

**RAPORT STIINTIFIC SI TEHNIC IN EXTENSO AL PROIECTULUI  
DEZVOLTAREA UNOR BIOCATALIZATORI NOI PENTRU OBTINEREA  
ECONOMICA A UNOR SINTONI CHIRALI (SYNBIOCAT), COD PN-II-PT-PCCA-  
2011-3.1-1268, contract 124/2012**

**ETAPA II. Caracterizarea culturilor celulare si purificarea enzimelor (2013)**

**REZUMATUL ETAPEI**

Pentru atingerea obiectivelor urmarite in aceasta etapa a proiectului au fost propuse si realizate in totalitate urmatoarele activitati:

Activitatea II.1 Caracterizarea culturilor celulare

Activitatea II.2 Purificarea enzimelor

Activitatea II.3 Imobilizarea enzimelor

In vederea unei caracterizari complete a culturilor, mai intai enzima termostabila din *Anoxybacillus flavithermus* cu activitate hidrolazica izolata in etapa anterioara a fost clonata in *E. coli*. Dupa purificarea sa, enzima a fost complet caracterizata, rezultatele fiind publicate [1].

Testarea potentialului biocatalitic al lipazelor in procese stereoselective cu implicatii in sinteza organica fina a compusilor chirali biologic activi este o activitate de importanta majora a acestui proiect. In aceasta etapa au fost abordate ca si substraturi alcoolii cu structura furanica [2] si ariltiazoletanolii chirali [3], cercetarile efectuate in acest sens fiind concretizate astfel in publicarea a altor doua articole stiintifice in reviste de specialitate relevante domeniului, cotate ISI.

Un alt obiectiv important l-a constituit investigarea, in scopul dimensionarii si operarii optime ale bioreactoarelor cu configuratii diferite ale straturilor de biocatalizatori imobilizati, a proceselor difuzionale externe si interne granulelor de biocatalizatori, precum si a influentelor difuziei, dimensiunii biocatalizatorilor si configuratiei stratului de biocatalizatori asupra vitezei si eficientei conversiei substratului. Cercetarile s-au efectuat pentru sisteme care contin enzime imobilizate cu aplicatii valoroase la nivel industrial, rezultatele putand fi extrapolate si pentru alte enzime [4]. In același timp, experimentele s-au realizat folosindu-se bioreactoare neconventionale (bioreactor tip basket staționar cu enzime imobilizate), iar rezultatele au fost comparate cu cele obtinute în bioreactoare clasice [5].

**DESCRIEREA STIINTIFICA SI TEHNICA**

**I. Clonarea moleculara si caracterizarea enzimei termostabile din *Anoxybacillus flavithermus* cu activitate hidrolazica (esterazica/lipazica)<sup>1</sup>**

Tulpina izolata in etapa precedenta din izvorul termal din zona Tasnad care produce enzima extracelulara cu activitate esterazica/lipazica a fost identificata ca apartinand specie *Anoxybacillus flavithermus*. Gena care codifica carboxilesteraza a fost clonata prin amplificarea directa (prin PCR) a AND-ului genomic. Proteina contine 246 resturi de aminoacizi, respective o masa moleculara preconizata de cca 28.03 kDa. Dupa exprimare in *E. coli* s-a obtinut din fractia periplasmatica, o proteina recombinata cu activitate esterolitica si o masa moleculara estimate de 25 kDa.

Enzima purificata este activa in domeniul neutru (pH= 6.5-8) si prezinta maxim de activitate la 60-65 °C, avand o stabilitate caracterizata prin  $t_{1/2}$  de circa 5 ore la 60 °C. Enzima prezinta toleranta la metanol, dimetilsulfoxid si acetone, iar prezenta detergentilor (SDS, Triton) in concentratie mica duce la cresterea termostabilitatii acesteia.

Enzima recombinata prefer ca si substrat butanoatul de *p*-nitrofenil dar catalizeaza si hidroliza esterilor acizilor grasi, inclusiv a trioleinei. Testarea enantioselectivitatii acesteia a demonstrat ca enzima transforma preferential enantiomerii *S* ai substraturilor. Secventa aminoacizilor si structura tridimensionala preconizata

a noii Est/Lip este similara altor carboxiesteraze izolate din specii de *Anoxybacillus* si *Geobacillus* recent descrites in literatura de specialitate.

Atat esterazele (EC 3.1.1.1) cat si lipazele (EC 3.1.1.3) hidrolizeaza legaturile esterice dar din substraturi specific: esterazele actioneaza asupra esterilor simpli, inclusiv a trigliceridelor acizilor carboxilici inferiori, in timp ce lipazele prefera acilglicerolii acizilor grasi si esterii insolubili in apa cu diverse structuri, actionand la interfata.

#### **A. Colectarea, izolarea si cultivarea *Anoxybacillus flavithermus*, specia T1**

Tulpina bacteriana a fost izolata dintr-un izvor termal situate in Tasnad, Satu Mare, Romania. Datele oficiale prezentate de autoritati sunt: adancimea izvorului 1354 m, temperature la suprafata 72°C, pH circa 8, 9.84 g compusi minerali/L, alcatuiti preponderant din cloruri, bicarbonati si sulfati de sodiu, calciu si magneziu.

Proba de apa colectata in conditii sterile a fost inoculata pe placi de LB-agar dupa o perioada foarte scurta de timp si acestea au fost incubate timp de 24 h la 60°C, observandu-se formarea unor colonii distincte. O singura colonie a fost apoi folosita la inocularea in mediu LB steril (25-50 mL) imbogatit in NaCl cu compozitia: tryptona 10 g, extract de drojdie 5 g si NaCl 10 g, pH 8.2. Cultura primara, obtinuta prin incubarea la 60°C si 200 rpm timp de 22-24 ore a fost apoi utilizata pentru inocularea a 200-250 ml mediu steril in flacoane Erlenmeyer de 2 L.

#### **B. Identificarea si caracterizarea tulpinii bacteriene. Incadrarea in fenotip.**

Analiza atenta a coloniilor dezvoltate pe placi, microscopia electronica si colorarea Gram a permis o prima caracterizare a bacteriei. Au fost determinate activitatea catalazica si amilazica prin procedeele standard, toleranta la NaCl in domeniul 0.5-5% la 60 °C precum si temperatura fiziologica (in domeniul 20-80 °C la pH 7.5) si domeniul de pH al cresterii aerobe (intre 5.0 si 10 la 60 °C).

Caracterizarea biochimica a tulpinii s-a realizat cprin metoda descrisa de Logan si Berkeley in 1984.

#### **C. Identificarea genetica. Extractia AND, amplificarea PCR si secventarea AND.**

Pentru izolarea AND-ului genomic s-a utilizat kit-ul de purificare genomica GeneJET (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) si protocolalele experimentale aferente. Gena 16S a rARN a fost amplificata in doi primeri bacterieni universali: 16S-F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') si 16S-R (5'-CGG CTA CCT TGT TAG GAC TT-3') utilizand ADNpolimeraza (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada). Pentru secventare directa s-a folosit kit-ul de extractie GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada) si protocelele aferente. Secventarea And-ului s-a realizat in fiecare caz din ambele capete. Analiza genetica a fragmentelor s-a realizat intr-un analizor ABI PRISM 3130, iar asamblarea fragmentelor cu un echipament ContigExpress (Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, USA). Cautarea similaritatilor cu programul *blastn* 2.2.25 a fost realizata cu un fragment de 1459 perechi de baze.

#### **D. Clonarea si exprimarea genei obtinute a enzimei Est/Lip**

Au fost utilizate celule XL1 Blue (Stratagene) si BL21(DE3) (Novagen) de *Escherichia coli*. Dupa inserarea plasmidei celulele au fost cultivate in mediu LB cu ampicilina 100 µg/ml si tetraciclina 50 µg/ml la 37°C si 200 rpm. AND-ul genomic al *Anoxybacillus flavithermus* a fost extras cu un kit de purificare MasterPure (Epicentre). Gena hidrolazei a fost amplificata in doua seturi de primeri (intracelular si periplasmatic). Dupa incorporarea zonelor de restrictive in secventa directa si cea inversa, in zona C-terminala s-a realizat Histagilarea, in scopul purificarii ulterioare prin IMAC.

Dintre polimerazele testate (MyTaq, RedTaq si Phusion) a fost selectata MyTaq. Produsii PCR au fost analizati pe agaroză 1% si apoi purificati cu NucleoSpin® Gel si PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Pentru confirmarea clonarii s-a utilizat secventarea cu Eurofins MWG GmbH.

Cu plasmidele care contin insertul dorit s-a trecut la exprimarea proteinei in celule de *E. coli* BL21(DE3), prin inductie cu 1 mM IPTG si crestere 5 h la 37 °C. Din celulele separate prin centrifugare la 5,000 rpm si 4 °C timp de 15 min, a fost separate fractia periplasmatica si purificata pe Ni-agaroză.

Fractiile eluate cu solutie de imidazol 250 mM and 500 mM au fost testate pentru activitatea hidrolazica si li s-a determinat omogenitatea.

#### E. Caracterizarea biochimica a hidrolazei

A fost studiată reacția de hidroliza a acetatului și palmitatului de *p*-nitrofenil (*p*NPA și *p*NPP) la pH 8.0, în domeniul 25–80 °C, respectiv la 60°C și pH= 3.0-9.0 (tampon de citrat, fosfat și bicarbonat de sodiu 50 mM). A fost studiată și influența unor ioni metalici introdusi sub forma de clorura la o concentrație finală de 1 mM (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> și Al<sup>3+</sup>), respective a solventilor organici miscibili cu apă (în concentrație de 10%, 20% sau 30% în tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8): acetona, metanol, etanol, 2-propanol, acetonitril și dimetilsulfoxid.

Au fost studiate proprietățile catalitice ale acestei enzime folosind o gamă variată de substraturi: acetat, propanoat, butanoat, metilbutanoat, palmitat și oleat de *p*-nitrofenol, respective trioleina.

Continutul în proteina s-a determinat cu metoda Bradford. Reacția a fost monitorizată spectrofotometric, prin determinarea concentrației *p*-nitrofenolului măsurând absorbanta amestecului la 410 nm.

#### F. Biocataliza cu hidrolaza recombinată obținută Est/Lip

Pentru a determina stereoselectivitatea acestei noi enzime a fost studiată reacția de hidroliza a unor compuși chirali (Fig. I.1). Amestecul de reacție (soluție enzima, tampon TRIS 50 mM, pH 7.5, soluție substrat 2% v/v și eventual solvent pentru solubilizarea substratului) s-a menținut 20 ore la 50 °C și 200 rpm. După extracție în *n*-hexan/izopropanol (IPA) (9 : 1, 500 μl), uscarea și anhidrirea probelor, analiza s-a efectuat cromatografic cu un aparat Agilent 1200, folosind coloane cromatografice potrivite.

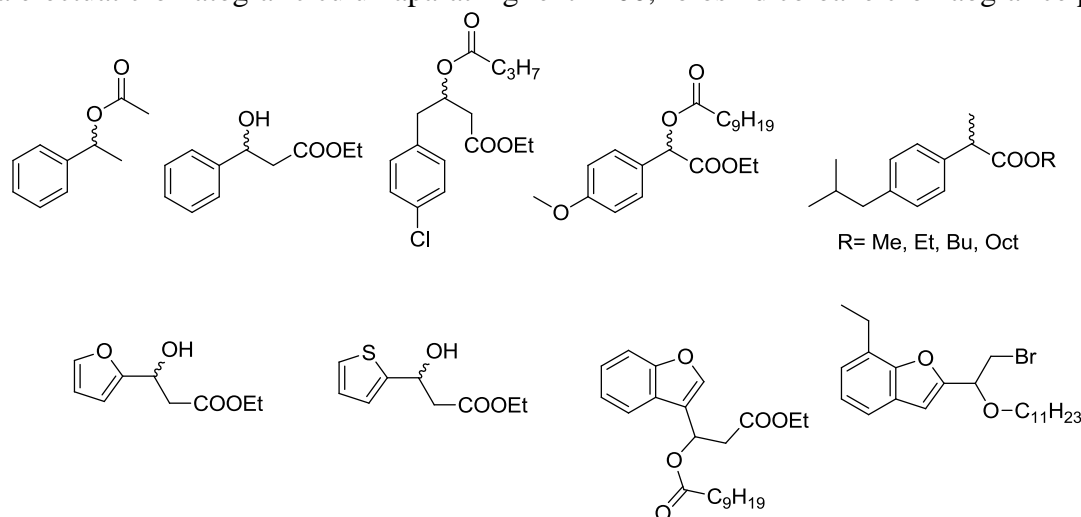


Fig I.1. Compuși chirali testați în reacția cu hidrolaza recombinată

Activitatea specifică și parametrii cinetici ai reacțiilor sunt prezentate în tabelele I.1- I.2.

**Tabelul I.1.** Specificitatea de substrat ai hidrolazei recombinată față de esterii *p*-nitrofenolului și trioleina la 60 °C, pH 8

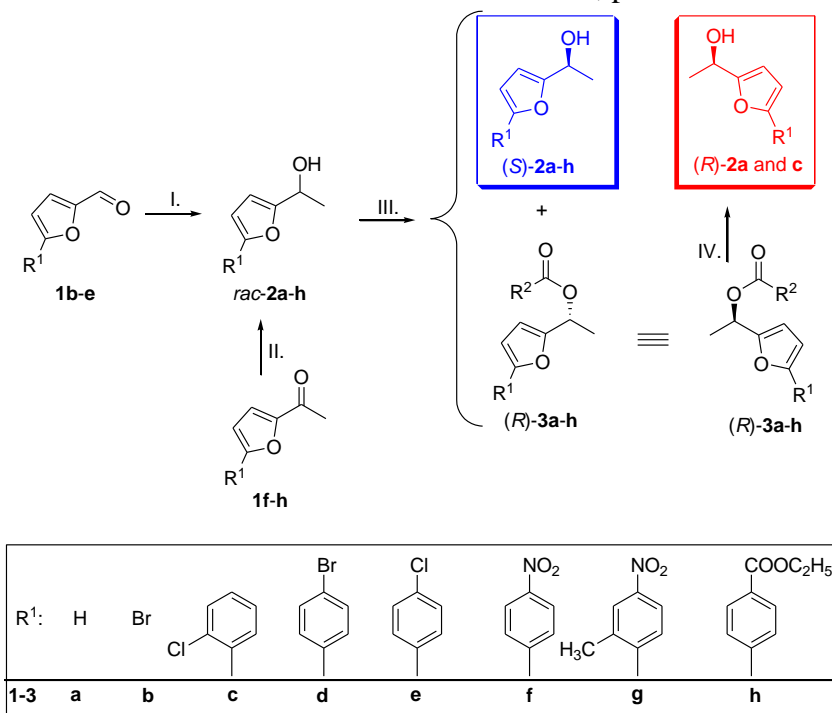
Substrat	Activitate specifică (U/mg)	Activitate reziduală (%)
Acetat de <i>p</i> -nitrofenil	61.3±1.5	36.7
propanoat	84.1±3.4	50.3
Butanoat de <i>p</i> -nitrofenil	167.1±2.7	100.0
Metilbutanoat de <i>p</i> -nitrofenil	149.1±32.6	89.2
Caprat de <i>p</i> -nitrofenil	73.6±2.9	44.1
Palmitat de <i>p</i> -nitrofenil	1.4±0.3	0.8
Oleat de <i>p</i> -nitrofenil	3.2±0.4	1.9
Trioleina	14.3±2.7	8.6

**Tabelul I.2.** Parametrii cinetici ai reactiei hidrolazei din *A. flavithermus* T1 recombinat cu acetat si propanoat de *p*-nitrofenil

Acetat	$V_{\max}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ )	$N$
Acetat	$82.89 \pm 1.56$	$34.14 \pm 1.37$	7400	216.75	$1.96 \pm 0.16$
Propanoat	$1.44 \pm 0.08$	$23.28 \pm 2.32$	128.5	5.52	$1.85 \pm 0.32$

## II. Lipazele, catalizatori eficienti ai metodei chemoenzimatice de obtinere a unor etanoli cu structura furanica optic puri<sup>2</sup>

Un obiectiv important al proiectului il reprezinta sinteza sintonilor chirali optic puri din clasa alcoolilor secundari care ulterior pot fi derivatizati spre compusi organici valorosi. In acest sens am abordat in prima etapa procesul de rezolutie cinetica enzimatica (EKR) enantiomer selectiva cu lipaze a 1-(furan-2-il)etanoliilor racemici substituiti la inelul furanic. Dupa optimizarea etapei enzimatice de rezolutie stereoselectiva si a etapei de hidroliza enzimatica neselectiva a esterilor optic puri, am elaborat o metoda chemoenzimatice de obtinere a ambilor enantiomeri ai alcoolilor tinta, prezentata in Schema II.1.



I. Reactie Grignard cu MeMgBr in eter etilic; II. Reducere cu NaBH<sub>4</sub> in etanol; III. Rezolutie cinetica enzimatica enantiomer selectiva cu lipaze si diferiti donori de acil; IV. Metanoliza neselectiva catalizata de lipaze

**Schema II.1.** Utilizarea lipazelor in procesul de obtinere a 1-fuile-etanoliilor optic puri

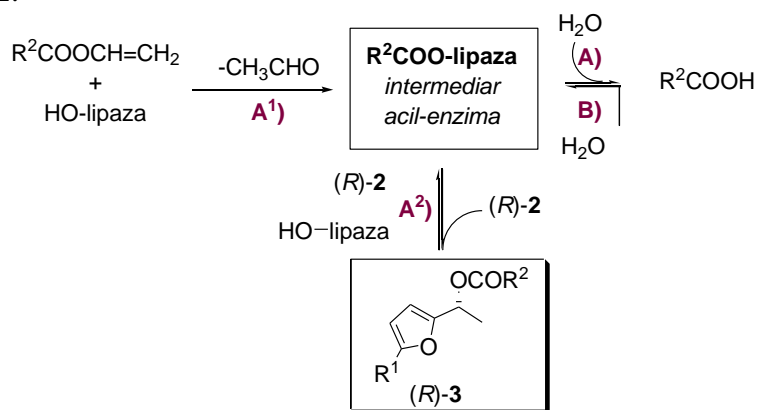
Mai intai s-a realizat sinteza celor opt alcooli racemici substituiti la inelul furanic din compusii carbonilici corespunzatori prin reactia Grignard a aldehydelor cu iodura de metil magneziu sau prin reducerea chimica cu borohidrua a metilcetonelor (etapele I si II din Schema II.1).

Studiul procesului de rezolutie cinetica enzimatica a alcoolilor racemici studiati a fost efectuat in detaliu, pornind de la experienta anterioara si rezultatele prezentate anterior in literaturile de specialitate, conform carora majoritatea lipazelor transforma preferential enantiomerul *R* al alcoolilor secundari care contin o grupare voluminoasa (comparativ cu inelul benzenic din 1-feniletanol) la atomul de carbon asimetric.

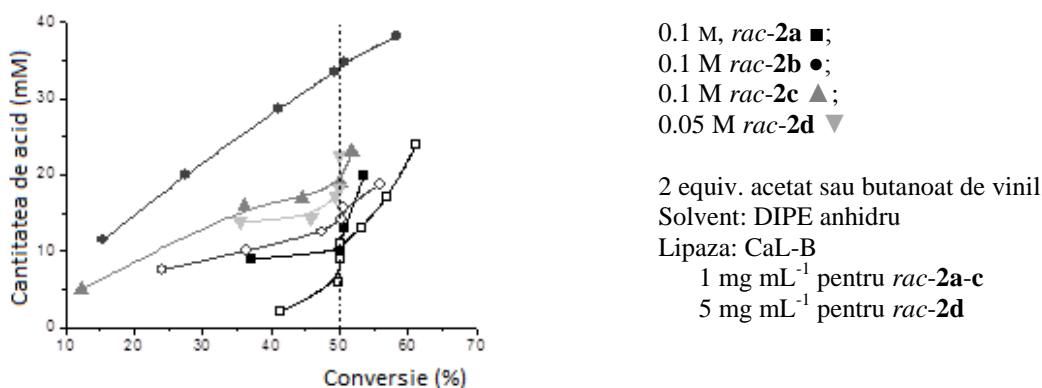
Aceasta selectivitate poate fi explicata prin existenta unui asanumit "buzunar de legare stereospecifica", in care se acomodeaza si se fixeaza cu preferinta maxima gruparea mai redusa ca volum.

Studiul procesului de EKR efectuat pe o gama larga de alcooli secundari a permis demonstrarea rolului esential pe care apa reziduala din enzima utilizata il are asupra selectivitatii procesului, care poate fi

evidentiat in etapizarea reactiei catalizata de lipaze, enzime din clasa serin-proteazelor, prezentata sugestiv in Schema II.2.



**Schema II.2.** Etapele competitive posibile in reactiile de acilare ale alcoolilor secundari catalizate de lipaze  
Astfel a fost propusa o metoda de obtinere a ambilor enantiomeri ai alcoolilor furil-etanolici chirali studiatii prin acilarea alcoolilor racemici cu acetat de vinil in diizopropil eter in prezenta lipazei B din *Candida antarctica* ca si catalizator, cu formarea enantiomerilor S ai alcoolilor si a enantiomerilor R ai esterilor prin a caror metanoliza subsecventa se pot obtine si R-alcoolii (Schema II.1, etapele III si IV).  
Reactiile de acilare a alcoolilor racemici in prezenta lipazelor respecta binecunoscuta regula a lui Kazlauskas, de transformare preferentiala a enantiomerilor R. In cazul alcoolilor cu substituent Cl sau Br in pozitia para a inelului benzenic, s-a observat un comportament anormal, respectiv transformarea rapida in prima etapa (cand este transformat enantiomerul R al alcoolului) si o scadere brusca a vitezei reactiei atunci cand este transformat enantiomerul S, ceea ce face ca raportul enantiomeric E sa scada brusc la o conversie de 45-50%. Pentru a explica acest comportament s-a presupus ca apa reziduala intervine in proces si au loc reactii secundare care duc la hidroliza esterului folosit ca donator de acil cu formare de acid (calea A in Schema II.2), dar si a esterului urmarit (calea B in Schema II.2) cu regenerarea speciei active, complexul acil-enzima. Pentru a demonstra aceasta ipoteza, a fost monitorizat continutul in acid pe parcurul procesului de acilare enzimatica a patru alcoolii racemici **2a-d**, Figura II.1. Se observa din Figura II.1 ca, datorita reactiei secundare de hidroliza, in timpul reactiei de acilare enzimatica cu CaL-B a alcoolilor racemici, in amestec se formeaza acid acetic sau butanoic. Cantitatea de acid formata creste lent pana aproape de valoarea de 50% a conversiei, dupa care se inregistreaza o crestere accentuata, datorita probabil vitezei reduse a reactiei enantiomerului S, care este concurata de reactia de hidroliza a esterilor.



**Figura II.1.** Cantitatea de acid formata in timpul acilarii enzimaticе a alcoolilor racemici *rac-2a-d*

Transpunerea la scara preparative a metodei chemoenzimatice dezvoltate permite obtinerea celor doi enantiomeri ai alcoolilor studiati cu randamentele din Tabelul II.1.

**Tabelul II.1.** Randamentele obtinute la rezolvarea alcoolilor racemici *rac-2* cu acetat de vinil si CaL-B in DIPE ca solvent

Entry	Product	Yield (%)	<i>ee</i> <sup>b</sup> (%)	<i>ee</i> <sup>c</sup> (%)	$[\alpha]_D^{25}$ (c 1, CHCl <sub>3</sub> )
1	( <i>S</i> )- <b>2a</b>	42 <sup>a</sup>	99	98	-20.8
2	( <i>R</i> )- <b>3a</b>	43 <sup>a</sup>	98	92	+164
3	( <i>R</i> )- <b>2a</b>	82	99	99	+20.7
4	( <i>S</i> )- <b>2b</b>	45 <sup>a</sup>	96	95	-20.1
5	( <i>R</i> )- <b>3b</b>	45 <sup>a</sup>	95	94	+159
6	( <i>S</i> )- <b>2c</b>	48 <sup>a</sup>	95	92	-1.6
7	( <i>R</i> )- <b>3c</b>	49 <sup>a</sup>	94	90	+146
8	( <i>R</i> )- <b>2c</b>	76	99	99	+1.6
9	( <i>S</i> )- <b>2d</b>	21 <sup>a</sup>	92	91	+5
10	( <i>R</i> )- <b>3d</b>	55 <sup>a</sup>	91	75	+54
11	( <i>S</i> )- <b>2f</b>	28 <sup>a</sup>	94	89	+2.3
12	( <i>R</i> )- <b>3f</b>	27 <sup>a</sup>	96	90	+225
13	( <i>S</i> )- <b>2g</b>	46 <sup>a</sup>	98	95	-2.3
14	( <i>R</i> )- <b>3g</b>	46 <sup>a</sup>	94	88	+198
15	( <i>S</i> )- <b>2h</b>	48 <sup>a</sup>	93	93	+5.8
16	( <i>R</i> )- <b>3h</b>	43 <sup>a</sup>	94	86	+178.8

<sup>a</sup> Raportat la amestecul racemic; <sup>b</sup> *ee* in amestecul obtinut; <sup>c</sup> *ee* dupa purificare prin cromatografie pe coloana.

### III. Rezolutia cinetica enzimatica a 1-(2-ariltiazol-4-il)etanolilor racemici si a acetatilor acestora cu lipaza B din *Candida antarctica*<sup>3</sup>

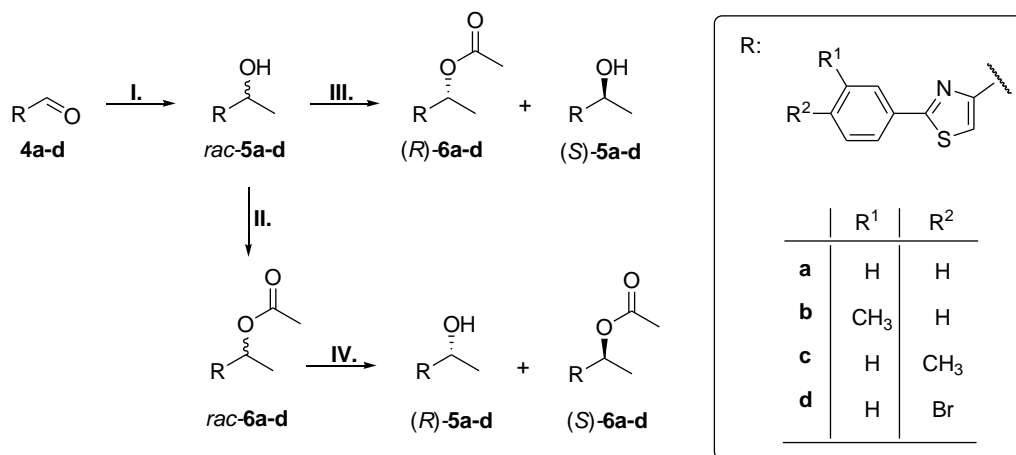
O metodologie similara a fost utilizata si pentru obtinerea ambilor enantiomeri ai 1-(2-ariltiazol-4-il)etanolilor. In prima etapa au fost preparati alcoolii racemici prin reactia Grignard a aldehydelor corespunzatoare **4a-d**, sintetizate la randul lor prin condensarea Hantzsch a tioamidelor cu 1,3-dicloroacetona si apoi reactie Sommelet.

Pentru sinteza acetatilor racemici, etanolii astfel obtinuti au fost acilati cu anhidrida acetica in prezenta trietilaminei si a unor cantitati catalitice de *N,N*-4-dimetilaminopiridina in diclorometan.

Procesul se realizeaza in doua etape: acilarea enantiomer selective a alcoolilor racemici *rac-5a-d* si metanoliza acetatilor racemici *rac-6a-d*, ambele mediate de lipaza B din *Candida antarctica* (CaL-B) in mediu neapos (Schema III.1).

Ambele tipuri de procese de EKR decurg cu selectivitati si randamente ridicate (conversii  $c \cong 50\%$ , raport enantiomeric  $E \gg 200$ ). Pentru determinarea configuratiei absolute a alcoolilor optic puri, nou sintetizati, s-a efectuat un studiu <sup>1</sup>H NMR detaliat al derivatului Mosher al (*S*)-**5b**.

Dupa determinarea conditiilor optime de realizare a celor doua procese de EKR la scara analitica, au fost realizate si transformarile preparative conform strategiei prezentata in Schema III.2. obtinandu-se ambii enantiomeri ai etanolilor si ai acetatilor acestora urmariti cu randamentele si excesele enantiomerice prezentate in Tabelul III.1.



I. CH<sub>3</sub>MgI/dietil eter; NH<sub>4</sub>Cl/H<sub>2</sub>O; II. (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O, DMAP/Et<sub>3</sub>N/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; III. CaL-B, acetat de vinil/toluen; IV. CaL-B, MeOH/MTBE

**Schema III.1.** Sinteza si biotransformarea 1-(2-feniltiazol-4-il)etanolilor si acetatilor corespunzatori

**Tabelul III.1.** Sinteza preparativa a alcoolilor si acetatilor (R)- si (S)-5,6a-d

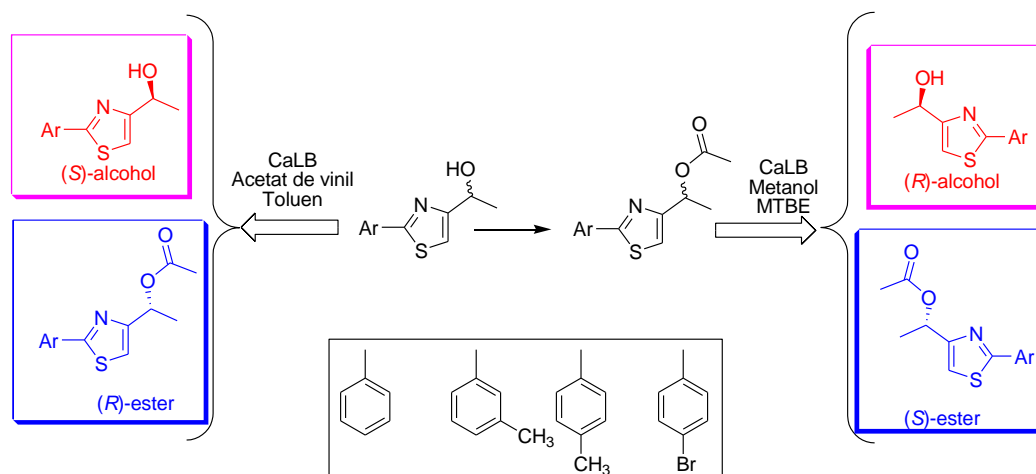
Nr	Produs <sup>1</sup>	$\eta^3$ (%)	<i>ee</i> (%)	$[\alpha]_D^{25}$ <sup>4</sup>	Produs <sup>2</sup>	$\eta^3$ (%)	<i>ee</i> (%)	$[\alpha]_D^{25}$ <sup>4</sup>
1	(S)-5a	48	>99.5	-8.60	(R)-5a	48	98	+8.1
2	(S)-5b	48	98.5	-7.00	(R)-5b	47	>99.5	+7.2
3	(S)-5c	49	>99.5	-6.80	(R)-5c	48	>99.5	+7.0
4	(S)-5d	48	>99.5	-10.25	(R)-5d	48	98	+9.8
5	(R)-6a	48	99	+126.4	(S)-6a	49	99	-126.0
6	(R)-6b	47	>99.5	+119	(S)-6b	47	98	-117.5
7	(R)-6c	48	99	+112.8	(S)-6c	46	98	-111.3
8	(R)-6d	47	99.3	+97	(S)-6d	49	90	-88.3

<sup>1</sup> prin acilarea enantioselectiva a alcoolilor racemici *rac*-5a-d mediate de CaL-B

<sup>2</sup> prin metanolica enantioselectiva a acetatilor racemici *rac*-3a-d mediate de CaL-B

<sup>3</sup> randamentul raportat la amestecul racemic initial

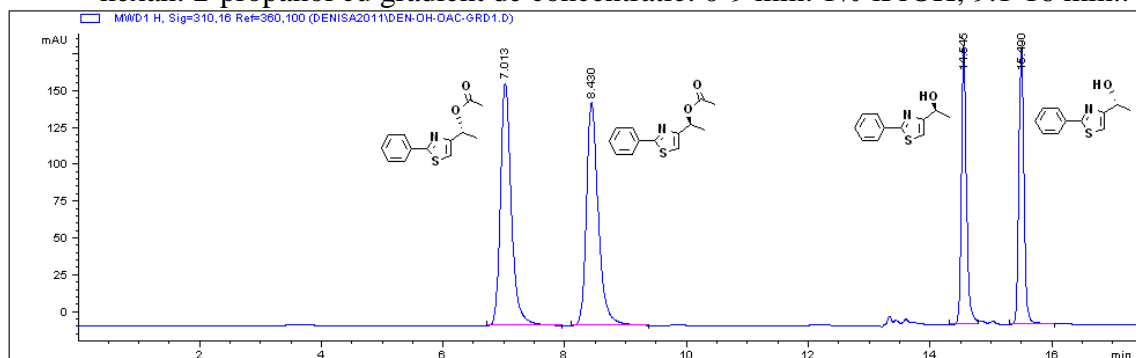
<sup>4</sup> c 1.0, CHCl<sub>3</sub>, t=25°C



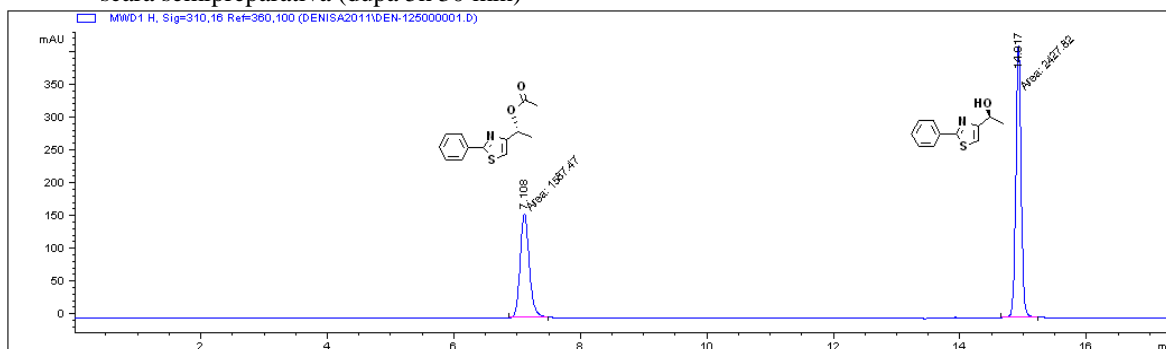
**Schema III.2.** Obținerea enantiomerilor etanolilor și acetatilor optic puri prin EKR a amestecurilor racemice mediate de lipaze B din *Candida antarctica*

Pentru monitorizarea EKR au fost elaborate metode cromatografice de analiza a amestecurilor de reactive pe coloane chirale adecvate. Pentru exemplificare sunt prezentate cateva cromatograme ale compusului nesubstituit, utilizat ca si compus model **5,6a**.

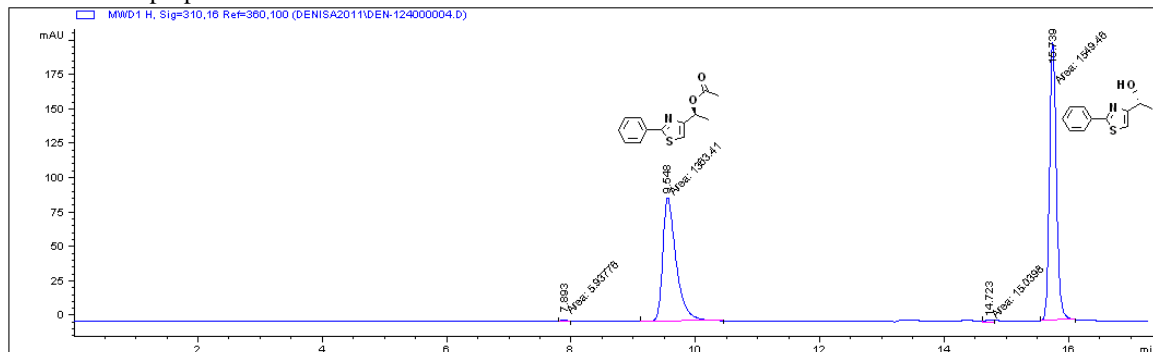
A. Cromatograma amestecului racemic al alcoolului si acetatului racemic (coloana Chiralpak IB, *n*-hexan: 2-propanol cu gradient de concentratie: 0-9 min: 1% iPrOH; 9.1-16 min.: 20% iPrOH).



B. Cromatograma amestecului obtinut la acilarea catalizata de CaL-B a etanolului racemic cu acetat de vinil in toluen la scara semipreparativa (dupa 5h 30 min)



C. Cromatograma amestecului obtinut la metanoliza catalizata de CaL-B a acetatului racemic in MTBE, la scara semipreparativa



## IV. Cercetari privind transferul si conversia substratului in procese cu enzime imobilizate<sup>4</sup>

### IVI. Profilul concentrației substratului în obținerea acidului 6-aminopenicilanic într-un bioreactor tip basket staționar cu penicilinamidaza imobilizată

Difuzia în interiorul fazei solide este importantă, în special în cazul biocatalizatorilor obținuți prin imobilizarea celulelor sau enzimelor în interiorul unor materiale suport inerte. Astfel, pentru a putea fi utilizat, substratul trebuie să migreze în interiorul fazei solide, printr-o serie de canale neliniare, către centrul de reacție, difuzia sa fiind caracterizată prin coeficientul de difuzie efectiv sau aparent.

Pentru stabilirea valorii și a distribuției concentrației substratului atât la interfața mediu-granulă de biocatalizator, cât și în interiorul granulei de biocatalizator, s-a considerat cazul obținerii acidului 6-aminopenicilanic prin scindarea enzimatică a penicilinei G sub acțiunea *penicilinamidazei* imobilizate în



Eupergit C. Astfel, pentru stabilirea modelului matematic care descrie procesul total de transfer de masă și conversie a substratului în prezența difuziei interne, se admit următoarele premise:

- cinetica procesului de obținere a acidului 6-aminopenicilanic este redată prin modelul propus de Warburton ș.a.[ Warburton D., Dunnill P., Lilly M. D., Conversion of benzylpenicillin to 6-aminopenicillanic acid in a batch reactor and continuous feed stirred tank reactor using immobilized penicillinamidase, *Biotechnol.Bioeng.* 15 (1973) 13-25], ulterior verificat de Bryjak și Noworyta [Bryjak J., Noworyta A., Kinetic behavior of penicillin acylase immobilized on acrylic carrier, *Bioproc. Eng.* 9 (1993) 37-42] și Illanes [Illanes A. (Ed.), *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*, Springer, 2008 ]:

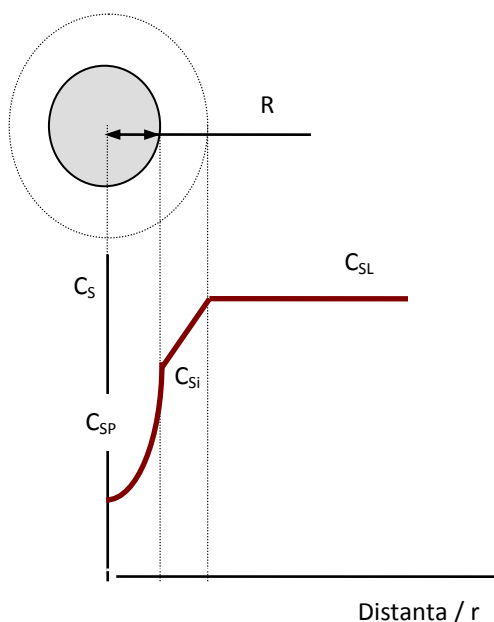
$$v_P = \frac{V \cdot C_S}{\left[ K_M \cdot \left( 1 + \frac{C_{S0} - C_S}{K_{iF}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{C_{S0} - C_S}{K_{iP}} \right) + C_S \cdot \left( 1 + \frac{C_{S0} - C_S}{K_{iP}} + \frac{C_S}{K_{iS}} \right) \right]} \quad (1)$$

Acest model este adecvat proceselor enzimactice discontinue și ține cont de efectele inhibitorii care intervin, respectiv inhibiții competitive induse de substrat și de acidul fenilacetic, precum și inhibiție necompetitivă generată de acidul 6-aminopenicilanic.

- enzima este distribuită uniform în particula biocatalizatorului
- nu există interacțiuni între substrat și produșii de reacție
- nu există interacțiuni între substrat și materialul de imobilizare
- difuzia internă a substratului este descrisă de legea lui Fick, fiind caracterizată de coeficientul efectiv de difuzie
- coeficientul efectiv de difuzie al substratului este independent de concentrația sa
- particula de biocatalizator este sferică.

Profilul concentrației penicilinei G este prezentat în figura IV1. În acest context, variația concentrației penicilinei G cu raza particulei de biocatalizator este redată de expresia:

$$\frac{dC_S}{dt} = D_{Se} \cdot \left[ \frac{1}{r^2} \cdot \frac{d}{dr} \left( r^2 \cdot \frac{dC_S}{dr} \right) \right] - \frac{V \cdot C_S}{\left[ K_M \cdot \left( 1 + \frac{C_{S0} - C_S}{K_{iF}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{C_{S0} - C_S}{K_{iP}} \right) + C_S \cdot \left( 1 + \frac{C_{S0} - C_S}{K_{iP}} + \frac{C_S}{K_{iS}} \right) \right]} \quad (2)$$



**Figura IV1.** Profilul concentrației substratului raportată la o granulă de biocatalizator.

Notațiile din figura IV1 și din ecuațiile (1) și (2) reprezintă:

$C_S$  - concentrația penicilinei G, mol/m<sup>3</sup>  
 $C_{S0}$  - concentrația inițială a penicilinei G, mol/m<sup>3</sup>  
 $D_{Se}$  - coeficientul efectiv de difuzie, m<sup>2</sup>/s  
 $K_{iF}$  - constanta de inhibiție a acidului fenilacetic, mol/m<sup>3</sup>  
 $K_{iP}$  - constanta de inhibiție a acidului 6-aminopenicilanic, mol/m<sup>3</sup>  
 $K_{iS}$  - constanta de inhibiție a penicilinei G, mol/m<sup>3</sup>  
 $K_M$  - constanta Michaelis-Menten, mol/m<sup>3</sup>  
 $r$  - distanța pe direcție radială în granula de biocatalizator, m  
 $V$  - viteza maximă de formare a produsului, mol/g.s

În condiții de staționaritate, se obține ecuația:

$$D_{Se} \cdot \left[ \frac{1}{r^2} \cdot \frac{d}{dr} \left( r^2 \cdot \frac{dC_S}{dr} \right) \right] = V \cdot C_C \cdot \left( \frac{K_{iS}}{K_{iS} + C_S} \right) \cdot \left( \frac{K_{iP}}{K_{iP} + Y_{P/S} \cdot C_S} \right) \quad (3)$$

respectiv, pentru consumul penicilinei G în interiorul granulei de biocatalizator:

$$\frac{d^2 C_{SP}}{dr^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{dC_{SP}}{dr} = \frac{V \cdot C_{SP}}{D_{Se} \cdot \left[ K_M \cdot \left( 1 + \frac{C_{S0} - C_{SP}}{K_{iF}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{C_{S0} - C_{SP}}{K_{iP}} \right) + C_{SP} \cdot \left( 1 + \frac{C_{S0} - C_{SP}}{K_{iP}} + \frac{C_{SP}}{K_{iS}} \right) \right]} \quad (4)$$

care pot fi rezolvate luându-se în considerare următoarele condiții de limită:

- 1)  $r = 0$  (centrul particulei de biocatalizator),  $\frac{dC_{SP}}{dr} = 0$
- 2)  $r = R_P$  (la suprafața particulei de biocatalizator),  $-D_{Se} \cdot \frac{dC_{SP}}{dr} = k_L \cdot (C_{SL} - C_{Si})$

unde:  $C_{Si}$  - concentrația penicilinei G la suprafața granulei de biocatalizator, mol/m<sup>3</sup>

$C_{SL}$  - concentrația penicilinei G în faza lichidă, mol/m<sup>3</sup>

$C_{SP}$  - concentrația penicilinei G în interiorul granulei de biocatalizator, mol/m<sup>3</sup>

$k_L$  - coeficientul de transfer de masă al penicilinei G prin filmul de lichid care înconjoară granula de biocatalizator, m/s.

În aceste condiții, profilul concentrației substratului în interiorul granulei de biocatalizator este descris de soluția ecuației (4):

$$C_{SP} = \frac{(C_{Si} - C_{SL}) \cdot R_P^3 \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2 \cdot \left( Bi \cdot e^{\frac{36D_{Se} \cdot r}{R_P^2 \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}} + K_{iP} \right) - 18 \cdot D_{Se} \cdot \left( Bi \cdot C_{SL} + e^{\frac{36D_{Se} \cdot r}{R_P^2 \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}} \right)}{36 \cdot D_{Se} \cdot Bi \cdot C_{SL} \cdot V \cdot \sinh \left( \frac{D_{Se}}{R_P \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2} \right) \cdot e^{\frac{18D_{Se}}{R_P \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}} + \frac{k_L \cdot \left[ \varphi \cdot (K_M + C_{SL}) - K_M \cdot R_P \right] \cdot \left( e^{\frac{36D_{Se} \cdot r}{R_P^2 \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}} + 1 \right)}{36 \cdot D_{Se} \cdot C_{SL} \cdot V \cdot \sinh \left( \frac{D_{Se}}{R_P \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2} \right) \cdot e^{\frac{18D_{Se}}{R_P \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}} + \frac{e^{\frac{D_{Se} \cdot (K_{iF} - K_{iP} + 2 \cdot C_{S0})}{R_P \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}}}{R_P^2 \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2} \cdot \left( 9 \cdot D_{Se} - Bi \cdot k_L \cdot \left[ \varphi \cdot (K_M + C_{SL}) + R_P \right] \right) \cdot \left( e^{\frac{36D_{Se} \cdot r}{R_P^2 \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}} + 1 \right)} \quad (5)$$

Concentrația penicilinei G la suprafața biocatalizatorului se poate calcula cu relația:

$$C_{Si} = C_{SL} + \frac{R_P^3 \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^3 - 18 \cdot D_{Se} - Bi \cdot k_L \cdot [\varphi \cdot (K_M + C_{SL}) - K_M \cdot R_P]}{k_L \cdot B_i \cdot C_{SL} \cdot V \cdot \sinh\left(\frac{D_{Se}}{R_P \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}\right) \cdot e^{\frac{18 D_{Se}}{R_P \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}}} + \frac{36 \cdot D_{Se}^2 \cdot e^{\frac{D_{Se}(K_{iF} - K_{iP} + 2 \cdot C_{S0})}{R_P \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}}}{k_L \cdot R_P^4 \cdot K_{iP}^2 \cdot K_{iF}^2 \cdot C_{SL}^4} \cdot \left\{ 9 \cdot D_{Se} - Bi \cdot k_L \cdot [\varphi \cdot (K_M + C_{SL}) + R_P] \right\} \cdot e^{\frac{36 D_{Se}}{R_P \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}} \quad (6)$$

Unul dintre parametrii care descrie măsura în care difuzia internă influențează viteza procesului este modulul Thiele,  $\varphi$ , definit în cazul scindării enzimatică a penicilinei G cu relația:

$$\varphi = \frac{R_P}{3} \cdot \frac{\sqrt{\frac{V}{2K_M \cdot D_{Se} \cdot \left[ \frac{C_{SL}}{K_M} - \ln\left(1 + \frac{C_{SL}}{K_M}\right)\right]}} \cdot \frac{C_{SL}}{K_M + C_{SL}}}{\quad} \quad (7)$$

Bi reprezintă criteriul Biot, definit ca măsură a importanței relative a rezistenței la difuzie a unui compus prin stratul limită de lichid de la suprafața unei particule comparativ cu difuzia internă în particulă. În cazul analizat, criteriul Bi se calculează cu expresia:

$$Bi = \frac{k_L \cdot R_P}{D_{Se}} \quad (8)$$

Cu ajutorul valorilor concentrațiilor la suprafața și în interiorul granulei de biocatalizator, se pot determina fluxurile masice ale penicilinei G prin mediu către biocatalizator și, respectiv, în interiorul acestuia. Pentru a se evita erorile care pot apărea ca rezultat al acumulării penicilinei G, acidului 6-aminopenicilanic și al acidului fenilacetic în stratul cilindric fix de biocatalizatori, calculele și determinările experimentale au fost efectuate doar pentru primul ciclu al scindării enzimatică.

Valorile parametrilor cinetici care intervin în expresiile anterioare sunt prezentate în tabelul 1, pentru sisteme discontinue cu *penicilinamidaza* imobilizată.

**Tabel IV1.** Valorile parametrilor cinetici.

V, mol/g.s	$K_M$ , mol/m <sup>3</sup>	$K_{iP}$ , mol/m <sup>3</sup>	$K_{iF}$ , mol/m <sup>3</sup>	$K_{iS}$ , mol/m <sup>3</sup>
2,83x10 <sup>-2</sup>	13	132	313	25

Astfel, **fluxul masic specific al glucozei prin stratul limită de lichid de la suprafața biocatalizatorilor**,  $n_L$ , se calculează cu expresia următoare:

$$n_L = k_L \cdot (C_{SL} - C_{Si}) \quad (9)$$

Coeфициentul individual de transfer de masă al substratului prin mediu se poate calcula cu ajutorul relației propuse de Perry și Chilton, adecvată stratului fix de biocatalizatori:

$$\frac{Sh}{Sc^{1/3} \cdot Re} = \frac{5,7}{Re_P^{0,78}} \quad (10)$$

( $Re_P$  - criteriul Re modificat pentru stratul fix de biocatalizatori) respectiv, explicitat:

$$\frac{k_L \cdot d_P \cdot \eta_L}{D_{SL} \cdot v_s \cdot \rho_L \cdot d_P} = 5,7 \cdot \left[ \frac{(1 - \phi) \cdot \eta_L}{v_s \cdot \rho_L \cdot d_P} \right]^{0,78} \quad (11)$$

unde:

$d_p$  - diametrul granulei de biocatalizator, m  
 $D_{SL}$  - coeficientul de difuzie al penicilinei G prin faza lichidă, m<sup>2</sup>/s  
 $v_s$  - viteza superficială a lichidului prin stratul de biocatalizator, m/s  
 $\phi$  - fracția volumică a biocatalizatorilor în stratul tip "basket", -  
 $\eta_L$  - viscozitatea lichidului, Pa.s  
 $\rho_L$  - densitatea lichidului, Kg/m<sup>3</sup>.

Relația directă simplificată de calcul a coeficientului de transfer de masă  $k_L$  va fi:

$$k_L = 5,7 \cdot \frac{(1 - \phi)^{0,78} \cdot \eta_L^{0,11} \cdot v_s^{0,22} \cdot D_{SL}^{2/3}}{\rho_L^{0,11} \cdot d_p^{0,78}} \quad (12)$$

Pentru calculul vitezei superficiale a lichidului prin stratul de biocatalizator, se considera curgerea radială schematizată în figura IV2.

În aceste condiții, viteza superficială se poate calcula cu relația:

$$v_s = \frac{Q_{RL}}{A} \quad (13)$$

în care:  $A$  - aria secțiunii de curgere a lichidului prin stratul de biocatalizatori, m<sup>2</sup>

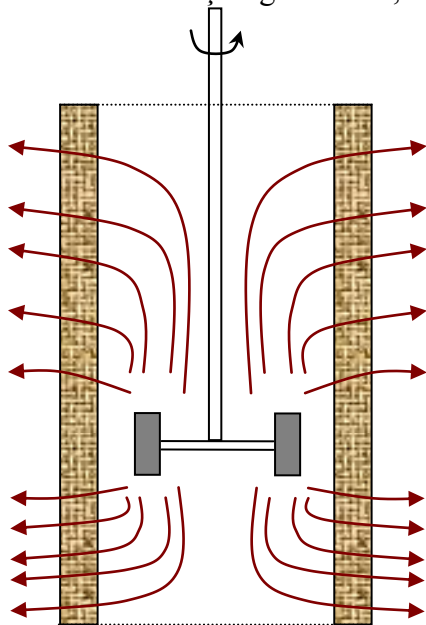
$Q_{RL}$  - debitul volumic radial de lichid, m<sup>3</sup>/s.

Pentru determinarea debitului de lichid, se consideră capacitatea de pompare a agitatorului. Astfel, în cazul agitatorului tip turbină Rashton, al cărui diametru respectă limitele  $0,2 < d/D < 0,5$  (în cazul bioreactorului utilizat în experimente,  $d/D = 0,41$ ), este valabilă relația:

$$\frac{Q_{RL}}{N \cdot d^3} = 0,75 \quad (14)$$

unde:  $d$  - diametrul agitatorului, m

$N$  - turația agitatorului, s<sup>-1</sup>.



**Figura IV2.** Profilul curgerii radiale generate de agitator prin stratul tip "basket".

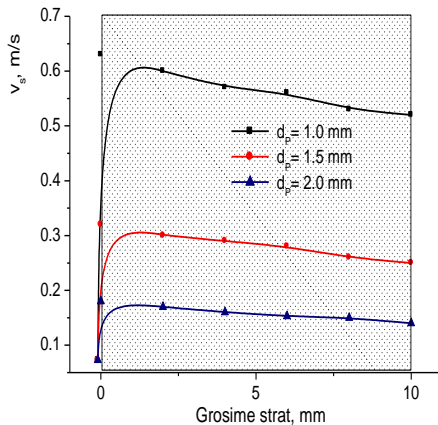
Secțiunea de curgere a lichidului prin stratul de biocatalizator se determină cu expresia următoare:

$$A = (1 - \phi) \cdot \pi \cdot H_c \cdot R_c \quad (15)$$

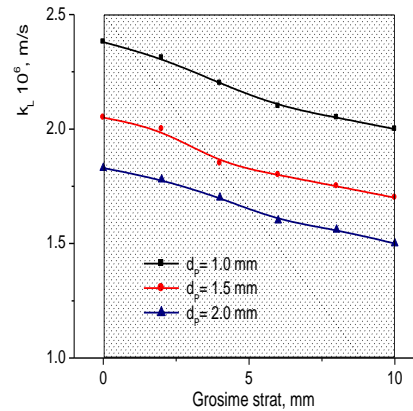
pentru care:  $H_c$  - înălțimea cilindrului tip “basket”, m

$R_c$  - raza suprafeței cilindrice de curgere, m ( $R_c$  variază între 4,5 și  $5,5 \times 10^{-2}$  m).

Variația vitezei superficiale a lichidului prin stratul de biocatalizator este redată în figura IV3, considerându-se debitul volumic radial constant pentru toate diametrele biocatalizatorilor. Indiferent de dimensiunea granulei de biocatalizator, viteza superficială în interiorul stratului este superioară celei din regiunea exterioară acestuia, fiind rezultatul reducerii inițiale a ariei secțiunii de curgere, la suprafața cilindrului interior, urmată de creșterea sa, dinspre zona interioară de curgere către cea exterioară.



**Figura IV3.** Variația vitezei superficiale în stratul cilindric de biocatalizatori.



**Figura IV4.** Variația coeficientului de transfer de masă  $k_L$  în stratul de biocatalizatori

Cea mai ridicată viteză superficială se atinge pentru cele mai mici granule de penicilinamidază imobilizată, datorită celei mai reduse fracții de goluri din strat (fracția volumică a biocatalizatorilor este  $\phi = 0,88$  pentru biocatalizatorii cu diametrul de 1 mm,  $\phi = 0,76$  pentru biocatalizatorii cu diametrul de 1,5 mm și, respectiv,  $\phi = 0,60$  pentru biocatalizatorii cu diametrul de 2 mm).

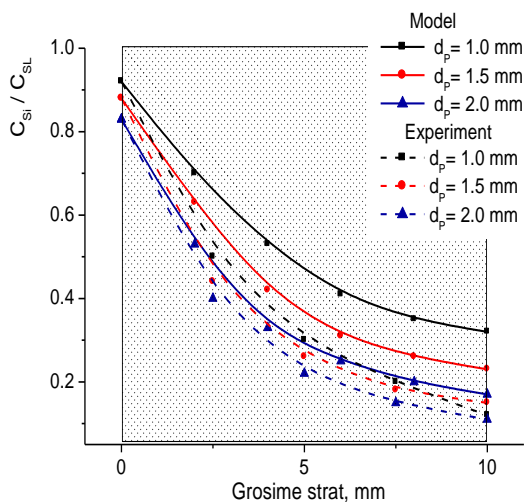
Cunoscându-se valoarea coeficientului de difuzie al penicilinei G prin faza lichidă ( $D_{SL} = 4 \times 10^{-10}$  m<sup>2</sup>/s), se poate calcula coeficientului de transfer de masă al substratului prin filmul de lichid de la suprafața granulelor de biocatalizator (figura IV4).

La modul general, figura IV4 indică reducerea  $k_L$  de la suprafața interioară a stratului tip “basket” către cea exterioară, în sensul reducerii vitezei superficiale, respectiv a turbulenței prin stratul de biocatalizator. Cele mai mari valori ale vitezei transferului de masă se obțin pentru cei mai mici biocatalizatori, datorită vitezelor superficiale mai ridicate prin stratul tip “basket”.

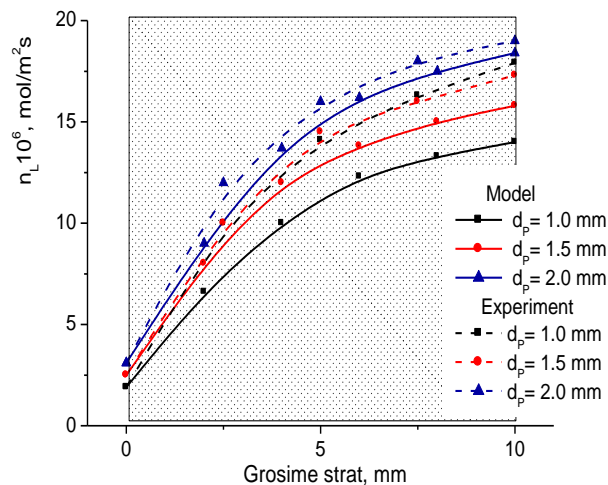
Conform figurii 5, în care este redată variația raportului dintre concentrația penicilinei G la suprafața granulei de biocatalizator și concentrația sa în faza lichidă cu grosimea stratului de biocatalizator, se constată că acest raport scade pe direcție radială, dinspre suprafața interioară a stratului tip “basket” către extremitatea acestuia.

Această variație este, pe de o parte, consecința reducerii vitezei transferului de masă al substratului prin filmul de lichid de la suprafața granulelor de biocatalizator pe aceeași direcție, iar pe de altă parte, a hidrolizei substratului de către enzimele imobilizate. Din figura IV5 se constată abateri destul de importante ale datelor experimentale comparativ cu cele obținute din calcul, abateri care se amplifică odată cu creșterea grosimii stratului și cu reducerea dimensiunii granulelor. Abaterile observate pot fi rezultatul unei rezistențe crescute la transferul de masă al substratului prin stratul de biocatalizatori, datorită difuziei acestuia prin spațiile libere dintre granule, spații de dimensiuni reduse (în acest caz, apare o etapă suplimentară de difuzie în stratul tip fix “basket” de biocatalizatori). La acest efect se adaugă conversia mai avansată a penicilinei G pe măsura înaintării în strat, deoarece se reduce viteza

superficială și, implicit crește timpul de staționare într-o anumită regiune. În același timp, există posibilitatea apariției unei curgeri inverse prin strat, datorită spațiilor înguste de curgere a fazei lichide, care mărește suplimentar timpul de staționare.



**Figura IV5.** Variația raportului  $C_{Si}/C_{SL}$  în stratul de biocatalizatori.



**Figura IV6.** Variația fluxului masic al penicilinei G prin filmul de lichid de la suprafața granulelor de enzimă imobilizată în stratul de biocatalizatori

Fenomenele menționate sunt mai pronunțate în cazul stratului tip “basket” cu granule având diametrul de 1 mm, datorită celei mai reduse fracții de goluri din strat.

Pe baza rezultatelor anterioare, teoretice și reale, și utilizându-se ecuația (9), s-au calculat valorile fluxului masic al penicilinei G prin stratul limită de lichid de la suprafața biocatalizatorilor. Variația acestui parametru în stratul tip “basket” pe direcție radială este redată în figura IV6.

Această figură evidențiază evoluția contrară a fluxului masic față de coeficientul de transfer de masă al penicilinei G, ceea ce sugerează faptul că transferul substratului prin filmul de lichid nu este controlat de coeficientul său de difuzie, ci de gradientul său de concentrație dintre lichid și suprafața granulei. Hidroliza mai rapidă a penicilinei G de către *penicilinamidaza* imobilizată a indus mărirea acestui gradient odată cu creșterea distanței pe direcție radială în interiorul stratului fix, fenomen sugerat și în figura 5.

Abaterile observate între valorile fluxului masic determinate cu valorile concentrațiilor penicilinei G calculate cu ajutorul modelului propus și cele experimentale se accentuează odată cu creșterea grosimii stratului și cu reducerea diametrului granulelor de biocatalizator, ca efect al creșterii accentuate a gradientului de concentrație al substratului, conform celor discutate anterior (valorile reale ale fluxului masic sunt superioare celor teoretice). De fapt, modelul se suprapune cel mai bine doar cu variația fluxului masic pentru cele mai mari granule.

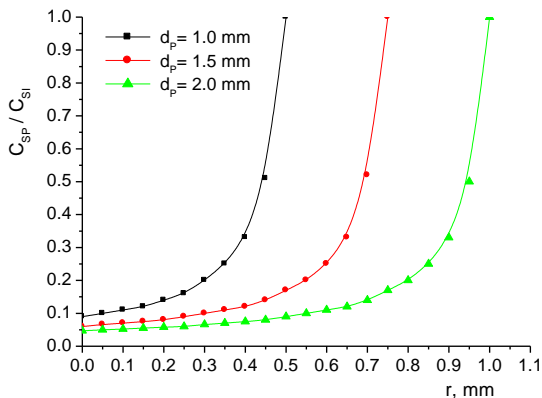
**Fluxul masic specific al glucozei prin granula de biocatalizator**,  $n_p$ , se poate calcula cu ajutorul legii lui Fick:

$$n_p = -D_{Se} \cdot \frac{dC_{SP}}{dr} \quad (16)$$

Prin derivarea ecuației (5) și înlocuire în ecuația (16), se obține expresia fluxului masic specific:

$$n_p = \frac{Bi \cdot k_L \cdot [\varphi \cdot (K_M + C_{SL}) - K_M \cdot R_P] + 18 \cdot D_{Se} - (C_{Si} - C_{SL}) \cdot R_P^3 \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}{Bi \cdot C_{SL} \cdot V \cdot \sinh\left(\frac{D_{Se}}{R_P \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}\right) \cdot e^{\frac{18 \cdot D_{Se} \cdot (2 \cdot R_P - r)}{R_P^2 \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}} - \frac{D_{Se} \cdot (K_{iF} - K_{iP} + 2 \cdot C_{S0})}{R_P \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2} \cdot \frac{36 \cdot D_{Se}^2 \cdot e^{\frac{36 \cdot D_{Se} \cdot r}{R_P^2 \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}}}{R_P^4 \cdot K_{iP}^2 \cdot K_{iF}^2 \cdot C_{SL}^4} \cdot \{9 \cdot D_{Se} - Bi \cdot k_L \cdot [\varphi \cdot (K_M + C_{SL}) + R_P]\} \cdot e^{\frac{36 \cdot D_{Se} \cdot r}{R_P^2 \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}} \quad (17)$$

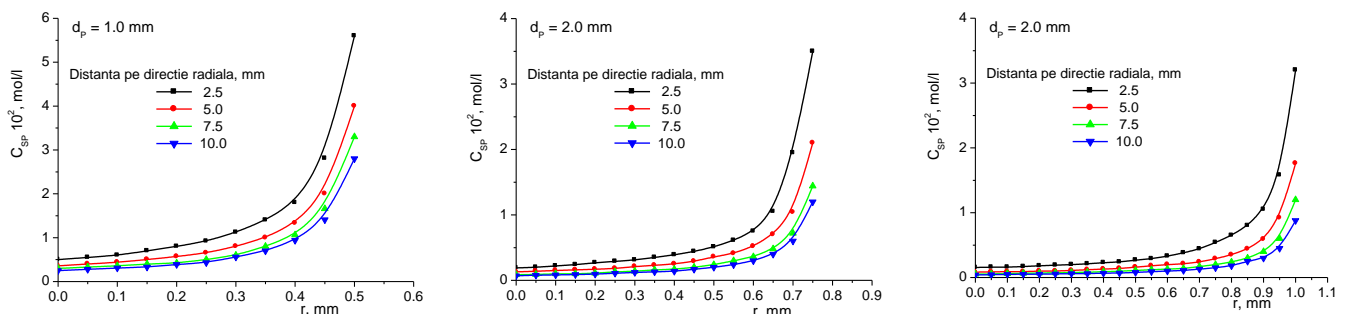
Pentru redarea influenței difuziei interne în granula de biocatalizator asupra concentrației interne a penicilinei G, s-a reprezentat inițial variația raportului dintre concentrațiile interioară și superficială ale acestui substrat,  $C_{SP} / C_{Si}$  cu raza granulei. În acest sens, din figura IV7 se observă că, indiferent de mărimea granulelor, raportul concentrațiilor se reduce semnificativ odată cu apropierea de centrul particulei.



Amplitudinea acestei reduceri crește cu diametrul granulei. Astfel, raportul concentrațiilor se reduce de la 1, la suprafața granulelor, la 0,09 în centrul granulei pentru biocatalizatori cu diametrul de 1 mm, la 0,06 pentru biocatalizatori cu diametrul de 1,5 mm, respectiv la 0,047 pentru cei mai mari biocatalizatori. Această variație nu este influențată de poziția din interiorul stratului fix tip “basket”.

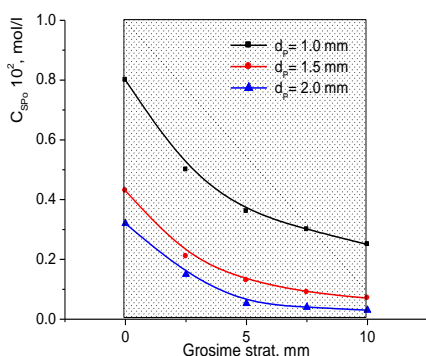
**Figura IV7.** Variația raportului  $C_{SP}/C_{Si}$  cu distanța de la centrul particulei de biocatalizator.

În aceste condiții, în funcție de concentrația substratului la suprafața granulei, de poziția pe direcție radială în interiorul stratului, respectiv de viteza reacției de hidroliză enzimatică a penicilinei G, concentrația substratului în centrul granulei,  $C_{SP0}$ , poate avea o valoare foarte redusă comparativ cu cea din lichid, ceea ce reprezintă o importantă amenințare la desfășurarea normală a procesului (figurile IV8 și IV9).



**Figura IV8.** Variația concentrației substratului cu distanța de la centrul particulei de biocatalizator.

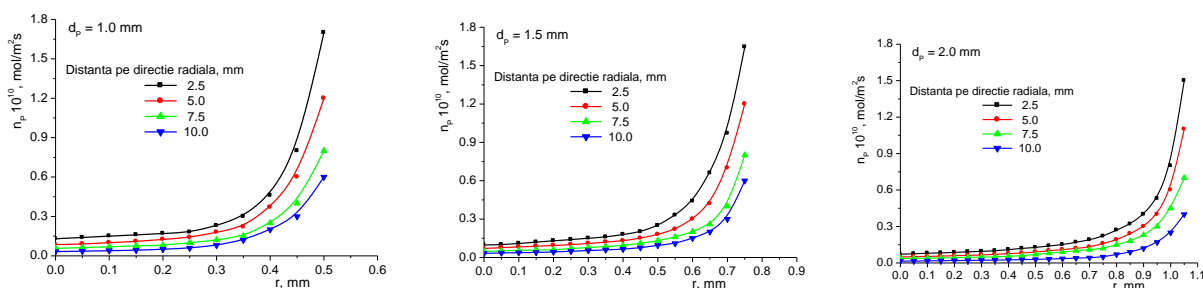
Figura IV8 indică un efect mai pronunțat al difuziei în granulă asupra concentrației interne a penicilinei G, ca rezultat direct al reducerii concentrației sale la suprafața biocatalizatorilor datorită rezistenței opuse la transferul său în interiorul stratului cilindric și al consumului său simultan cu difuzia.



**Figura IV9.** Variația concentrației substratului în centrul granulei de alginat,  $C_{Sp0}$ , în stratul de biocatalizatori.

După cum se poate constata din figura IV9, aceste fenomene sunt mai importante pentru granulele cu dimensiunea cea mai mare, consecință a rezistenței crescute la difuzia internă și a unei conversii superioare a reacției de hidroliză a penicilinei G sub acțiunea *penicilinamidazei* imobilizate. Practic, în cazul granulelor cu diametrul de 2 mm, valoarea minimă a concentrației penicilinei G în centrul granulei de biocatalizatori se atinge la jumătatea grosimii stratului fix tip “basket”.

Cu ajutorul ecuației (17) s-au calculat valorile fluxului masic specific al substratului în interiorul particulei de biocatalizator. Variațiile acestui flux cu raza biocatalizatorului și cu grosimea stratului tip “basket” sunt prezentate în figura IV10. Coeficientul de difuzie efectiv al penicilinei G prin granulă are valoarea  $D_{Se} = 8,27 \times 10^{-12}$  m<sup>2</sup>/s.

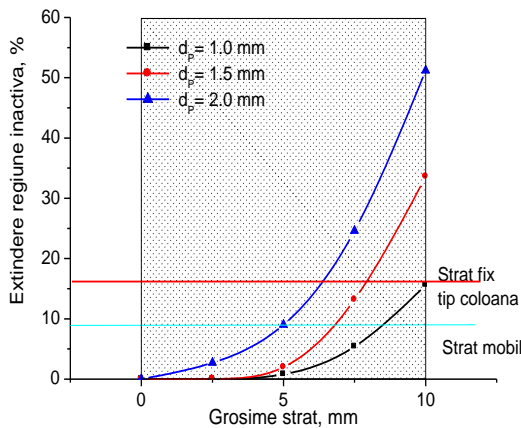


**Figura IV10.** Variația fluxului masic intern al substratului cu distanța de la centrul particulei de biocatalizator.

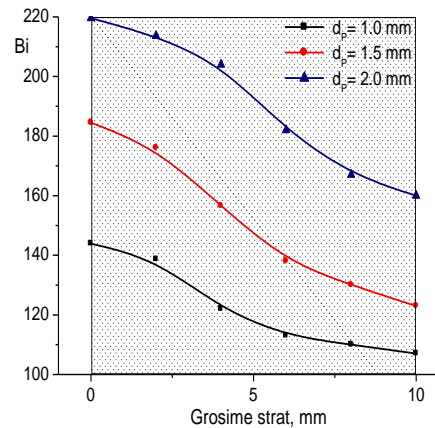
Prin compararea valorilor fluxului masic al substratului în interiorul particulelor de biocatalizator cu cele ale fluxului masic prin filmul de lichid de la suprafața acestor particule, se observă valori de circa  $10^5$  ori mai mici ale fluxului masic intern. În același timp, figura IV10 sugerează reducerea semnificativă a fluxului masic intern al penicilinei G către centrul granulei de biocatalizator, fenomen care se accentuează odată cu apropierea de suprafața exterioară a stratului tip “basket”, în același sens cu reducerea concentrației substratului la suprafața granulei de biocatalizator.

Variația fluxului masic intern al penicilinei G cu raza particulei indică faptul că este posibil ca fluxul masic în apropierea centrului particulei să atingă valori foarte mici, valori ce pot fi neglijate. Prin similitudine cu procesele fermentative care folosesc celule microbiene imobilizate, regiunea care corespunde acestor valori poate fi considerată o regiune „inactivă din punct de vedere enzimatic”. Dacă se consideră ca referință ordinul de mărime al coeficientului efectiv de difuzie în interior granulei, se poate admite că o astfel de regiune inactivă se caracterizează printr-un flux masic intern inferior valorii de  $1 \times 10^{-11}$  mol/m<sup>2</sup>s. În acest context, conform figurii IV11, extinderea „regiunii inactivă enzimatic” variază între 0 (pentru cele mai mici granule, în vecinătatea suprafeței interioare a stratului tip „basket”) și 51% (pentru cele mai mari granule, situate la suprafața exterioară a stratului tip „basket”) din volumul total al particulei.





**Figura IV11.** Variatia extinderii relative a "regiunii inactiva enzimatic" pe directie radiala in stratul de biocatalizatori.



**Figura IV12.** Variatia criteriului Biot pe directie radiala in stratul de biocatalizatori.

Extinderea regiunii inactiva creste semnificativ pe directie radiala, devenind, catre suprafata exterioara a stratului tip „basket”, de pana la 5 de ori mai mare decat in cazul straturilor mobile de biocatalizatori. Practic, numai pana la o distanta de circa 50% din totalul grosimii stratului fix volumul acestei regiuni este comparabil cu cel corespunzator stratului mobil. Comparativ cu un bioreactor tip coloana cu strat fix de enzime immobilizate, extinderea acestei regiuni este mai mica pentru intreg stratul tip „basket” pentru biocatalizatorii cu diametrul de 1 mm, in primii 75% din totalul adancimii in strat pe directie radiala pentru biocatalizatorii de dimensiune intermediara, respectiv in primii 60% din totalul adancimii in strat pe directie radiala pentru cei mai mari biocatalizatori.

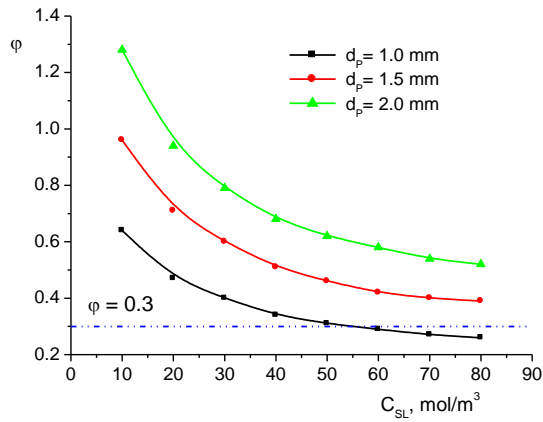
Conform celor prezentate anterior, criteriul Bi cuantifica importanta relativa a proceselor de difuzie externa si interna a substratului (ecuatia (8)). Din figura IV12 se observa ca acest criteriu scade, la modul general, pe directie radiala, datorita dependentei directe dintre acest criteriu si coeficientul de transfer de masa  $k_L$ .

Comparand valorile medii ale criteriului Biot din strat corespunzatoare fiecarei dimensiuni a biocatalizatorilor ( $Bi = 122,4$  pentru granulele de 1 mm,  $Bi = 151,3$  pentru cele de 1,5 mm,  $Bi = 191$  pentru cele de 2 mm), se constata cresterea acestora odata cu dimensiunea granulelor de *penicilinamidaza* immobilizata, datorita amplificarii importantei relative a rezistentei la difuzia interna a penicilinei G.

#### **IV2. Studiul influentei difuziei interne a substratului asupra vitezei de conversie enzimatică a acestuia**

Conform celor mentionate mai sus, modulul Thiele descrie modul in care difuzia interna influenteaza procesul enzimatic de hidroliza a penicilinei G, fiind calculat cu relatia (7). Valoarea modulului Thiele variaza pe parcursul procesului enzimatic, fiind dependent de concentratia penicilinei G din faza lichida si de dimensiunea granulei de biocatalizator (figura IV13).

Conform datelor din literatura referitoare la implicatiile difuziei interne in procesul de hidroliza enzimatică a penicilinei G cu *penicilinamidaza* immobilizata, valori ale modulului Thiele mai mari decat 0,3 indica o limitare severa a procesului datorita difuziei interne. Datele reprezentate in figura IV13 sugereaza faptul ca rezistenta datorata difuziei interne devine accentuata odata cu reducerea concentratiei penicilinei G din mediu, magnitudinea sa devenind mai importanta pentru granulele de biocatalizatori de dimensiune mai mare. Pentru cele mai mici granule de *penicilinamidaza* immobilizata si concentratii ale substratului peste  $50 \text{ mol/m}^3$ , hidroliza enzimatică a penicilinei G nu este controlata de difuzia in granula de biocatalizator.



**Figura IV13.** Variația modului Thiele cu concentrația penicilinei G.

În același timp, pentru redarea cât mai exactă a efectului generat de difuzia internă asupra conversiei enzimatice a substratului, se utilizează factorul  $\lambda$ , definit ca raportul dintre viteza reacției enzimatice în prezența difuziei interne și viteza aceleiași reacții în absența difuziei interne în granula de biocatalizator.

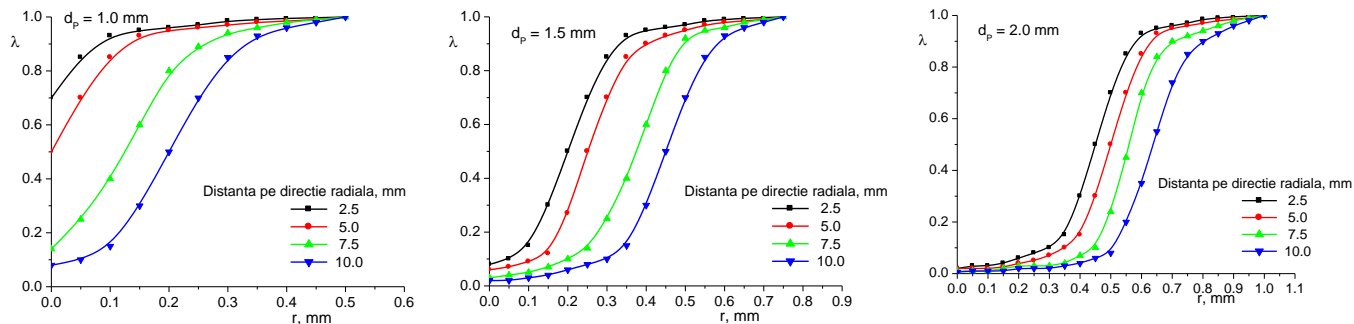
În condiții de staționaritate, se poate considera că viteza reacției enzimatice în interiorul biocatalizatorilor este egală cu viteza internă de difuzie a penicilinei G. Astfel, în cazul specific al sistemului studiat, relația de calcul a factorului  $\lambda$  devine:

$$\lambda = \frac{4\pi \cdot R_p^2 \cdot D_{Se} \cdot \frac{dC_{SP}}{dr} \Big|_{r=R_p}}{\frac{4}{3}\pi \cdot R_p^3 \cdot \left[ K_M \cdot \left( 1 + \frac{C_{S0} - C_{SL}}{K_{iF}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{C_{S0} - C_{SL}}{K_{iP}} \right) + C_{SL} \cdot \left( 1 + \frac{C_{S0} - C_{SL}}{K_{iP}} + \frac{C_{SL}}{K_{iS}} \right) \right]} \quad (18)$$

Utilizarea relației (5) și efectuarea simplificărilor conduc la următoarea expresie:

$$\lambda = \frac{D_{Se}}{R_p \cdot V \cdot C_{SP}} \cdot \left[ \frac{(C_{Si} - C_{SL}) \cdot R_p^3 \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2 - Bi \cdot k_L \cdot [\varphi \cdot (K_M + C_{SL}) - K_M \cdot R_p] - 18 \cdot D_{Se}}{B_i \cdot C_{SL} \cdot V \cdot \sinh\left(\frac{D_{Se}}{R_p \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}\right) \cdot e^{\frac{18 \cdot D_{Se}}{R_p \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}}} + \frac{36 \cdot D_{Se}^2 \cdot e^{\frac{D_{Se}(K_{iF} - K_{iP} + 2 \cdot C_{S0})}{R_p \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}}}{R_p^4 \cdot K_{iP}^2 \cdot K_{iF}^2 \cdot C_{SL}^4} \cdot \{9 \cdot D_{Se} - Bi \cdot k_L \cdot [\varphi \cdot (K_M + C_{SL}) + R_p]\} \cdot e^{\frac{36 \cdot D_{Se}}{R_p \cdot K_{iP} \cdot K_{iF} \cdot C_{SL}^2}} \right] \cdot \left[ K_M \cdot \left( 1 + \frac{C_{S0} - C_{SL}}{K_{iF}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{C_{S0} - C_{SL}}{K_{iP}} \right) + C_{SL} \cdot \left( 1 + \frac{C_{S0} - C_{SL}}{K_{iP}} + \frac{C_{SL}}{K_{iS}} \right) \right] \quad (19)$$

Variația factorului  $\lambda$  în interiorul particulei de biocatalizator este prezentată grafic în figura IV14. Din analiza alurii dependențelor obținute pentru fiecare mărime a granulelor de *penicilinamidază* imobilizată se poate concluziona că, indiferent de poziția pe direcție radială în interiorul stratului fix, factorul  $\lambda$  variază lent în apropierea suprafeței și centrului granulelor. În apropierea suprafeței granulelor de biocatalizator, concentrația mai ridicată a substratului, apropiată de cea superficială, conduce la valori ale factorului  $\lambda$  apropiate de 1.

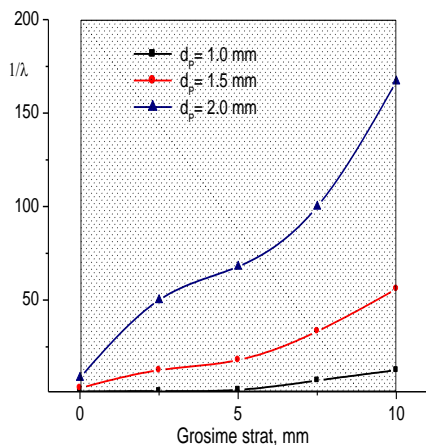


**Figura IV13.** Variația factorului  $\lambda$  cu distanța de la centrul particulei de biocatalizator, pentru diferite poziții pe direcție radială în stratul de biocatalizator.

Astfel, grosimea acestei regiuni superficiale a granulelor se reduce pe măsura creșterii grosimii stratului cilindric, datorită reducerii concentrației superficiale a penicilinei G și, implicit, al unei reduceri mai accentuate a concentrației sale pe direcție radială. Variația lentă a factorului  $\lambda$  în regiunea centrală a granulelor se datorează menținerii unui nivel constant redus al concentrației substratului în această regiune. În acest caz, grosimea stratului corespunzătoare reducerii factorului  $\lambda$  până la o valoare care se menține relativ constantă se extinde odată cu creșterea diametrului granulelor și cu pătrunderea pe direcție radială în stratul fix tip “basket” și, datorită reducerii mai accentuate a concentrației penicilinei G în granulă, în directă dependență cu valoarea sa din strat.

Datorită celor menționate mai sus, cea mai puțin pronunțată reducere a factorului  $\lambda$  se obține pentru granulele de biocatalizator cu diametrul de 1 mm, în primii 5 mm ai stratului tip “basket” (regiune în care concentrația penicilinei G este mai apropiată de cea din faza lichidă exterioară stratului fix).

Pe baza acestor rezultate se poate afirma că prin imobilizarea *penicilinamidazei* [i dispunerea biocatalizatorilor astfel obținuți într-un strat fix tip “basket”, viteza reacției enzimice de obținere a acidului 6-aminopenicilanic scade considerabil, de  $1/\lambda$  ori comparativ cu viteza reacției corespunzătoare sistemului conținând enzima liberă. Magnitudinea acestui efect este corelată cu dimensiunea și poziția granulelor în interiorul stratului fix. În acest sens, din motivele discutate anterior, în centrul granulelor, parametrul  $1/\lambda$  crește de la suprafața interioară a cilindrului la cea exterioară de circa 12 ori pentru cele mai mici granule, de 18 ori pentru granulele cu diametrul intermediar și de 22 ori pentru cele mai mari granule (figura IV14).



**Figura IV14.** Variația parametrului  $1/\lambda$  în centrul biocatalizatorilor pe direcție radială în stratul de biocatalizatori.

Se observă din nou influența redusă a difuziei interne asupra procesului global de transfer de masă și scindare enzimatică a penicilinei G în cazul celor biocatalizatorilor cu cea mai mică dimensiune, plasați în prima jumătate a stratului fix cilindric.

Amplitudinea efectului de reducere a vitezei reacției enzimice de hidroliză a penicilinei G crește de până la 4 ori comparativ cu aceiași biocatalizatori, însă în strat mobil, în condiții similare de operare a bioreactorului. Datorită unei influențe mai semnificative a difuziei interne, reducerea maximă a vitezei procesului enzimatic s-a înregistrat pentru granulele de 2 mm diametru.

## V. DISEMINAREA REZULTATELOR CERCETĂRII AFERENTE ETAPEI DIN ANUL 2013

Rezultatele obtinute au fost diseminate prin publicarea a trei articole stiintifice [1-3], acceptarea celui de-al patrulea [4] si trimiterea spre publicare a inca unui articol [5], **factor de impact cumulat 8.087, scor relativ de influenta cumulat 3.741.**

1. Chiş, L.; Hriscu, M.; Bica, A.; Toşa, M.; Nagy, G.; Róna, G.; Vértessy, B.; Irimie, F.D.: Molecular cloning and characterization of a thermostable esterase/lipase produced by a novel *Anoxybacillus flavithermus* strain, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2013**, *59*, 119–134 (IF 0.98, SRR 0.633).

2. Hara, P.; Turcu, M.C.; Sundell, R.; Toşa, M.; Paizs, C.; Irimie, F.D.; Kanerva, L.: Lipase-catalyzed asymmetric acylation in the chemoenzymatic synthesis of furan-based alcohols, *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 142–150 (IF 2.823, SRR 0.951).

3. Hapău, D.; Brem, J.; Moişă, M.; Toşa, M.; Irimie, F.D.; Zaharia, V.: Heterocycles 32. Efficient kinetic resolution of 1-(2-arylthiazol-4-yl)ethanols and their acetates using lipase B from *Candida antarctica*, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2013**, *94*, 88-94 (IF 2.115, SRR 1.266).

4. Anca-Irina Galaction, Ramona Mihaela Matran, Marius Turnea, Alexandra Cristina Blaga, Dan Caşcaval (2013): Engineering aspects of Penicillin G transfer and conversion to 6-Aminopenicillanic acid in bioreactor with mobile bed of immobilized penicillin amidase, *Chem. Eng. Commun.* in press (IF: 1,052, SRR 0.749).

5. Ramona Mihaela Matran, Anca-Irina Galaction, Alexandra Cristina Blaga, Marius Turnea, Dan Caşcaval (2013): Green technology for 6-aminopenicillanic acid production - study of Penicillin G hydrolysis in a bioreactor with mobile bed of immobilized penicillin amidase under substrate inhibition, *Environ. Eng. Manag. J.* *12(11)*, 2261-2266 (IF: 1,117; SRR 0,142)

În afara rezultatelor diseminate prin publicare, datele obţinute în urma investigaţiilor experimentale originale proprii etapei derulate în anul 2013 au fost incluse în:

- **4 participări (postere și comunicări) la manifestări știintifice**

1. Anca-Irina Galaction, Dan Caşcaval, Alexandra Cristina Blaga, Ramona Mihaela Matran, Maria Filibiu: Bioreactor of basket type for immobilized biocatalysts, *Salonul de Inventica CHIM-INVENT*, 3-5 Iulie 2013, Iasi, Romania (comunicare orală).

2. Anca-Irina Galaction, Alexandra Cristina Blaga, Ramona Mihaela Matran, Marius Turnea, Dan Caşcaval: Influence of external and internal diffusion on lipids biodegradation in a bioreactor with mobile bed of immobilized *Bacillus* spp. cells, *7<sup>th</sup> International Conference on Environmental Engineering and Management-Integration Challenges for Sustainability*, 18-21 September 2013, Vienna, Austria (poster cu prezentare orală de circa 5 minute).

3. Dan Caşcaval, Lenuța Kloetzer, Maria Filibiu, Marius Turnea, Anca-Irina Galaction: Production of succinic acid in basket and mobile bed bioreactors - „green” alternative to the chemical technology, *7<sup>th</sup> International Conference on Environmental Engineering and Management-Integration Challenges for Sustainability*, 18-21 September 2013, Vienna, Austria (poster cu prezentare orală de circa 5 minute).

4. Madalina Moisa, Csaba Paizs, Florin Dan Irimie, Monica Ioana Tosa: Unnatural amino acids stereoselective enzymatic synthesis, *13<sup>th</sup> Symposium and Summer School on Bioanalysis (13<sup>th</sup> ISSSB)*, 27-7 July 2013, Debrecen, Hungary (poster cu prezentare orală de circa 5 minute)

- **Medalia de Aur la Salonul de Inventică CHIM-INVENT, Iași, pentru lucrarea:**

Anca-Irina Galaction, Dan Caşcaval, Alexandra Cristina Blaga, Ramona Mihaela Matran, Maria Filibiu: Bioreactor of basket type for immobilized biocatalysts, *Salonul de Inventica CHIM-INVENT*, 3-5 Iulie 2013, Iasi, Romania.

**IN CONCLUZIE, APRECIEM CA OBIECTIVELE ACESTEI ETAPE A PROIECTULUI AU FOST ATINSE IN TOTALITATE, APRECIERE SUSTINUTA DE PRODUCTIA STIINTIFICA DIN ACEST AN A ECHIPEI DE CERCETARE A CONSORTIULUI IMPLICAT UN REALIZAREA PROIECTULUI si de investitiile in echipamente de 66.890,74 lei, adica 14.38% din finantarea pe acest an.**

**Conf. Dr. Ing. Monica Ioana TOSA**