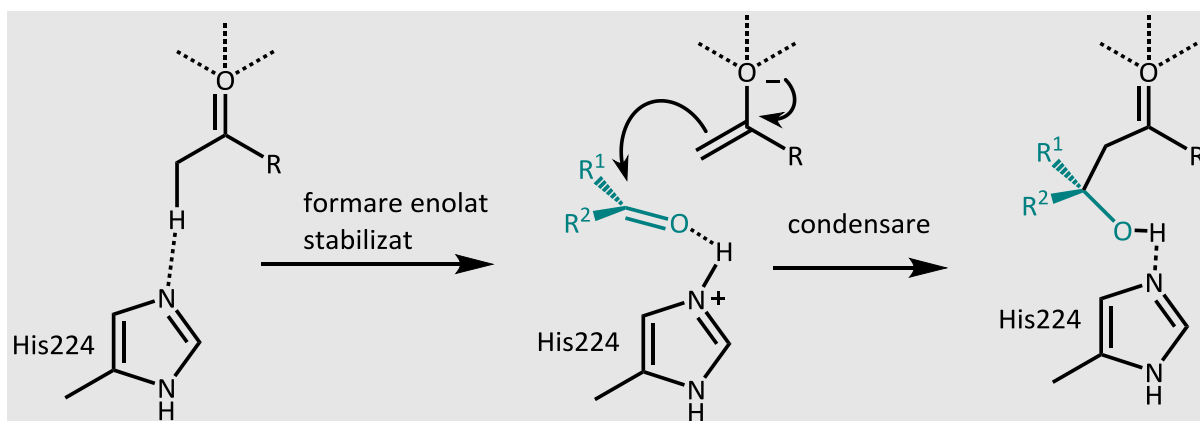


Fig. 5 Utilizarea capacității de stabilizare a oxianionului și de transfer al protonului lipazei CALB (lipaza B din *Candida antarctica*, EC 3.1.1.3) pentru realizarea unei condensări aldolice

O reacție interesantă, cu formare de legătură C-C, catalizată de lipaza CALB similară cu ce mai sus prezentată a fost publicată de curând (2013). Este vorba de o adiție Michael, la care se folosește un electrophil cu dubla legătură activată de prezența unei grupări nitro, stabilizate, după autori cu echipamentul din buzunarul anionic al lipazei, și cu enolatul, stabilizat de un adaos de acetamidă.

¹³ Branney, C., Carlqvist, P., Magnusson, A., Hult, C., Brinck, T., Berglund, P., (2003), Carbon-Carbon Bonds by Hydrolytic Enzymes, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 874-875

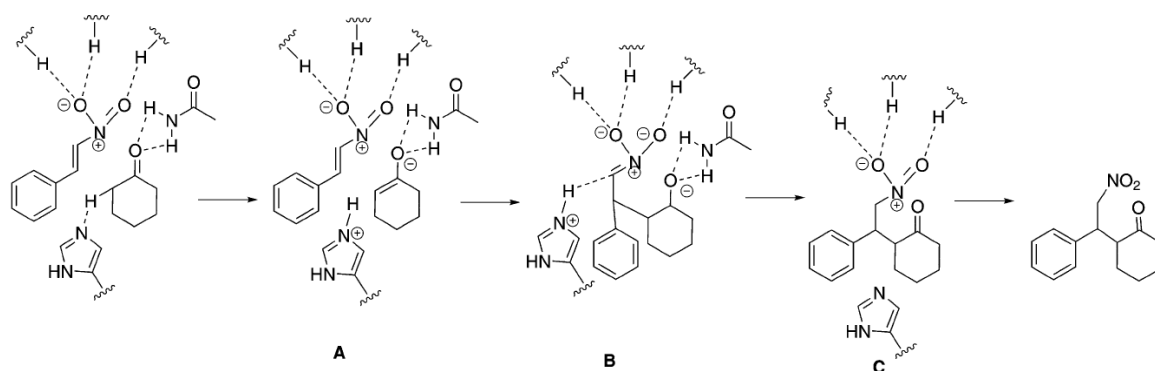


Fig. 6 Adiție Michael asistată de CALB, cu utilizarea acetamidei ca stabilizator de enolat.

S-a constatat, că în lipsa acetamidei, reacția nu are loc, dar în prezența stabilizatorului acesteia, în funcție de natura cetonei, randamentul obținut a fost până la 72%, la o temperatură de 50°C și un timp de reacție de 72 de ore.

Proiectul AdvBioFuels propune condensarea acidului piruvic obținut din etapele anterioare cu 5-hidroximetil-furfural obținut prin cataliza heterogenă din melasa. Condensarea aldolică va decurge „în situ”, paralela cu sinteza de acid piruvic. Catalizatorul folosit în glicoliza, drojdia alimentară, pentru înlargirea 5-hidroximetil-furfuralului cu acid piruvic. Printre avantajele folosirii celulelor întregi, se numără: preparare mai simplă de catalizatori și strategii ușoare de reciclarea eficientă a cofactorilor sau conversii în mai multe etape utilizând enzime izolate ca și catalizatori. Unul din motivele principale pentru care drojdiile sunt biocatalizatori folositori în comparație cu *Escherichia coli* care prezintă un perete celular relativ rigid care conferă toleranță ridicată și robustețe solvenților chimici și organici¹⁴. Biocatalizatorul oferă un avantaj considerabil sintezei chimice: reacțiile catalitice enzimatică sunt deseori antioselective și regioselective, drojdiile sunt considerate organisme ideale de biocatalizator stereoselectiv care poate conduce la intermediari chirali în sinteza compușilor enantimerici puri. *S. cerevisiae* s-a folosit ca și catalist sub formă de celulă întreagă pentru transformări asimetrice, în special în reacțiile de bioreducere pentru prepararea alcoolilor chirali.

Condensarea aldolică este considerată una din cele mai importante reacții cu formare de legături carbon-carbon în sinteza organică deoarece este o metodă de obținere a compușilor

¹⁴ T. Matsumoto, S. Takahashi, M. Kaieda, M. Ueda, A. Tanaka, H. Fukuda, A. Kondo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57 (2001) 515–520.

hidroxicarbonil chirali. Aldolazele sunt enzime importante în pentru multe cai metabolice capabile să catalizeze condensarea aldolică. Unele din ele au fost explorate pentru utilizarea lor ca și catalizatori în sinteza organică. Stereoselectivitatea la aldolaze este controlată de enzime și nu depinde nici de structură nici de stereochemia substratului, ceea ce permite produși predictibili.¹⁵

Olmo et al au studiat condensarea acetonei cu p-nitrobenzaldehida obținând conversie de 58 %¹⁶, după optimizarea sintezelor, au raportat rezultate foarte bune *P. jadinii*, conversie de 80 % și *K. marxianus* conversie de 60 %¹⁷

Activitate I.2

„Dezvoltarea de modele experimentale de condensare (acetalizare) a 1-(5- (hidroxil-metil)-furan-2-il) propan-1,2-diolului cu aldehide și a glicerinei cu HMF”.

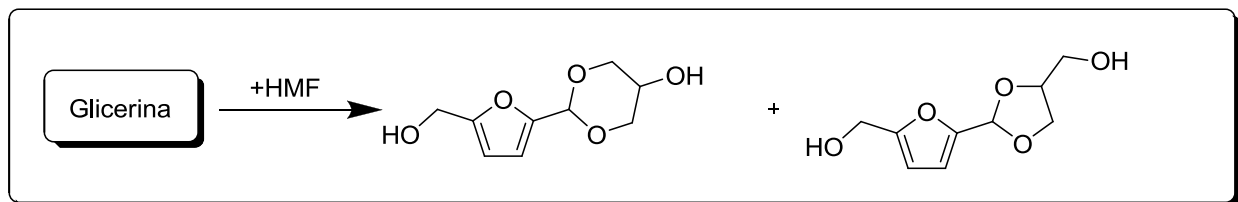


Fig.6 Obiectivul activității I.2

Materie prima: Glicerina

Dezvoltarea industriei de biodiesel a dus și la obținerea unei cantități mari de glicerină brută. Producția de biodiesel la nivel mondial 15.5 Mt în 2010 a dus și la obținerea de glicerină brută de ~10 % raportat la biodiesel. În 2016 se estimează o producție globală de 32 milioane de litri de biodiesel și care va genera ~3 milioane de litri de glicerina brută¹⁸. Glicerina se poate utiliza în industria alimentară, farmaceutică, cosmetică dar necesită purificare avansată, decolorare și deodorizare. Cantitățile mari de glicerină ridică nu numai probleme de valorificare

¹⁵ R. Mahrwald (Ed.), *Modern Aldol Reactions*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**

¹⁶ Marcel Olmo, Cecilia Andreu, Gregorio Asensio Use of *Saccharomyces cerevisiae* as a whole cell system for aldol condensation in organic medium: Study of the factors affecting the biotransformation *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2011**, pp. 72; 90-94

¹⁷ Cecilia Andreua, Marcel-lí del Olmo ,Exploring the potential of some yeast strains in the stereoselective synthesis of aldol reaction products and its reduced 1,3-dialcohol derivatives, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2013**, pp. 92, 57–61

¹⁸ Organisation for Economic Co-operation and Development and Food and Agriculture Organization of the United Nations, *OECD-FAO Agricultural Outlook 2011-2020*. Rome: FAO, (2011) pp. 77–93

dar și economice și ecologice. Depozitarea glicerinei brute, nepurificate fără conversia lui în produse cu valoare adăugată ridică costuri și scade economicitatea pieței de biodiesel. Surplusul de glicerină în creștere pe piața globală a ridicat problema valorificării la nivel mondial. Se poate valorifica ca materie primă pentru bioetanol¹⁹, și alte valoroase prin fermentație. Obținerea 1,3-propandiolului se poate obține prin fermentație microbială a glicerolului brut. Totodată se obține prin fermentație și alte produse valoroase,²⁰ ca acid lactic, acid citric, 1,3-dihidroxiacetona, dicloro-2-propanol, hidrogen, etanol ect. Acidul citric se poate obține prin fermentarea glicerolului brut cu *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589²¹. Hong et. al. a raportat o metodă bună de obținere de acid lactic și a esterilor acestuia, din glicerină folosind o tulpină Ac -521 din familia *Escherichia coli*²². 1,3-propandiol cu aplicații în cosmetica și alimentară, farmaceutic, se obține prin fermentația cu *Klebsiella pneumoniae*. Un compus valoros 1,3-dihidroxiacetona (DHA) produs cu aplicații în industria cosmetică și fungicide se poate obține prin oxidarea electrocatalitică a glicerolului²³. Un potențial mic (de 1.1V pe Ag/AgCl) se aplică la o soluție de glicerol în apă la un pH de 9.1 în prezența de 15 % 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil. Dicloro-2-propandiol (DCP) este un produs important în obținerea de epichlorhidrina, rășini epoxi, produse farmaceutice etc, și se poate obține din glicerol cu acid acetic ca și catalizator la 90 - 120 °C²⁴.

Obținerea de aditivi din glicerol care pot îmbunătăți proprietățile biodieselului conform Garcia et al²⁵ printr-o sinteză oxidică de la glicerol brut se obține aditivi. Acetalul 2,2-dimetil-1,3-dioxolan se obține prin amestecul glicerinei cu acetona în prezența acidului para-toluensulfonic monohidrat, reacția are loc la reflux 16h. Cu anhidrida acetică în soluție de trietilamina la temperatura camerei timp de 4 ore se obține rezultate similare.

¹⁹BIOCONVERSION OF GLYCEROL FOR BIOETHANOL PRODUCTION USING ISOLATED ESCHERICHIA COLI SS1, Sheril Norliana Suhaimi, , Lai-Yee Phang, Toshinari Maeda, , Suraini Abd-Aziz,, Minato Wakisaka, Yoshihito Shirai, Mohd Ali Hassan, *Brazilian Journal of Microbiology* (2012): 506-516

²⁰ Glycerol (byproduct of biodiesel production) as a source for fuels and chemicals – mini review, Xiaohu Fan, Rachel Burton and Younchang Zhou, *The Open Fuels & Energy Science Journal*, 2010, 3, 17-22

²¹ Imandi, S.B.; Bandaru, V.R.; Somalanka, S.R.; Garapati, H.R. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. *Enzyme Microb. Tech.*, 2007, 40, 1367-1372.

²² Hong, A.A.; Cheng, K.K.; Peng, F.; Zhou, S.; Sun, Y.; Liu, C.M.; Liu, D.H. Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2009, 84, 1576-1581.

²³ Ciriminna, R.; Palmisano, G.; Pina, C.D.; Rossi, M.; Pagliaro, M. One-pot electrocatalytic oxidation of glycerol to DHA. *Tetrahedron Lett.*, 2006, 47, 6993-6995

²⁴ Luo, Z.H.; You, X.Z.; Li, H.R. Direct preparation kinetics of 1,3-dichloro-2-propanol from glycerol using acetic acid catalyst. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2009, 48, 446-452

²⁵ García, E.; Laca, M.; Pérez, E.; Garrido, A.; Peinado, J. New class of acetal derived from glicerina as a biodiesel fuel component. *Energ. Fuel.*, 2008, 22, 4274-4280.

Condensarea glicerinei cu gruparea aldehidica din 5-hidroximetil-furfural

Pentru inhibarea reacțiilor secundare și mărirea randamentului, glicerina brută se va purifica prin următoarea tehnologie: Glicerina brută se transvazează în instalația de filtrare la vid și se separă esterii metilici ai acizilor grași. Filtratul se transvazează în instalația de tratare acidă conform imaginii 2, unde se tratează sub agitare cu acid fosforic 85 %, introdus în picături. Reacția este exotermă, temperatura masei de reacție crescând până la 60-65 °C. Se menține agitatea timp de 30 de minute, după care suspensia se transvazează în instalația de filtrare. Se separă turta cu conținut majoritar de fosfat acid de potasiu. Filtratul se transvazează în instalația de distilare conform imaginii 3. Se pornește încălzirea și barbotarea cu aer pentru omogenizarea masei de distilat, se cuplează pompa de vid și se colectează metanolul condensat în balonul colector. Se oprește încălzirea, și se aerisește instalația. Se determină prin cântărire diferențială cantitatea de condens cu conținut majoritar de metanol. În instalația de filtrare se separă acizii grași, iar glicerina brută se transvazează în instalația de distilare la vid, unde se corectează pH-ul glicerinei brute până la valoarea de 8,5-9 prin introducerea unei soluții apoase de NaOH 50 % . Se pornește încălzire, se cuplează la pompa de vid și se colectează apa condensată. Se mărește depresiunea în instalație și se continuă încălzirea. În intervalul de temperatură 160-180 °C la o depresiune de 20-30 torri remanent se colectează glicerina distilată. După terminarea distilării rămâne în balon reziduu de blaz cu conținut majoritar în poliglicerine.

Glicerina brută se transvazează în instalația de filtrare la vid din imaginea 1. Se separă esterii metilici ai acizilor grași. Filtratul se transvazează în instalația de tratare acidă, unde se tratează sub agitare cu acid fosforic 85 %, introdus în picături. Reacția este exotermă, temperatura masei de reacție crescând până la 60-65 °C. Se menține agitatea timp de 30 de minute, după care suspensia se transvazează în instalația de filtrare. Se separă turta cu conținut majoritar de fosfat acid de potasiu. Filtratul se transvazează în instalația de distilare. Se pornește încălzirea și barbotarea cu aer pentru omogenizarea masei de distilat, se cuplează pompa de vid și se colectează metanolul condensat în balonul colector. Se oprește încălzirea, și se aerisește instalația. Se determină prin cântărire diferențială cantitatea de condens cu conținut majoritar de metanol. În instalația de filtrare se separă acizii grași, iar glicerina brută se transvazează în instalația de distilare la vid, unde se corectează pH-ul glicerinei brute până la valoarea de 8,5-9

prin introducerea unei soluții apoase de NaOH 50% . Se pornește încălzire, se cuplează la pompa de vid și se colectează apa condensată. Se mărește depresiunea în instalație și se continuă încălzirea. În intervalul de temperatură 160-180 °C la o depresiune de 20-30 torri remanent se colectează glicerina distilată. După terminarea distilării rămâne în balon reziduu de blaz cu conținut majoritar în poliglicerine.

Glicerina purificată se condensează cu glicerina în mediu acid. Acizii pot fi acizi heterogeni de tip Bronsted și Lewis. Nu există în literatură rapoarte despre condensarea glicerinei cu 5-hidroximetil-furfural, dar sunt rapoarte despre condensarea unor aldehide cu glicerină. Formarea acetalilor ciclici în prezența acizilor AuCl₃ și NaAuCl₄ și PTSA au randamente foarte bune de 80-90 %. Tot ei au raportat acetalizarea cu n-haptanal prin folosirea în plus față de acizii de mai sus acid hidrocloric și LaOTf.²⁶ Există rapoarte de acetalizare cu cetone, ca acetona²⁷ și ciclohexanona²⁸ folosind acizi solizi.

Bibliografie generală

[1] 2013 Renewable Energy Progress Report [COM(2013) 175]

[2] Calculation of the Specific Technological Parameters for the Technological Process to Produce Baking Yeast in Shorter Multiplication Cycle, Mihaela Begea, Mariana Vlădescu, Cristina Stoicescu, Daniela Simion, Paul Begea, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* **2010**, 16 (2), 196-199

[3] Tehnologia zahărului, Culache, D., Platon, V., **1984**, Ed. Tehnică, București

[4] idem

[5] Howard, J.W. and Fraser, W. A.: Preparation of pyruvic acid. *Org. Synth. Coll.*, 1, 475–480 (**1932**).

[6] van Maris, A. J., Geertman, J. M., Vermeulen, A., Groothuizen, M. K., Winkler, A. A., Piper, M. D., van Dijken, J. P., and Pronk, J. T.: Directed evolution of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*, yielding a C2-independent, glucose-tolerant, and pyruvate-hyperproducing yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 159–166 (**2004**).

²⁶ Gold catalysts and solid catalysts for biomass transformations: Valorization of glycerol and glycerol–water mixtures through formation of cyclic acetals, Violeta R. Ruiz, Alexandra Velt, Laura L. Santos, Antonio Leyva-Pérez, María J. Sabater, Sara Iborra, Avelino Corma, *Journal of Catalysis*, 271, Issue 2, **2010**, pp 351–357

²⁷ Acetalisation of bio-glycerol with acetone to produce solketal over sulfonic mesostructured silicas, Gemma Vicente, Juan A. Melero, Gabriel Morales, Marta Paniaguab and Eric Martín, *Green Chem.*, **2010**,12, 899-907

²⁸ Oprescu, E.-E., Stepan, E., Roșca, P., Adrian, R., Enășcuță, C.-E., Green synthesis of cyclohexanone glycerol ketal catalyzed by a solid superacid, *Analele Universitatii "Ovidius" Constanta - Seria Chimie*. **2013** 23, 1, pp. 72–76

- [7] Liu, L. M., Xu, Q. L., Li, Y., Shi, Z. P., Zhu, Y., Du, G. C., and Chen, J.: Enhancement of pyruvate production by osmotic-tolerant mutant of *Torulopsis glabrata*. *Biotechnol. Bioeng.*, 97, 825–832 (2007).
- [8] Morgunov, I.G., Kamzolova, S. V., Perevoznikova, O. A., Shishkanova, N. V., and Finogenova, T. V.: Pyruvic acid production by a thiamine auxotroph of *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem.*, 39, 1469–1474 (2004).
- [9] Zelić, B., Gostovic, S., Vuorilehto, K., Vasić-Racki, D., and Takors, R.: Process strategies to enhance pyruvate production with recombinant *Escherichia coli*: from repetitive fedbatch to in situ product recovery with fully integrated electrodialysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 85, 638–646 (2004).
- [10] T. Matsumoto, S. Takahashi, M. Kaieda, M. Ueda, A. Tanaka, H. Fukuda, A. Kondo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57 (2001) 515–520.
- [11] R. Mahrwald (Ed.), *Modern Aldol Reactions*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004
- [12] Marcel Olmo, Cecilia Andreu, Gregorio Asensio Use of *Saccharomyces cerevisiae* as a whole cell system for aldol condensation in organic medium: Study of the factors affecting the biotransformation *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 2011, pp. 72; 90-94
- [13] Cecilia Andreu, Marcel-Lí del Olmo, Exploring the potential of some yeast strains in the stereoselective synthesis of aldol reaction products and its reduced 1,3-dialcohol derivatives, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013, pp. 92, 57–61
- [14] Organisation for Economic Co-operation and Development and Food and Agriculture Organization of the United Nations, *OECD-FAO Agricultural Outlook 2011-2020*. Rome: FAO, (2011) pp. 77–93
- [15] BIOCONVERSION OF GLYCEROL FOR BIOETHANOL PRODUCTION USING ISOLATED *ESCHERICHIA COLI* SS1, Sheril Norliana Suhaimi, , Lai-Yee Phang, Toshinari Maeda, , Suraini Abd-Aziz,, Minato Wakisaka, Yoshihito Shirai, Mohd Ali Hassan, *Brazilian Journal of Microbiology* (2012): 506-516
- [16] Glycerol (byproduct of biodiesel production) as a source for fuels and chemicals – mini review, Xiaohu Fan, Rachel Burton and Youngchang Zhou, *The Open Fuels & Energy Science Journal*, 2010, 3, 17-22
- [17] Imandi, S.B.; Bandaru, V.R.; Somalanka, S.R.; Garapati, H.R. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. *Enzyme Microb. Tech.*, 2007, 40, 1367-1372.
- [18] Hong, A.A.; Cheng, K.K.; Peng, F.; Zhou, S.; Sun, Y.; Liu, C.M.; Liu, D.H. Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2009, 84, 1576-1581.
- [19] Ciriminna, R.; Palmisano, G.; Pina, C.D.; Rossi, M.; Pagliaro, M. One-pot electrocatalytic oxidation of glycerol to DHA. *Tetrahedron Lett.*, 2006, 47, 6993-6995
- [20] Luo, Z.H.; You, X.Z.; Li, H.R. Direct preparation kinetics of 1,3-dichloro-2-propanol from glycerol using acetic acid catalyst. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2009, 48, 446-452
- [21] García, E.; Laca, M.; Pérez, E.; Garrido, A.; Peinado, J. New class of acetal derived from glicerina as a biodiesel fuel component. *Energ. Fuel.*, 2008, 22, 4274-4280.
- [22] Gold catalysts and solid catalysts for biomass transformations: Valorization of glycerol and glycerol–water mixtures through formation of cyclic acetals, Violeta R. Ruiz, Alexandra Velty, Laura L. Santos, Antonio Leyva-Pérez, María J. Sabater, Sara Iborra, Avelino Corma, *Journal of Catalysis*, 271, Issue 2, 2010, pp 351–357

[23] Acetalisation of bio-glycerol with acetone to produce solketal over sulfonic mesostructured silicas, Gemma Vicente, Juan A. Melero, Gabriel Morales, Marta Paniaguab and Eric Martín, *Green Chem.*, **2010**,12, 899-907

[24] Oprescu, E.-E., Stepan, E., Roșca, P., Adrian, R., Enășcuță, C.-E., Green synthesis of cyclohexanone glycerol ketal catalyzed by a solid superacid , *Analele Universitatii "Ovidius" Constanta - Seria Chimie.* **2013** 23, 1, pp. 72–76.

DISEMINAREA REZULTATELOR CERCETĂRII AFERENTE ETAPEI DIN ANUL 2014

s-a realizat prin participarea la o conferință internațională, organizată de Universitatea Tehnică Gheorghe Asachi din Iași cu o prezentare orală.

Resursele financiare au fost utilizate pentru achiziționarea unor reactivi și materiale, dar și a unor aparate mici necesare pentru realizarea experimentelor propuse în cadrul proiectului.

Cheltuielile de personal au fost orientate spre plata cercetătorilor cu experiență și a unui doctorand, care s-au implicat în derularea activităților propuse pentru anul 2014.

VAÂND ÎN VEDERE REZULTATELE OBȚINUTE CONSIDERĂM CĂ OBIECTIVELE ANULUI 2014 AU FOST ATINSE ÎN TOTALITATE IAR REZULTATELE OBȚINUTE VOR PERMITE DERULAREA ACTIVITĂȚILOR PROPUSE PENTRU ETAPELE URMĂTOARE.

Prof. Dr. Ing. Florin Dan Irimie