

RAPORTUL ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC

**DEZVOLTAREA UNOR BIOCATALIZATORI NOI PENTRU  
OBȚINEREA ECONOMICĂ A UNOR SINTONI CHIRALI  
SYNBIOCAT**

**Programul:** Parteneriate în domenii prioritare  
**Acronim proiect:** SYNBIOCAT  
**Contract nr:** 124/2012

**ETAPA 2014**

- I. Bioprocese difuzionale la scara de laborator realizate cu biocatalizatori imobilizați**
- II. Metodologie chemoenzimatică pentru obținerea celor doi enantiomeri ai Bufuralolului, medicament cardiovascular cu activitate  $\beta$ -blocanta**

**1. OBIECTIVE GENERALE - REZUMATUL ETAPEI**

Cercetările programate în acest an de derulare a proiectului au vizat aspectele difuzionale ale bioconversiei unui substrat de către enzime și celule imobilizate (difuzia externă a substratului, difuzia internă a acestuia, influența difuziei asupra vitezei reacției biochimice desfășurate în interiorul granului de biocatalizator, comparații între diferite tipuri de bioreactoare care conțin biocatalizatori imobilizați).

Experimentele s-au realizat pentru sisteme enzimatic și fermentative cu potențial economic important (obținerea acidului succinic). Configurațiile straturilor de biocatalizatori imobilizați nu au mai fost folosite în aceste procese (strat mobil de biocatalizatori, strat fix tip „basket”), fiind asociate cu bioreactoare de construcție specială. Rezultatele obținute au fost analizate comparativ cu cele corespunzătoare sistemului clasic de obținere a acidului succinic prin biosinteză, evidențiind îmbunătățirea performanțelor acestor bioprocese.

Cel de-al doilea aspect abordat în această etapă a fost utilizarea biocatalizatorilor, inclusiv a celor imobilizați, în sinteza unor molecule cu impact farmacologic, în stare enantiopură.

**2. ASPECTE DIFUZIONALE ALE OBȚINERII ACIDULUI SUCCINIC ÎNTR-UN BIOREACTOR CU STRAT MOBIL DE CELULE IMOBILIZATE DE *Actinobacillus succinogenes***

Acidul succinic, numit și acid butandioic, este un acid dicarboxilic cu numeroase aplicații în industria chimică (reactivi, polimeri biodegradabili, solvenți verzi, cerneluri), în agricultură (pesticide, factori de creștere, stimulatori), în industria farmaceutică și alimentară (aminoacizi, antibiotice, surfactanți, vitamine și aditivi).

La nivel industrial, în prezent, acidul succinic se obține utilizând drept materie primă butanul din gazul petrolier lichiefiat, prin intermediul anhidridei maleice. Costul obținerii prin sinteză a acestui acid variază între 5,9 -9 \$/kg, în funcție de puritate, aportul materiei prime la acesta fiind de 1,03 \$/kg acid succinic. În afara dificultății etapelor de separare și purificare a acestui acid, utilizarea tehnologiilor de sinteză chimică creează probleme serioase privind protecția mediului ambiant.

Conceptul de biotehnologie albă a fost introdus cu ocazia Conferinței Internaționale “European Bioperspectives - En Route to a Knowledge-Based Bio-Economy” (Cologne, Germany, 31 mai – 1 iunie 2007), afirmând prioritatea folosirii de materiale regenerabile pentru producția de diverse chimicale prin procese biotehnologice ieftine și care protejează mediul înconjurător. Ținând cont de aceste cerințe, în ultimii ani a crescut interesul de a crea tehnologii de obținere a acidului succinic pe cale fermentativă cu costuri reduse. Astfel, au fost studiate numeroase microorganisme cu potențial producător de acid succinic raportate în literatură: bacterii (*Veillonella parvula*, *Selenomonas ruminatum*, *Succinoclasticus ruminis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Enterococcus faecalis*, *Actinobacillus succinogenes*, *Actinobacillus succiniproducens*, *Mannheimia succiniproducens*, *Escherichia coli*), drojdiile (*Saccharomyces cerevisiae*) și fungi (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Byssoschlamys nivea*, *Lentinus degener*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium viniferum*).

Dar, fie datorită randamentului scăzut de bioconversie a substratului în acid succinic, fie a reologiei newtoniene și a compoziției complexe a mediului de cultură final, numai tulpinile de *Actinobacillus succinogenes* și *Actinobacillus succiniproducens* au fost considerate producători importanți de acid succinic. Aceste microorganisme posedă abilitatea de a converti diverse surse de carbon în acid succinic și alți acizi secundari (acizii formic, acetic, piruvic). Tulpina de *A. succinogenes* a fost cultivată pe medii conținând ca substrat glucoză, zaharoză, melasă, glicerină, amidon, hidrolizate celulozice sau subproduse de morărit.

Majoritatea sistemelor de fermentație pentru obținerea acidului succinic au utilizat celule libere de *Actinobacillus succinogenes*, procesul putând fi afectat de fenomene de inhibiție de substrat și produs. Nu există date în literatură cu privire la utilizarea *A. succinogenes* sub formă imobilizată, cu excepția informațiilor despre creșterea acestei bacterii sub formă de biofilm pe suporturi inerte de materiale compozite. Însă, formarea biofilmului nu poate contracara efectele inhibitorii.

În acest context, studiile efectuate în cadrul proiectului au realizat o analiză comparativă a obținerii acidului succinic cu celule libere și celule imobilizate în alginat, în strat mobil și fix de tip “basket”. De asemenea, pentru

sistemul cu celule bacteriene imobilizate și în condiții de inhibiție de substrat și de produs, au fost investigate transferul de masă al substratului în exteriorul și în interiorul granulei de biocatalizator, evidențiindu-se implicarea difuziei interne în desfășurarea acestui proces.

Obținerea acidului succinic prin fermentație cu strat mobil de *Actinobacillus succinogenes* imobilizat în alginat s-a realizat în bioreactoare anaerobe (figura 1) cu capacitatea de 100 ml (80 ml volum util) simultan, fiecare conținând 54 ml mediu cu următoarea compoziție (pe litru): glucoza 30 g; extract de drojdie 5 g;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,16 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,31 g;  $\text{NaCl}$  1,0 g;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,2 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,2 g; vitamină  $\text{B}_{12}$  1  $\mu\text{g}$ ; biotină 20  $\mu\text{g}$ ; acid folic 20  $\mu\text{g}$ ; tiamină 50  $\mu\text{g}$ ; riboflavină 50  $\mu\text{g}$ ; niacină 50  $\mu\text{g}$ ; pantotenat 50  $\mu\text{g}$ ; p-aminobenzoat 50  $\mu\text{g}$ ; acid lipoic 50  $\mu\text{g}$ ; vitamină  $\text{B}_6$  100  $\mu\text{g}$ ;  $\text{MgCO}_3$  10 g; antispumant siliconic 1 ml. Bioreactoarele au fost plasate pe un agitator rotativ la 100 rpm și incubate la 37°C pe întreaga durată a fermentației. În timpul procesului de fermentație, în mediu a fost barbotat  $\text{CO}_2$  cu un debit de 0,1 l/l mediu pe minut.



Bioreactoare anaerobe de mici dimensiuni

Figura 1. Incubator cu bioreactoare cu strat mobil

În aceste experimente a fost folosită bacteria *A. succinogenes* ATCC 55617 imobilizată în alginat. Microorganismul a fost furnizat de American Type Culture Collection și păstrat în frigider la -70°C. Inoculum-ul a fost preparat prin incubarea *A. succinogenes* la 30°C în flacoane Duran de 100 ml fiecare conținând 50 ml de TSB (*trypticase soya broth*). Flacoanele au fost agitate la 100 rpm pe un agitator rotativ timp de 48 de ore.

Imobilizarea s-a realizat prin incluziunea celulelor bacteriene într-o matrice de alginat conform rețetei din literatură. Prepararea biocatalizatorilor s-a realizat în condiții aseptice, separat pentru fiecare bioreactor. În acest sens, 6 ml de inocul s-a adăugat peste 20 ml soluție 5% alginat de sodiu. Granulele de biocatalizator au fost obținute prin picurarea acestei suspensii sub presiune constantă, prin capilare, sub agitare, într-o soluție de clorură de calciu 0,2%. Au fost utilizate 3 capilare de dimensiuni diferite, astfel încât au fost obținute granule de *A. succinogenes* imobilizate cu 3 diametre: 3; 3,6 și 4,2 mm. În toate cazurile fracția volumică a celulelor în mediul de fermentație a fost de 0,23. Pe parcursul experimentelor nu s-au înregistrat modificări ale integrității structurale ale biocatalizatorilor.

Fermentația s-a considerat încheiată atunci când substratul a fost consumat în întregime sau când concentrația acestuia nu s-a modificat timp de 12 ore.

Datorită difuziei interne a substratului în interiorul particulelor de biocatalizator, concentrația substratului este diminuată în apropierea centrului activ ceea ce duce la reducerea vitezei proceselor biochimice (creșterea biomasei și formarea produsului) comparativ cu sistemele care folosesc bacterii libere. Apariția difuziei interne, în cazul imobilizării celulelor, ar putea atenua efectele inhibitorii.

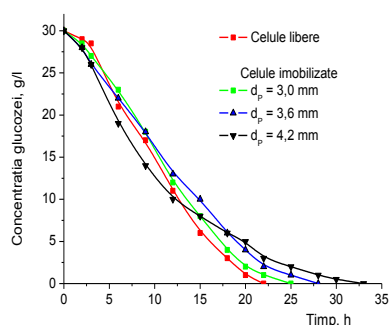


Figura 2. Consumul glucozei pentru *A. succinogenes* celule libere și imobilizate, ciclul I de fermentație

Astfel, din figura 2 se poate observa că durata fermentației succinice pentru bacteria *A. succinogenes* liberă este de aproximativ 22 de ore, perioada lag fiind de 3 ore. Durata procesului de fermentație a crescut prin utilizarea celulelor imobilizate devenind de 25 de ore pentru granulele cu diametrul de 3 mm, 28 de ore pentru cele de 3,6 mm și 33 de ore pentru granulele cu 4,2 mm diametru. Această variație este consecința difuziei interne a glucozei în granula de biocatalizator, proces care reduce concentrația substratului în interiorul particulelor și, implicit, viteza de consum a glucozei.

Aparent, perioada lag nu este atât de evidentă în cazul bacteriei *A. succinogenes* imobilizate, posibil datorită difuziei glucozei dinspre faza lichidă spre biocatalizatori. Însă, pentru primele 12 ore, cea mai ridicată viteză de utilizare a substratului este atinsă pentru granulele de biocatalizator cu diametrul de 3,6 mm. Acest rezultat evidențiază efectul pozitiv al difuziei interne în fermentația succinică în condițiile inhibiției de substrat. După 12-15 ore, atunci când concentrația glucozei este mai mică decât cea care ar induce efectul de inhibiție, difuzia internă devine un factor

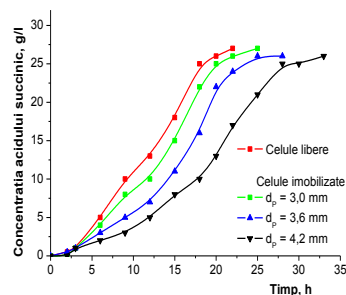
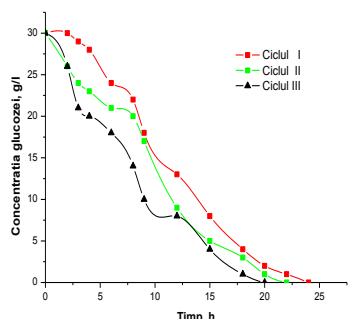


Figura 3. Variația concentrației acidului succinic pentru *A. succinogenes* celule libere și imobilizate, ciclul I de fermentație

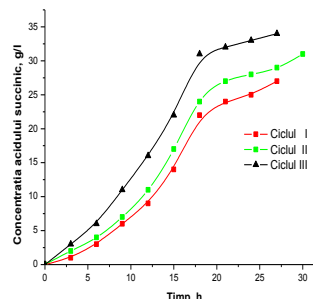
limitativ pentru procesul de fermentație, iar viteza de consum a substratului se reduce, fenomen mai evident la dimensiuni mai ridicate ale granulelor .

În același timp, s-a constatat că prin utilizarea bacteriilor imobilizate și prin creșterea diametrului granulelor de biocatalizator se reduce viteza de producere a acidului succinic, datorită acumulării sale în interiorul granulelor și a apariției fenomenului de inhibiție de produs (figura 3).

Aceiași biocatalizatori au fost folosiți pentru 3 cicluri succesive de fermentație succinică și s-a constatat că pentru aceleași granule viteza de consum a glucozei și viteza producerii acidului succinic cresc de la un ciclu la altul, fenomen ce se datorează dezvoltării bacteriilor în interiorul granulelor (figurile 4 și 5).



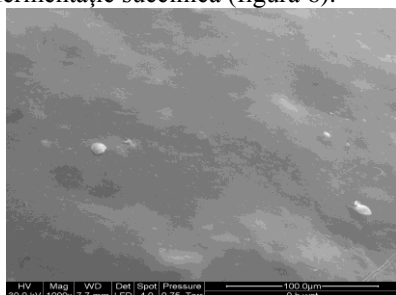
**Figura 4.** Variația concentrației substratului în timpul fermentației cu *A. succinogenes* celule imobilizate



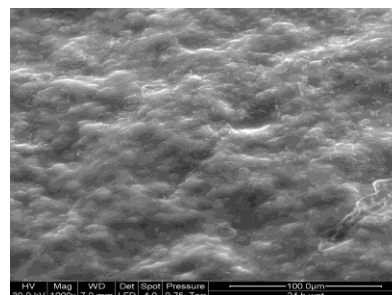
**Figura 5.** Variația concentrației produsului în timpul fermentației cu celule imobilizate de *A. succinogenes*

Dezvoltarea bacteriilor în interiorul biocatalizatorilor a cauzat distrugerea granulelor la finalul celui de-al treilea ciclu, fapt evidențiat prin măsurarea turbidității mediului. De asemenea, dezvoltarea biomasei în interiorul granulelor de biocatalizatori este dovedită și de imaginile SEM obținute în diferite momente pe parcursul celor trei cicluri de fermentație succinică (figura 6).

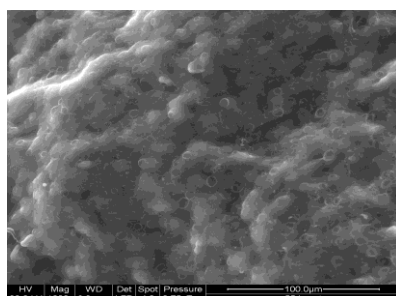
0h



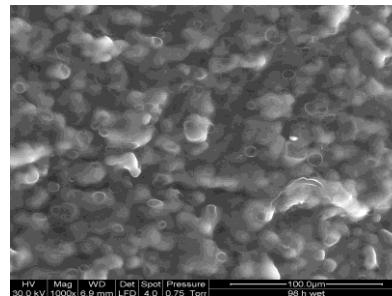
24h



55h



98h



**Figura 6.** Imagini SEM (scanning electron microscope) ale suprafeței exterioare a particulei de biocatalizator la diferite intervale de timp pe parcursul procesului fermentativ

Valorile concentrației glucozei la suprafața și în interiorul particulelor pot fi determinate prin balanța de masă corespunzătoare unei singure particule sferice de biocatalizator. În acest scop, au fost considerate următoarele ipoteze:

- cinetica procesului de producere a acidului succinic poate fi descrisă prin modelul lui Jerusalimsky pentru inhibiția de substrat și de produs, adaptat celulelor imobilizate de *A. succinogenes*:

$$v_p = V \cdot C_C \cdot \left( \frac{K_{iS}}{K_{iS} + C_S} \right) \cdot \left( \frac{K_{iP}}{K_{iP} + Y_{P/S} \cdot C_S} \right) \quad (1)$$

- particula de biocatalizator este sferică;
- celulele de drojdie sunt distribuite uniform în interiorul particulei;
- nu există interacțiuni între substrat sau produs și suportul de imobilizare;
- difuzia internă este descrisă de legile lui Fick și de difuzivitatea efectivă.

În acest caz, expresia care descrie balanța de masă a glucozei pentru particula de biocatalizator este:

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

Considerând condițiile de echilibru, ecuația (33) devine:

$$\frac{d^2 C_{SP}}{dr^2} + \frac{2}{r} \cdot \frac{dC_{SP}}{dr} = \frac{V \cdot C_C}{D_{Se}} \cdot \left( \frac{K_{iS}}{K_{iS} + C_{SP}} \right) \cdot \left( \frac{K_{iP}}{K_{iP} + Y_{P/S} \cdot C_{SP}} \right) \quad (3)$$

și poate fi rezolvată cu următoarele limite:

- 1)  $r = 0, \frac{dC_{SP}}{dr} = 0$
- 2)  $r = R_p, -D_{Se} \cdot \frac{dC_{SP}}{dr} = k_L \cdot (C_{SL} - C_{Si})$

unde:

$C_S$  - concentrația substratului, g/l

$C_{Si}$  - concentrația substratului la interfața solid-lichid, g/l

$C_{SL}$  - concentrația substratului în lichid, g/l

$C_{SP}$  - concentrația substratului în granula de biocatalizator, g/l

$R_p$  - raza granulei de biocatalizator, m

$C_C$  - concentrația celulelor în mediu, g s.u./l

$D_{Se}$  - coeficientul efectiv de difuzie, m<sup>2</sup>/s

$K_I$  - constanta de inhibiție (89,48 g/l)

$K_M$  - constanta Michaelis-Menten aparentă (18,14 g/l)

$V$  - viteza maximă de producere a acidului (3,125 g/l.h).

În consecință, soluția ecuației (3) descrie profilul concentrației glucozei în interiorul particulei de biocatalizator:

$$C_S = \frac{Bi \cdot (C_{SL} - C_{Si}) \cdot \cosh(3 \cdot \varphi \cdot R_p)}{R_p^2} \cdot \left( \frac{3\varphi}{R_p} - R_p \cdot \tanh(3 \cdot \varphi \cdot R_p) \right) \cdot \frac{\sinh\left(\frac{3 \cdot \varphi \cdot r}{R_p}\right)}{r} \quad (4)$$

Concentrația substratului la suprafața particulei se obține utilizând următoarea relație:

$$C_{Si} = \frac{Bi \cdot C_{SL} \cdot \cosh(3 \cdot \varphi \cdot R_p) \cdot (3 \cdot \varphi - R_p^2 \cdot \tanh(3 \cdot \varphi \cdot R_p)) \cdot \sinh(3 \cdot \varphi) - C_S \cdot R_p^4}{Bi \cdot \cosh(3 \cdot \varphi \cdot R_p) \cdot (3 \cdot \varphi - R_p^2 \cdot \tanh(3 \cdot \varphi \cdot R_p))} \quad (5)$$

Modulul lui Thiele,  $\varphi$ , și numărul Biot,  $Bi$ , cuantifică influența difuziei interne. Astfel, modulul Thiele indică amplitudinea influenței difuziei interne asupra randamentului reacției biochimice. Pentru sistemul de fermentație luat în discuție, acesta este definit de expresia modificată:

$$\varphi = \frac{R_p}{3} \sqrt{\frac{V \cdot C_C \cdot \left( \frac{Y_p \cdot K_{iS} + 1}{K_{iP} \cdot K_{iS}} \right)}{D_{SE}}} \quad (6)$$

Numărul Biot reprezintă raportul dintre rezistența la difuzia în regiunea din exteriorul particulei și cea corespunzătoare difuziei interne:

$$Bi = \frac{k_L \cdot R_p}{D_{Se}} \quad (7)$$

Fluxurile interne și externe ale masei de glucoză pot fi calculate luând în considerare valorile concentrației glucozei în mediul lichid de fermentație și din interiorul particulei de biocatalizator. Astfel, fluxul substratului dinspre faza lichidă către suprafața particulei este:

$$n_L = k_L \cdot (C_{SL} - C_{Si}) \quad (8)$$

unde  $k_L$  reprezintă coeficientul de transfer de masă în apropierea suprafeței particulei, fiind calculat cu expresia:

$$\left( \frac{k_L d_p}{D_{SL}} \right) \cdot \left( \frac{\rho_L \cdot D_{SL}}{\eta_L} \right)^{1/3} \cdot \left( \frac{\eta_L}{\phi \cdot v_s \cdot \rho_L \cdot d_p} \right) = 1,90 \cdot \left[ \frac{(1 - \phi) \cdot \eta_L}{v_s \cdot \rho_L \cdot d_p} \right]^{1/2} \quad (9)$$

unde:

$\phi$  - fracția volumetrică a particulelor de biocatalizator

$\varphi$  - modulul Thiele

$\eta_L$  - viscozitatea lichidului, Pa·s

$\rho_L$  - densitatea lichidului, Kg/m<sup>3</sup>.

Fluxul intern poate fi obținut combinând legea lui Fick:

$$n_p = -D_{Se} \cdot \frac{dC_{SP}}{dr} \quad (10)$$

cu ecuația (5), rezultând următoarea expresie adecvată pentru fermentația succinică în condițiile inhibiției de substrat și de produs:

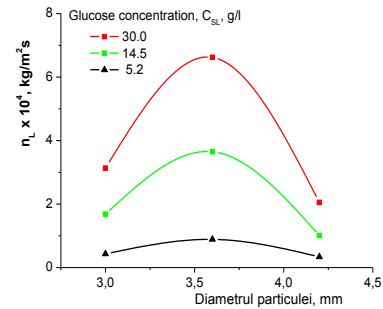
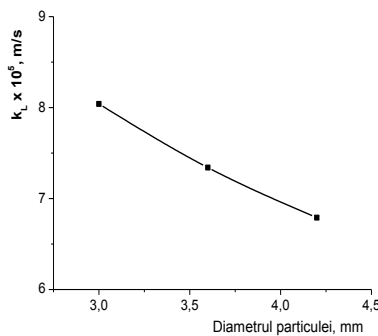
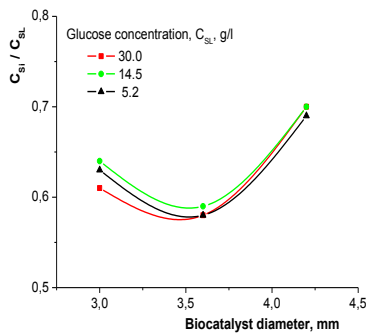
$$\frac{dC_S}{dr} = \frac{Bi \cdot (C_{SL} - C_{Si}) \cdot \cosh(3 \cdot \varphi \cdot R_p) \cdot (3 \cdot \varphi - R_p^2 \tanh(3 \cdot \varphi \cdot R_p))}{R_p^3} \left[ \frac{3 \cdot \varphi \cdot \cosh\left(\frac{3 \cdot \varphi \cdot r}{R_p}\right)}{R_p \cdot r} - \frac{\sinh\left(\frac{3 \cdot \varphi \cdot r}{R_p}\right)}{r^2} \right] \quad (11)$$

Valorile parametrilor utilizați pentru calcularea transferului de masă extern și intern au fost stabiliți anterior și redați în tabelul 1.

**Tabelul 1.** Parametrii utilizați pentru calcule.

Parametru	Valoare
$D_{SL}$	$6.47 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$
$D_{Se}$	$4.39 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$
$K_{iS}$	$80 \text{ kg/m}^3$
$K_{iP}$	$48 \text{ kg/m}^3$
$V$	$1.75 \times 10^{-4} \text{ kg/kg s}$
$Y_{P/S}$	$1.10 \text{ kg/kg}$

Ecuția (5) sugerează faptul că valoarea concentrației superficiale a glucozei și, implicit, gradul său de consum depind de dimensiunea particulei de biocatalizator. Conform figurii 7, pentru domeniul de dimensiuni considerat al diametrelor particulelor, valoarea minimă a raportului  $C_{Si}/C_{SL}$  corespunde granulelor cu diametrul de 3,6 mm. Acest rezultat, corelat cu cel prezentat în figura 82, sugerează faptul că dimensiunea intermediară a particulelor de biocatalizator permite atingerea celei mai mari valori a gradului de consum a glucozei (cea mai scăzută concentrație superficială a glucozei), datorită echilibrului dintre difuzia internă și inhibiția de substrat. Inhibiția de substrat este mult mai pronunțată pentru particulele cu diametrul cel mai mic, în timp ce difuzia internă devine principala etapă limitativă pentru cele mai mari particule.



**Figura 7.** Influența dimensiunii particulelor de biocatalizator asupra raportului  $C_{Si}/C_{SL}$

**Figura 8.** Influența dimensiunii particulelor de biocatalizator asupra valorii lui  $k_L$

**Figura 9.** Influența dimensiunii particulelor de biocatalizator și a fracției volumetrice asupra fluxului extern de masă a glucozei

Dependența dintre valoarea lui  $k_L$  și dimensiunea biocatalizatorilor a fost redată în figura 8. Această indică efectul negativ al diametrului particulelor asupra coeficientului de transfer de masă datorită creșterii grosimii stratului de lichid care înconjoară particula.

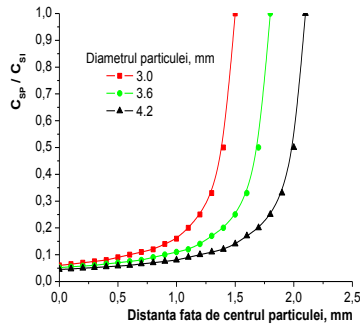
Fluxul extern de masă al glucozei a fost calculat introducând valorile parametrilor discutați anterior în ecuația (8), luând în considerare diferite concentrații ale glucozei la diferite momente ale procesului de fermentație.

Astfel, după cum indică și figura 9, fluxul crește odată cu dimensiunea biocatalizatorilor, atinge o valoare maximă pentru particulele cu diametrul de 3,6 mm, descrescând apoi pentru dimensiunea cea mai mare a biocatalizatorilor. Această variație este cauzată de amplificarea gradientului concentrației substratului în interiorul stratului de lichid, efect care determină reducerea valorii lui  $k_L$  de la cele mai mici particule către cele mai mari. În concordanță cu rezultatele discutate anterior, gradientul maxim al concentrației substratului se înregistrează pentru particulele intermediare de *A. succinogenes* imobilizate.

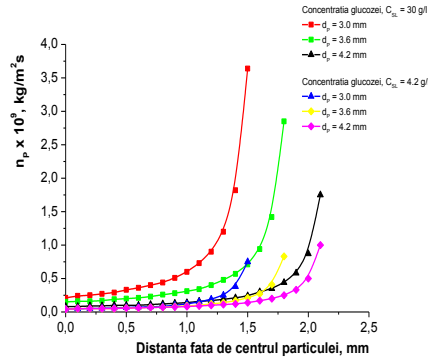
Datorită dependenței directe a concentrației glucozei din interiorul particulei de biocatalizator de concentrația sa la suprafața particulei, variația raportului dintre aceste două concentrații cu raza particulei poate descrie cu precizie mai mare influența difuziei interne. Din figura 10 se poate observa că raportul  $C_{Sp}/C_{Si}$  se reduce semnificativ în apropierea centrului particulei, acest efect fiind mai pronunțat pentru particulele cu diametrul cel mai mare.

Astfel, valoarea acestui raport scade de la 1 la 0,06 pentru particulele cele mai mici de *A. succinogenes* imobilizate, la 0,052 pentru particulele medii și la 0,045 pentru cele mai mari granule. Această variație nu este afectată de modificarea concentrației substratului din mediu.

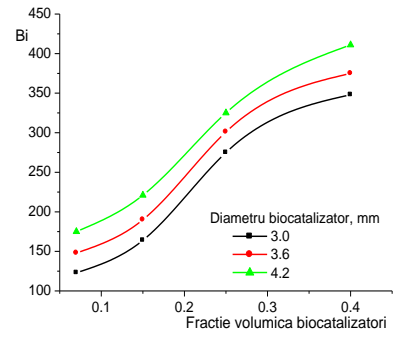
În aceste condiții, în funcție de concentrația superficială a glucozei, concentrația glucozei în centrul particulei poate înregistra valori foarte reduse comparativ cu cele din mediul lichid. Datorită creșterii importanței rezistenței difuzionale pentru particulele cu cea mai mare dimensiune, concentrația substratului în apropierea centrului particulei cu diametrul de 3 mm este de 1,2 ori mai mare decât cea pentru particulele de 3,6 mm, respectiv de 2,5 ori mai mare decât cea corespunzătoare particulelor cu diametrul de 4,2 mm.



**Figura 10.** Variatia raportului  $C_{sp}/C_{si}$  cu distanta față de centrul particulei de biocatalizator



**Figura 11.** Variatia fluxului intern de masa a glucozei cu distanta față de centrul particulei de biocatalizator



**Figura 12.** Influenta fractiei volumice și a diametrului biocatalizatorilor asupra criteriului Bi

Având în vedere ecuația (11) și utilizând datele calculate, au fost determinate valorile fluxului de masă intern de glucoză. Variația fluxului cu raza biocatalizatorului este reprezentată în figura 11. Analiza primară a curbelor reprezentate în figura de mai sus sugerează că valorile fluxului de masă intern este de aproximativ  $10^5$  ori mai scăzut decât cel înregistrat pentru fluxul de masă extern. În plus, figura 11 indică relația directă dintre fluxul de masă intern și concentrația substratului, ambele fiind reduse în apropierea centrului particulei. Pentru o anumită regiune internă, ce mai mari valori ale fluxului intern de masă au fost înregistrate pentru cele mai mici particule, datorită celei mai reduse rezistențe la difuzia internă a substratului. Luând în considerare mărimea coeficientului efectiv de difuzie, se poate presupune că la valori ale fluxului de masă intern mai mici de  $1 \times 10^{-10}$  kg/m<sup>2</sup>s, transferul de masă al glucozei este nesemnificativ. Regiunea corespunzătoare celor mai reduse valori ale transferului de masă intern al substratului a fost considerată a fi “regiunea biologică inactivă”. Extinderea acestei regiuni depinde de dimensiunea particulei de biocatalizator și de concentrația glucozei în faza lichidă. Astfel, pentru  $C_{SL} = 30$  g/l, fluxul de masă al glucozei devine neînsemnat pentru particulele cu cel mai mare diametru într-o regiune cu o rază de 0,4 mm, pentru granulele cu dimensiunea intermediară într-o regiune cu o rază de 0,25 mm, în timp ce pentru biocatalizatorii cu dimensiunea cea mai mică această valoare neglijabilă a fluxului intern de masă nu a fost atins. Însă pentru  $C_{SL} = 4,2$ , raza așa-numitei “regiuni biologice inactivă” devine de 0,8 mm pentru cele mai mari particule, de 0,5 mm pentru granulele cu diametrul intermediar, respectiv de 0,3 mm pentru biocatalizatorii cu dimensiunea minimă. Deoarece experimentele s-au desfășurat într-un bioreactor cu straturi mobile de biocatalizatori imobilizați, extinderea acestei regiuni este mult diminuată comparativ cu cea raportată anterior pentru o fermentație similară realizată într-un bioreactor cu strat fix.

După cum a fost prezentat anterior, criteriul Bi cuantifică importanța relativă a proceselor de difuzie exterioară și internă a substratului (ecuația (7)). Din figura 12 se observă efectul pozitiv al creșterii dimensiunii particulelor de biocatalizatori asupra acestui criteriu, ca rezultat al creșterii gradientului de concentrație al glucozei în filmul de lichid de la suprafața granulelor și, implicit, al accelerării vitezei de difuzie în această regiune. Din același motiv, valorile criteriului Bi sunt influențate favorabil și de mărirea fracției volumice a biocatalizatorilor din mediu.

### 2.1. Studiul influenței difuziei interne asupra vitezei reacției biochimice de conversie a substratului pentru stratul mobil de celule de *Actinobacillus succinogenes* imobilizate

Modulul Thiele descrie modul în care difuzia internă influențează procesul biochimic de consum al substratului (ecuația (6)). Variațiile acestui parametru cu caracteristicile biocatalizatorilor sunt redată în figura 13.

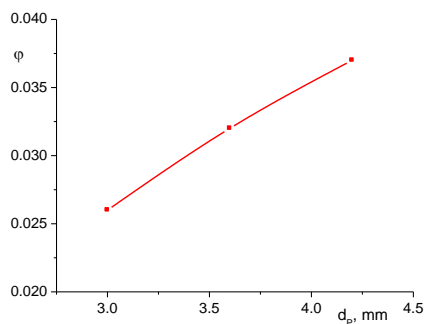
Valoarea modulului Thiele scade de la granulele mai mici către cele cu dimensiuni mai mari, ceea ce sugerează accentuarea efectului negativ al difuziei interne asupra vitezei reacției biochimice de conversie a glucozei (figura 13). Valoarea modulului Thiele nu este afectată de fracția volumică a biocatalizatorilor din mediu.

Pentru a evidenția cu claritate efectul difuziei interne asupra consumului substratului se utilizează în acest caz factorul  $\lambda$ . Astfel, în cazul specific al sistemului studiat, relația de calcul a factorului  $\lambda$  devine:

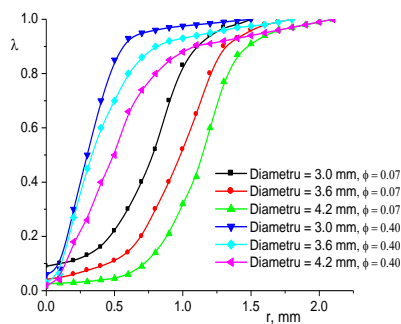
$$\lambda = \frac{4\pi \cdot R_p^2 \cdot D_{se} \cdot \left. \frac{dC_{sp}}{dr} \right|_{r=R_p}}{\frac{4}{3} \pi \cdot R_p^3 \cdot V \cdot C_C \cdot \left( \frac{K_{is}}{K_{is} + C_S} \right) \cdot \left( \frac{K_{ip}}{K_{ip} + Y_{p/s} \cdot C_S} \right)} \quad (12)$$

Utilizarea relației (4) și efectuarea simplificărilor conduc la următoarea expresie:

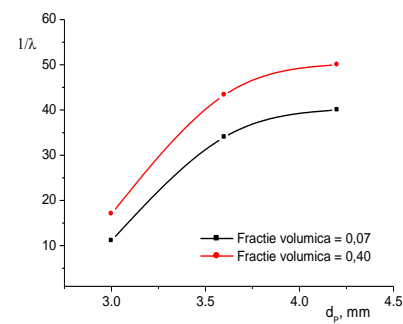
$$\lambda = \frac{3 \cdot k_L \cdot (C_{SL} - C_{Si}) \cdot \cosh(3\varphi \cdot R_p) \cdot \left( \frac{3\varphi}{R_p} - R_p \cdot \tanh(3\varphi \cdot R_p) \right) \cdot \cosh(3\varphi) \cdot [3\varphi - \tanh(3\varphi)]}{R_p^4 \cdot V \cdot C_C \cdot \left( \frac{K_{is}}{K_{is} + C_S} \right) \cdot \left( \frac{K_{ip}}{K_{ip} + Y_{p/s} \cdot C_S} \right)} \quad (13)$$



**Figura 13.** Influența fracției volumice și a diametrului biocatalizatorilor asupra modului Thiele



**Figura 14.** Variația factorului  $\lambda$  cu distanța de la centrul particulei de biocatalizator, pentru diferite diametre și fracții volumice ale biocatalizatorilor



**Figura 15.** Variația parametrului  $1/\lambda$  în centrul biocatalizatorilor

Variația factorului  $\lambda$  în interiorul particulei de biocatalizator este prezentată grafic în figura 14. Din analiza alurii dependențelor obținute se poate concluziona că, indiferent de dimensiunea sau concentrația biocatalizatorilor, factorul  $\lambda$  variază lent în apropierea suprafeței și centrului granulelor. La suprafața exterioară a granulelor de biocatalizator, concentrația mai ridicată a glucozei, apropiată de cea superficială, conduce la valori ale factorului  $\lambda$  apropiate de 1. Grosimea stratului superficial al granulelor pentru care  $\lambda$  scade lent depinde în principal de fracția volumică a granulelor de biocatalizator. Astfel, această grosime crește de la circa 0,3 mm, pentru  $\phi = 0,07$ , la circa 1 mm, pentru  $\phi = 0,40$ , ca rezultat al amplificării vitezei relative a reacției biochimice de consum a glucozei la concentrații mai ridicate ale celulelor de *A. succinogenes* din mediu.

Datorită menținerii la un nivel redus al concentrației substratului în zona centrală a particulelor de biocatalizator valoarea factorului  $\lambda$ , specifică pentru această regiune, variază într-un ritm scăzut. Pentru o anumită fracție volumică a biocatalizatorilor, s-a constatat că grosimea stratului corespunzătoare reducerii factorului  $\lambda$  până la o valoare care se menține relativ constantă crește cu diametrul granulelor, datorită amplificării rezistenței la difuzia internă a substratului. Regiunea centrală corespunzătoare acestei valori constante se reduce odată cu creșterea concentrației biocatalizatorilor în mediu, ca rezultat al accelerării vitezei reacției biochimice care se desfășoară în interiorul granulelor. Din acest motiv, pentru o anumită dimensiune a granulelor, valorile factorului  $\lambda$  sunt mai mari pentru mediile cu conținut mai ridicat de biocatalizatori. De asemenea, grosimea stratului superficial corespunzător valorilor maxime ale factorului  $\lambda$  se extinde.

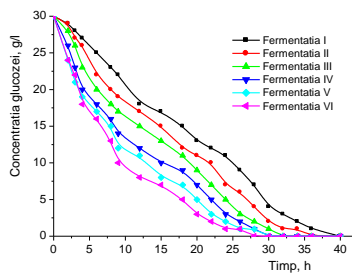
În schimb, datorită reducerii mai accentuate a concentrației substratului către centrul granulelor prin efectele cumulate ale rezistenței la difuzia internă și consumului biochimic al substratului, volumul regiunii centrale pentru care factorului  $\lambda$  se menține la un nivel relativ constant se diminuează, iar valorile centrale ale acestui factor se reduc (prin mărirea fracției volumice de la 0,07 la 0,40, valoarea factorului  $\lambda$  în centrul granulelor se reduce de circa 1,4 ori).

Din figura 15 se poate deduce că pentru granulele cu diametrul de 4,2 mm și fracție volumică 0,40, în centrul granulei se atinge o viteză a reacției biochimice de obținere a acidului succinic de circa 50 de ori mai mică decât cea obținută pentru celulele libere.

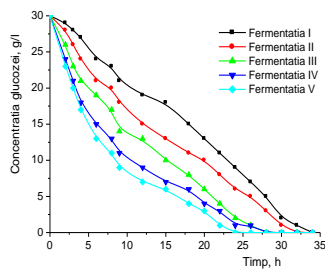
### 3. ASPECTE DIFUZIONALE ALE OBȚINERII ACIDULUI SUCCINIC ÎNTR-UN BIOREACTOR TIP „BASKET” STAȚIONAR CU STRAT MOBIL DE CELULE IMOBILIZATE DE *Actinobacillus succinogenes*

Eficiența bacteriilor în fermentația succinică poate fi influențată negativ de concentrația substratului sau a acizilor, datorită fenomenelor specifice de inhibiție de substrat sau de produs. În aceste circumstanțe, viabilitatea populației de *A. succinogenes*, viteza de consum a substratului sau cea de producere a acidului succinic sunt controlate în mod direct de condițiile de mediu. Astfel, deși au fost folosite pentru sistemele cu celule bacteriene neimobilizate, s-au observat reduceri importante ale vitezei de dezvoltare a biomasei sau de producere a acidului succinic pentru concentrații ale zahărului mai mari de 65 g/l. Însă, tulpina de *A. succinogenes* poate tolera concentrații ale glucozei de până la 160 g/l și se poate dezvolta într-un mediu pe bază de melasă îmbogățită cu fructoză, glucoză și zahăr. Acumularea acidului succinic până la o concentrație de 40 - 42 g/l nu afectează activitatea bacteriană, însă, efectul inhibitor al acidului trebuie corelat cu prezența în mediu și a altor produși de fermentație (biosinteza acizilor formic și acetic poate reduce toleranța bacteriei la acidul succinic la 20 g/l).

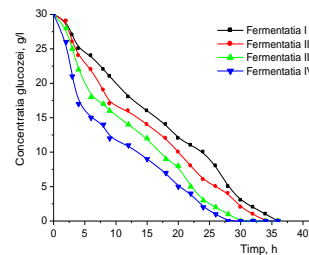
După cum a fost prezentat anterior, imobilizarea celulelor de *A. succinogenes* poate conduce la diminuarea efectelor negative ale proceselor inhibitorii și oferă posibilitatea realizării mai multor cicluri de fermentație utilizând aceiași biocatalizatori. Deoarece bioreactorul staționar tip “basket” cu celule imobilizate prezintă o serie de avantaje comparativ cu bioreactorul cu strat mobil de astfel de biocatalizatori, în continuare s-a studiat fermentația succinică folosindu-se acest tip de bioreactor.



**Figura 16.** Variația concentrației glucozei în timpul fermentației succinice cu celule de *A. succinogenes* immobilizate în strat fix tip "basket" (concentrație inițială glucoză = 30 g/l, diametru granule biocatalizator 3 mm)



**Figura 17.** Variația concentrației glucozei în timpul fermentației succinice cu celule de *A. succinogenes* immobilizate în strat fix tip "basket" (concentrație inițială glucoză = 30 g/l, diametru granule biocatalizator 3,6 mm)



**Figura 18.** Variația concentrației glucozei în timpul fermentației succinice cu celule de *A. succinogenes* immobilizate în strat fix tip "basket" (concentrație inițială glucoză = 30 g/l, diametru granule biocatalizator 4,2 mm)

Comparativ cu obținerea acidului succinic într-un bioreactor cu strat mobil de celule de *A. succinogenes* immobilizate, se constată că prin utilizarea sistemului tip "basket" viteza de consum a glucozei se reduce. În acest sens, pentru primul ciclu de fermentație, viteza medie de consum a glucozei a fost mai mică cu 32% pentru biocatalizatorii cu diametrul de 3 mm, cu 26% pentru biocatalizatorii cu diametrul de 3,6 mm și, respectiv, cu 18% pentru biocatalizatorii de 4,2 mm diametru. Aceste variații ale vitezei de consum a substratului se datorează apariției unei etape suplimentare în cazul stratului fix de tip "basket", și anume difuzia glucozei prin strat. Din acest motiv, cu cât diametrul granulelor este mai mic, cu atât stratul este mai dens, spațiile dintre granule sunt mai reduse, iar rezistența opusă de strat la difuzia substratului este mai ridicată.

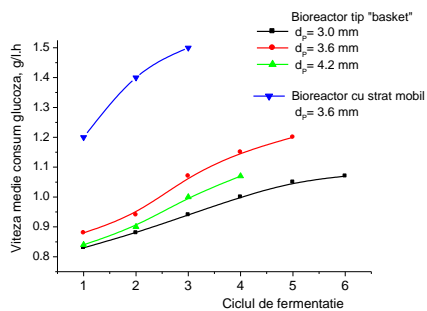
De asemenea, reducerea vitezei de consum a glucozei în bioreactorul tip "basket" poate fi motivată și de acumularea în stratul fix a acidului succinic, precum și a acizilor secundari, care pot genera un efect mai pronunțat de inhibiție de produs.

Însă, prin comparație cu sistemul cu strat mobil de biocatalizatori, utilizarea bioreactorului tip "basket" permite mărirea numărului de cicluri de fermentație care utilizează aceleași granule de celule bacteriene immobilizate. Deși, după cum a fost observat în cazul stratului mobil, dezvoltarea biomasei de *A. succinogenes* induce distrugerea granulelor de biocatalizatori, prin folosirea stratului tip "basket", granulele sunt immobilizate compact, iar celulele rămân mai mult timp în strat, fie în interiorul granulelor, fie în exteriorul acestora. Acest fenomen a fost evidențiat prin creșterea mult mai lentă a turbidității mediului de la un ciclu de fermentație la altul, comparativ cu turbiditatea mediului conținând stratul mobil de biocatalizatori, în condiții similare de fermentație.

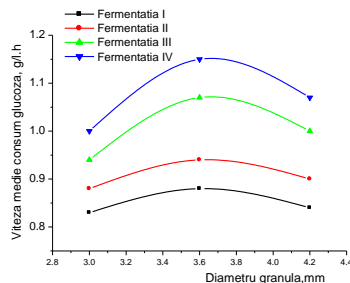
Menținerea mai eficientă a integrității structurale a biocatalizatorilor dispuși în stratul tip "basket" este sugerată și de numărul de cicluri de fermentație care pot fi realizate până la atingerea unei turbidități a mediului comparabilă cu cea obținută pentru ciclul al treilea de fermentație cu stratul mobil de celule bacteriene immobilizate. În plus, cu cât dimensiunea granulelor este mai redusă și, în consecință, stratul fix este mai compact, cu atât numărul de cicluri de fermentație este mai mare. Astfel, pentru biocatalizatorii cu diametrul de 3 mm au fost posibile 6 cicluri de fermentație, pentru cei cu diametrul de 3,6 mm 5 cicluri, iar pentru cei mai mari biocatalizatori 4 cicluri.

Figura 19 indică accelerarea vitezei de consum a substratului de la un ciclu de fermentație la altul, indiferent de dimensiunea particulelor de biocatalizatori. Această variație este consecința dezvoltării biomasei, care face posibilă reducerea mai rapidă a concentrației glucozei din mediu.

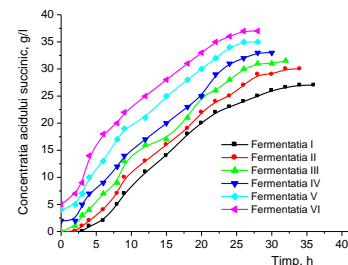
Din figurile 16-19 se poate concluziona că cele mai mari viteze de consum ale glucozei se înregistrează pentru biocatalizatorii de dimensiune intermediară, respectiv cu diametrul de 3,6 mm. Acest rezultat, indicat în figura 20, este cauzat de cel mai bun raport dintre vitezele relative de difuzie internă a glucozei în stratul tip "basket" și în granula de celule de *A. succinogenes* immobilizate, care se atinge în cazul acestei dimensiuni a biocatalizatorilor.



**Figura 19.** Variația vitezei medii de de consum a glucozei cu numărul de cicluri de fermentație



**Figura 20.** Variația vitezei medii de consum a glucozei cu diametrul granulelor de biocatalizator



**Figura 21.** Variația concentrației acidului succinic în timpul fermentației cu celule de *A. succinogenes* immobilizate în strat fix tip "basket" (concentrație inițială glucoză = 30 g/l, diametru granule biocatalizator 3 mm)

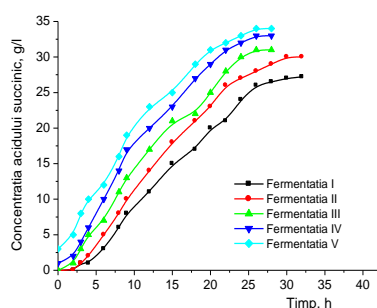


Pentru granulele cu cele mai mici dimensiuni, datorită unui strat fix mai compact, circulația mediului în strat este mult mai lentă și, implicit, difuzia substratului în strat mult diminuată. Utilizarea granulelor cu diametrul de 4,2 mm permite obținerea unui strat fix cu o fracție volumică a golurilor mai ridicată, însă rezistența la difuzia în granule a substratului este mult mai accentuată. Conform rezultatelor, viteza medie de consum a glucozei scade în seria diametrelor 3,6 mm > 4,2 mm > 3 mm.

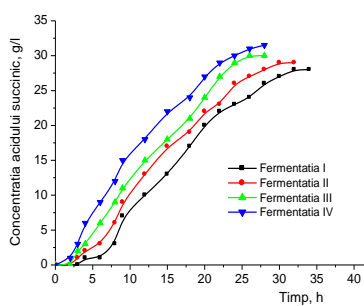
Modificarea concentrației produsului principal al fermentației, acidul succinic, pe parcursul procesului este în directă corelație cu viteza de consum a glucozei (figurile 21-23).

Indiferent de dimensiunea biocatalizatorilor, analiza variației acidului succinic indică o creștere a producției de la un ciclu de fermentație la altul, în principal ca efect al dezvoltării biomasei. Cea mai importantă creștere se obține pentru cele mai mici granule de celule *A. succinogenes* imobilizate, concentrația finală a acidului succinic fiind de 37 g/l pentru granulele cu diametrul de 3 mm, comparativ cu 34 g/l pentru granulele cu dimensiune intermediară și 31,5 g/l pentru cele mai mari granule, rezultate obținute în toate situațiile pentru ultimul ciclu de fermentație.

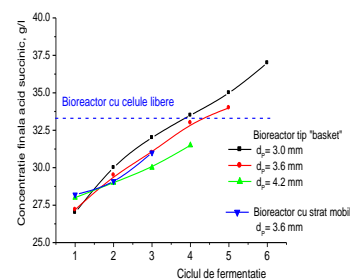
Totuși, aceste rezultate nu pot fi considerate ca redând variația reală a concentrației acidului succinic pentru un anumit ciclu de fermentație. Această afirmație este susținută de faptul că valoarea concentrației finale a acidului succinic obținută prin fermentație cu aceeași tulpină de celule *A. succinogenes* neimobilizate, pornind tot de la 30 g/l glucoză, în condiții similare de fermentație, a fost de 33 g/l. În plus, după cum a fost prezentat anterior, prin utilizarea bioreactorului cu strat mobil de celule bacteriene imobilizate, concentrația finală maximă a acidului succinic obținut în aceleași condiții de fermentație a fost de 31 g/l, datorită efectelor negative ale apariției fenomenelor de difuzie internă a substratului sau produșilor de biosinteză. De aceea, existența unei alte etape de difuzie, cea din stratul fix tip “basket”, nu poate favoriza procesul de fermentație, producția finală de acid succinic putând fi cel mult identică cu cea obținută în sistemul conținând stratul mobil de biocatalizatori.



**Figura 22.** Variația concentrației acidului succinic în timpul fermentației cu celule de *A. succinogenes* imobilizate în strat fix tip “basket” (concentrație inițială glucoză = 30 g/l, diametru granule biocatalizator 3,6 mm)



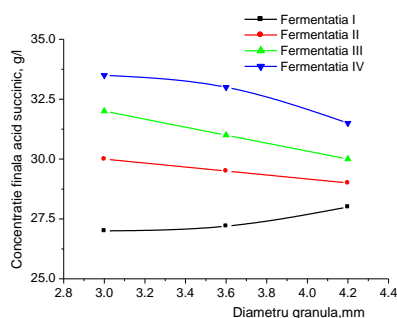
**Figura 23.** Variația concentrației acidului succinic în timpul fermentației cu celule de *A. succinogenes* imobilizate în strat fix tip “basket” (concentrație inițială glucoză = 30 g/l, diametru granule biocatalizator 4,2 mm)



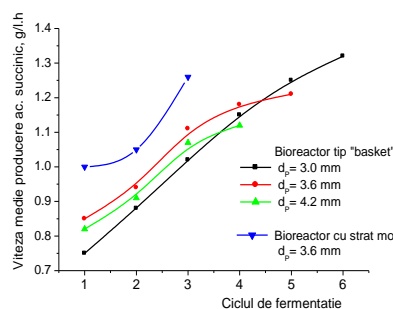
**Figura 24.** Variația concentrației finale a acidului succinic cu numărul de cicluri de fermentație

Dependențele dintre valoarea concentrației finale a acidului succinic și numărul de cicluri de fermentație, respectiv dintre valoarea concentrației finale a acidului succinic și dimensiunea granulelor de biocatalizatori sunt trasate în figurile 24 și 25.

Din analiza comparativă a variațiilor prezentate în figura 24, se constată că valoarea mai mare a concentrației acidului succinic înregistrată pentru biocatalizatorii dispuși în stratul fix tip “basket” nu se datorează unei productivități mai ridicate a acestui bioreactor, ci acumulării acidului în interiorul stratului. În acest mod, acidul succinic produs într-unul sau mai multe cicluri anterioare de fermentație difuzează în mediul corespunzător unei fermentații ulterioare, mărind “artificial” conținutul de acid. Efectul este cu atât mai puternic cu cât stratul de biocatalizatori este mai dens, respectiv în cazul granulelor cu diametrul de 3 mm, devenind aproape neglijabil în cazul celor mai mari granule (concentrația finală a acidului succinic produs în bioreactorul tip “basket” cu biocatalizatori de 4,2 mm este inferioară celor obținute în bioreactorul cu celule libere de *A. succinogenes* și în cel cu strat mobil de biocatalizatori, în condiții similare de fermentație) (figura 25).



**Figura 25.** Variația concentrației finale a acidului succinic cu diametrul granulelor de biocatalizatori



**Figura 26.** Variația vitezei medii de consum a glucozei cu numărul de cicluri de fermentație

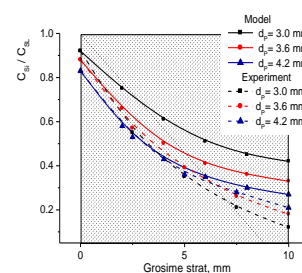
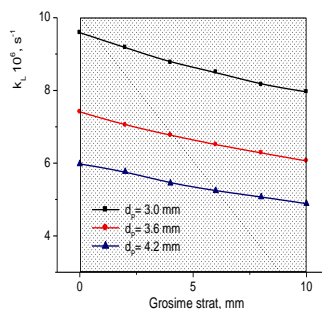
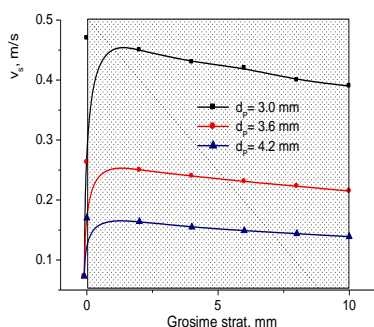
Excepția, care susține cele menționate mai sus, o reprezintă ciclul I de fermentație, pentru care valorile concentrațiilor finale ale acidului succinic cresc odată cu dimensiunea granulei, fiind, în toate cazurile, inferioare celor înregistrate pentru sistemul cu strat mobil (figura 25).

Fenomenul acumulării în stratul tip “basket” a acidului succinic este sugerat și de figurile 21 și 22, în care se observă că ciclurile IV de fermentație pentru biocatalizatorii cu diametrele de 3 și 3,6 mm pornesc de la concentrații inițiale ale acidului succinic mai mari decât 0 g/l (între 2 și 5 g/l pentru ciclurile IV-VI pentru granule de 3 mm, respectiv între 1 și 3 g/l pentru ciclurile IV și V pentru granule de 3,6 mm - probele s-au prelevat la 15 minute după adăugarea mediului proaspăt și funcționarea bioreactorului într-un nou ciclu). Mai mult, proveniența acidului succinic dintr-un ciclu anterior de fermentație este indicată și de creșterea lentă sau menținerea constantă a concentrației sale inițiale în primele 2-3 h de fermentație, interval de timp care corespunde unei lipse de producție de acid în primele două sau trei cicluri de fermentație pentru granulele de biocatalizatori de dimensiunile menționate.

Magnitudinea acestor efecte este mult diminuată în cazul stratului tip “basket” cu granule de 4,2 mm (figura 23), datorită fracției superioare de goluri a stratului care permite eliminarea mai bună a acidului succinic produs într-un ciclu anterior. Pentru o anumită dimensiune a biocatalizatorului, viteza medie de producere a acidului succinic crește cu numărul de cicluri de fermentație (figura 26). Creșterea vitezei de biosinteză este în mod real cauzată de creșterea biomasei de *A. succinogenes*. În schimb, amplitudinea acestei creșteri nu redă în mod riguros dependența dintre viteza de producere a acidului succinic și viteza de dezvoltare a biomasei, deoarece este determinată și de cantitățile reziduale de acid succinic datorate ciclului anterior de fermentație.

Luând în considerare doar primele patru cicluri de fermentație, se poate constata că cele mai mari viteze de biosinteză se ating pentru granulele de biocatalizatori cu diametrul intermediar, datorită echilibrului existent între magnitudinile relative ale proceselor de difuzie internă în granulă și în stratul fix. Acumularea acidului succinic în stratul tip “basket” conduce după ciclul al IV-lea la atingerea unor valori ale vitezei de producere a acestuia mai mari pentru granulele cu 3 mm, valori care, însă, nu sunt reale. Premisele modelelor matematice care redau profilurile concentrațiilor glucozei și ale fluxurilor masice ale acesteia în regiunea exterioară și interioară particulelor de biocatalizatori sunt identice cu cele menționate în cazul stratului mobil. Însă, curenții de curgere prin stratul tip „basket” sunt cei reprezentați schematic raportul științific al etapei anterioare a proiectului.

Indiferent de dimensiunea granulei de biocatalizator, viteza superficială în interiorul stratului este superioară celei din regiunea exterioară a acestuia (figura 27).



**Figura 27.** Variația vitezei superficiale în stratul de biocatalizatori

**Figura 28.** Variația coeficientului de transfer de masă  $k_L$  în stratul de biocatalizatori

**Figura 29.** Variația raportului  $C_{Si}/C_{Sl}$  în stratul de biocatalizatori

Cea mai ridicată viteză superficială se atinge pentru cele mai mici granule de celule *A. succinogenes* imobilizate în alginat, datorită celei mai reduse fracții de goluri din strat (fracția volumică a biocatalizatorilor este  $\phi = 0,84$  pentru biocatalizatorii cu diametrul de 3 mm,  $\phi = 0,71$  pentru biocatalizatorii cu diametrul de 3,6 mm și, respectiv,  $\phi = 0,55$  pentru biocatalizatorii cu diametrul de 4,2 mm).

La modul general, figura 28 indică reducerea  $k_L$  (coeficientul de transfer de masă al substratului prin filmul de lichid de la suprafața granulelor de biocatalizator) 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”. În plus, comparativ cu sistemul care conține biocatalizatori cu aceleași caracteristici în strat mobil, viteza transferului de masă al glucozei prin stratul limită de mediu de la suprafața biocatalizatorilor dispuși în stratul tip “basket” este de circa 8 - 13 ori mai redusă, diferența crescând cu diametrul granulei și cu grosimea stratului fix, ceea ce reprezintă o limitare a performanțelor bioreactorului cu celule de *A. succinogenes* imobilizate într-un strat fix.

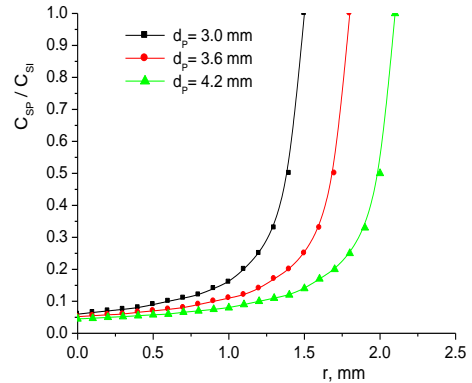
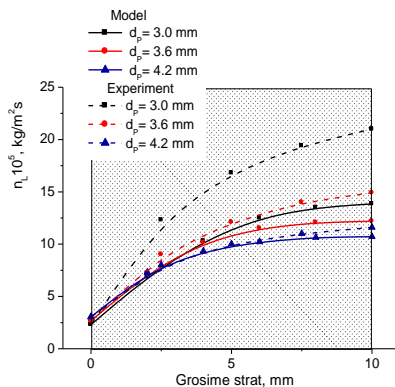
Figura 29 redă variația raportului dintre concentrația glucozei la suprafața granulei de biocatalizator și concentrația sa în mediu cu grosimea stratului de biocatalizator. Se constată că acest raport scade pe direcție radială, dinspre suprafața interioară a stratului tip “basket” către extremitatea acestuia (se consideră concentrația glucozei în mediu egală cu concentrația sa inițială,  $C_{S0}$ ).

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 consumului substratului de către bacteriile imobilizate. Din figura 29 se constată abateri ale datelor experimentale de la 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 difuzia substratului prin stratul de biocatalizatori. La acest efect se adaugă

consumul mai avansat al glucozei pe măsura înaintării în strat, deoarece se reduce viteza superficială și, implicit, crește timpul de staționare al substratului. În același timp, există posibilitatea apariției unei curgeri inverse prin strat, datorită spațiilor înguste de curgere a mediului, care mărește suplimentar timpul de staționare.

Fenomenele menționate sunt mai pronunțate în cazul stratului tip “basket” cu granule având diametrul de 3 mm, datorită celei mai reduse fracții de goluri din strat. Dezvoltarea celulelor de *A. succinogenes* în ciclurile următoare de fermentație va conduce la atingerea unor rapoarte  $C_{Si}/C_{SL}$  și mai reduse la suprafața exterioară a stratului cilindric.

Variația fluxului masic al glucozei prin filmul de lichid de la suprafața granulelor de celule immobilizate în stratul tip “basket” pe direcție radială este redată în figura 30, figură care indică importanța majoră a gradientului de concentrație a substratului dintre lichid și suprafața granulei, ca factor decisiv ce controlează coeficientul  $k_L$ . Consumul mai rapid al glucozei de către celulele de *A. succinogenes* immobilizate au indus mărirea acestui gradient odată cu creșterea distanței pe direcție radială în interiorul stratului fix.



**Figura 30.** Variația fluxului masic al glucozei prin filmul de lichid de la suprafața granulelor de alginat în stratul de biocatalizatori

**Figura 31.** Variația raportului  $C_{SP}/C_{Si}$  cu distanța de la centrul particulei de biocatalizator

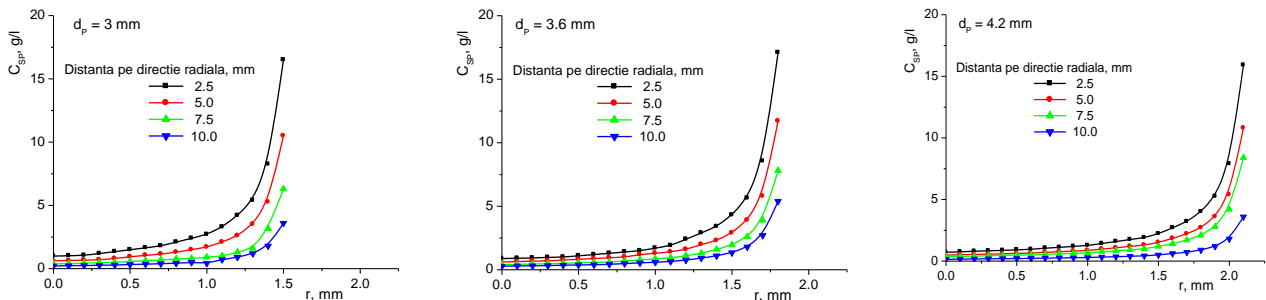
Abaterile observate între valorile fluxului masic determinate cu valorile concentrațiilor glucozei calculate cu ajutorul modelului propus și cele experimentale se accentuează odată cu creșterea grosimii stratului și cu reducerea diametrului granulelor de biocatalizator, ca efect al creșterii accentuate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

Datorită utilizării biocatalizatorilor în strat fix, viteza de circulație a fazei lichide în jurul granulelor este mult mai redusă decât în cazul stratului mobil de celule immobilizate, ceea ce conduce la o reducere a fluxului masic extern al glucozei de circa 1,8 - 14 de ori în sistemul analizat comparativ cu cel înregistrat pentru straturi mobile în condiții similare (reducerea se accentuează cu odată cu micșorarea dimensiunii granulelor de biocatalizator și cu creșterea grosimii stratului cilindric).

Cu ajutorul legii lui Fick se obține expresia fluxului masic specific:

$$n_p = D_{Se} \cdot \frac{B_i \cdot (C_{SL} - C_{Si}) \cdot \cosh(3\varphi \cdot R_p) \cdot (3\varphi - R_p^2 \cdot \tanh(3\varphi \cdot R_p))}{R_p^3} \cdot \left[ \frac{3\varphi \cdot \cosh\left(\frac{3\varphi \cdot r}{R_p}\right)}{R_p \cdot r} - \frac{\sinh\left(\frac{3\varphi \cdot r}{R_p}\right)}{r^2} \right] \quad (14)$$

Pentru redarea influenței difuziei interne în granula de biocatalizator asupra concentrației interne a substratului, s-a reprezentat inițial variația raportului dintre concentrațiile interioară și superficială ale glucozei,  $C_{SP}/C_{Si}$  cu raza granulei. În acest sens, din figura 31 se observă că, indiferent de mărimea granulelor, raportul concentrațiilor se reduce semnificativ odată cu apropierea de centrul particulei.



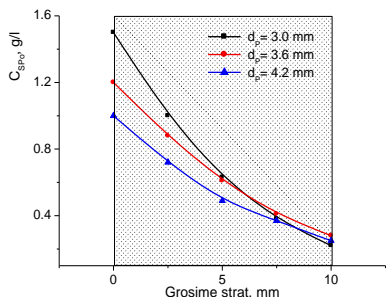
**Figura 32.** Variația concentrației substratului cu distanța de la centrul particulei de biocatalizator ( $C_{S0} = 100$  g/l)

Amplitudinea acestei reduceri crește cu diametrul granulei. Astfel, raportul concentrațiilor se reduce de la 1, la suprafața granulelor, la 0,06 în centrul granulei pentru biocatalizatori cu diametrul de 3 mm, la 0,052 pentru

biocatalizatori cu diametrul de 3,6 mm, respectiv la 0,045 pentru cei mai mari biocatalizatori. Această variație nu este influențată de poziția din interiorul stratului fix tip „basket”.

Conform figurilor 32 și 33, concentrația glucozei în centrul granulei,  $C_{S_{po}}$ , poate avea o valoare foarte redusă comparativ cu cea din lichid ca urmare a fenomenelor de difuzie a acesteia de la nivelul mediului în interiorul biocatalizatorului. Acest lucru reprezintă o amenințare importantă la desfășurarea normală a procesului.

Figura 32 indică un efect mai pronunțat al difuziei în granulă asupra concentrației interne a glucozei, 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.

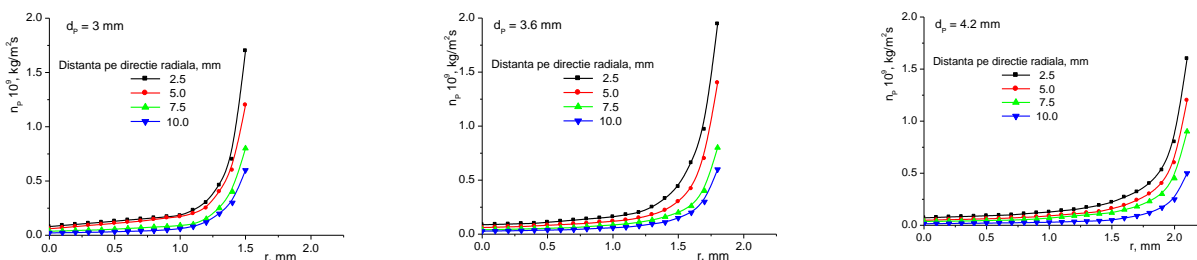


**Figura 33.** Variația concentrației glucozei în centrul granulei de alginat,  $C_{S_{po}}$ , în stratul de biocatalizatori

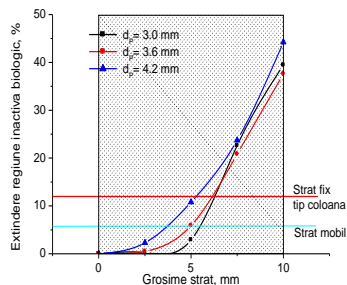
După cum se poate constata din figura 33, aceste fenomene sunt, inițial, mai importante pentru granulele cu dimensiunea cea mai mare, însă, pe măsura înaintării în stratul tip „basket”, ele devin mai pronunțate pentru cele mai mici granule, consecință a rezistenței crescute la difuzia prin stratul fix și a unei viteze superioare de consum a glucozei.

Variațiile fluxului masic specific al substratului în interiorul particulei de biocatalizator cu raza biocatalizatorului și cu grosimea stratului tip „basket” sunt prezentate în figura 34.

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 34 sugerează reducerea acestuia odată cu apropierea de centrul granulei de biocatalizator.



**Figura 34.** Variația fluxului masic intern al glucozei cu distanța de la centrul particulei de biocatalizator ( $C_{S0} = 100$  g/l)



**Figura 35.** Variația extinderii relative a „regiunii inactive biologice” pe direcție radială în stratul de biocatalizator

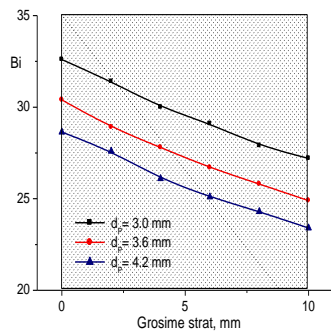
În acest caz, conform figurii 35, extinderea „regiunii inactive biologice” variază între 0,24 și 44% din volumul total al particulei, cele mai mari valori obținându-se pentru cele mai mari granule și la suprafața exterioară a stratului cilindric.

Pentru o anumită distanță de la suprafața granulei și pentru grosimi ale stratului tip „basket” de peste 5 mm, cele mai mari valori ale fluxului masic intern al glucozei se înregistrează pentru granulele de biocatalizator de dimensiune intermediară, ca efect al echilibrului existent între procesele de difuzie în strat și în biocatalizator, rezultat ce recomandă această dimensiune a biocatalizatorilor formați din celule de *A. succinogenes* imobilizate în alginat.

Extinderea regiunii inactive devine de până 8 de ori mai mare decât în cazul straturilor mobile de celule de *A. succinogenes* imobilizate. Practic, numai până la o distanță de circa 50% din totalul grosimii stratului fix volumul acestei regiuni este comparabil cu cel corespunzător stratului mobil.

Comparativ cu un bioreactor tip coloană cu strat fix de celule imobilizate, întinderea acestei regiuni este mai mică în primii 60% din totalul adâncimii în strat pe direcție radială.

Comparând valorile medii ale criteriului Biot din strat corespunzătoare fiecărei dimensiuni a biocatalizatorilor ( $Bi = 29,7$  pentru granulele de 3 mm,  $Bi = 27,4$  pentru cele de 3,6 mm,  $Bi = 25,8$  pentru cele de 4,2 mm) cu cele înregistrate pentru stratul mobil de biocatalizatori cu aceleași caracteristici ( $Bi = 275$  pentru granulele de 3 mm,  $Bi = 301,2$  pentru cele de 3,6 mm,  $Bi = 325,1$  pentru cele de 4,2 mm), se constată că pentru stratul tip „basket” valoarea  $Bi$  este de circa 9 - 13 ori mai redusă, cea mai importantă reducere obținându-se pentru cele mai mari granule (figura 36). Diferența este consecință reducerii coeficientului de transfer de masă al glucozei prin filmul de lichid de la suprafața biocatalizatorilor, datorată diminuării turbulenței în stratul fix și al creșterii rezistenței suplimentare corespunzătoare difuziei prin strat.

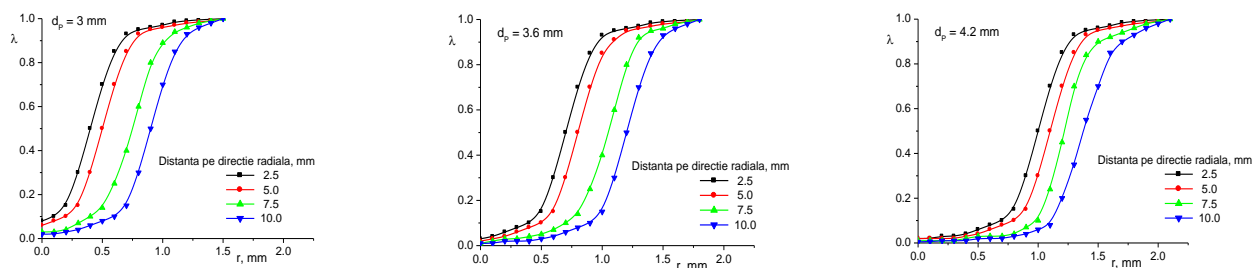


**Figura 36.** Variația criteriului Biot pe direcție radială în stratul de biocatalizatori

### 3.1. Studiul influenței difuziei interne asupra vitezei reacției biochimice de conversie a substratului pentru stratul fix tip “basket de celule de *Actinobacillus succinogenes* immobilizate

Valoarea modulului Thiele este unică pentru o anumită dimensiune a biocatalizatorilor, în întreg stratul tip “basket” de biocatalizatori fiind identică cu cea obținută pentru stratul mobil de celule immobilizate ( $\varphi = 0,026$  pentru biocatalizatorii cu diametrul de 3 mm,  $\varphi = 0,032$  pentru biocatalizatorii cu diametrul de 3,6 mm, respectiv  $\varphi = 0,037$  pentru biocatalizatorii cu diametrul de 4,2 mm).

În cazul acestui sistem, variația factorului  $\lambda$  cu distanța de la centrul particulei de biocatalizator, pentru diferite poziții pe direcție radială în stratul de biocatalizator, este prezentată grafic în figura 37. Datorită concentrației mai ridicate a glucozei la suprafața biocatalizatorilor, apropiată de cea superficială, factorul  $\lambda$  are valori apropiate de 1.

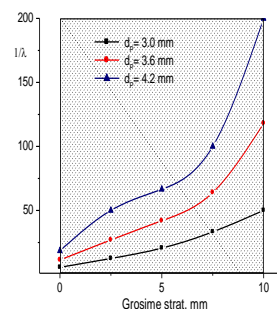


**Figura 37.** Variația factorului  $\lambda$  cu distanța de la centrul particulei de biocatalizator, pentru diferite poziții pe direcție radială în stratul de biocatalizator

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 concentrației mai accentuate a concentrației glucozei în granulă, în directă dependență cu valoarea sa din strat.

Scăderea vitezei reacției biochimice de obținere a acidului succinic (în sistemul tip „basket” comparativ cu sistemul cu celule libere de *A. succinogenes*) 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 cilindriului la cea exterioară de circa 8,9 ori pentru cele mai mici granule, de 10,3 ori pentru granulele cu diametrul intermediar, și de 10,8 ori pentru cele mai mari granule (figura 38).

Amplitudinea efectului de reducere a vitezei reacției biochimice de consum a glucozei crește de până la 13 ori comparativ cu aceeași biocatalizatori, însă în strat mobil, în condiții similare de fermentație. Datorită unei influențe mai semnificative a difuziei interne, reducerea maximă a vitezei reacției biochimice de consum a glucozei s-a înregistrat pentru granulele de 4,2 mm diametru.



**Figura 38.** Variația parametrului  $1/\lambda$  în centrul biocatalizatorilor pe direcție radială în stratul de biocatalizatori

Experimentele efectuate au avut ca scop evidențierea avantajelor oferite de bioreactorul cu strat mobil de biocatalizatori și cel cu strat fix tip “basket” în procesul de obținere a acidului succinic pe cale fermentativă.

Menținerea mai eficientă a integrității structurale a biocatalizatorilor dispuși în stratul tip “basket” este sugerată de numărul de cicluri de fermentație care pot fi realizate până la atingerea unei turbidități a mediului comparabilă cu cea obținută pentru ciclul al treilea de fermentație cu stratul mobil de celule *A. succinogenes* immobilizate. În plus, cu cât dimensiunea granulelor este mai redusă și, în consecință stratul fix este mai compact, cu atât numărul de cicluri de fermentație este mai mare. Astfel, pentru biocatalizatorii cu diametrul de 3 mm au fost posibile 6 cicluri de fermentație, pentru cei cu diametrul de 3,6 mm 5 cicluri, iar pentru cei mai mari biocatalizatori, 4 cicluri.

Existența unei alte etape de difuzie, cea din stratul fix tip “basket”, s-a dovedit a avea un efect important în reducerea magnitudinii efectelor negative ale inhibiției de substrat și de produs, însă acesta nu va favoriza procesul de fermentație, producția finală de acid succinic putând fi cel mult identică cu cea obținută în sistemul cu strat mobil de biocatalizatori.

## 5. METODOLOGIE CHEMOENZIMATICĂ PENTRU OBTINEREA CELOR DOI ENANTIOMERI AI BUFURALOLULUI, MEDICAMENT CARDIOVASCULAR CU ACTIVITATE BETA-BLOCANTA

În domeniul farmaceutic sinteza compusilor enantiopuri a devenit o problemă deosebit de importantă deoarece enantiomerii individuali ai medicamentelor au deseori proprietăți fiziologice și comportament metabolic diferit, interacția cu receptorii farmacologici, chirali datorită structurii lor proteice, fiind foarte selectivă. Un antagonist în receptorilor  $\beta$ -adrenergici utilizat pe scară largă, cu potențial ridicat, este Bufuralolul, dezvoltat și introdus în terapia afecțiunilor cardiovasculare de Hoffman- La Roche. Bufuralolul se utilizează în special pentru tratarea hipertensiunii arteriale, dar și ca inhibitor al testosterone-6 $\beta$ -hidroxilazei sau în studiul citocromului P450. Molecula este chirală datorita prezenței unui atom de carbon asimetric în catena etanolaminică. Degradarea sa oxidativă se desfășoară în ficat

prin procese enantio- și regioselective. În timp ce activitatea  $\beta$ -blocantă este datorată în special (*S*)-bufuralolului (de 100 ori mai activ decât enantiomerul (*R*)), (*R*)-bufuralolul este utilizat în mod uzual ca marker al activității hepatice.

Pentru sinteza ambilor enantiomeri ai Bufuralolului au fost dezvoltate și descrise în literatură mai multe variante de procedee stereoselective. Astfel, (*S*)-Bufuralolul (*ee* 87%) a fost obținut din 3-etil-2-hidroxi-benzaldehidă prin reducerea stereoselectivă în etapa cheie a 2-bromo-1-(7-etilbenzofuran-2-il)etanonei cu ( $-$ )- $\beta$ -clorodiisopinocampfeilboran. Colectivul lui Lee a prezentat o metodologie similară care implică hidrogenarea asimetrică a 1-(7-etilbenzofuran-2-il)-2-meziloxietanolului mediată de  $Cp^*RhCl[S,S-TsDPEN]$ , la utilizarea unui amestec azeotrop de acid formic/trietilamină. Enantiomerul (*R*) a fost obținut cu succes din clorocetona corespunzătoare sau cetoimina printr-o metodă secvențială de transfer de hidrogen prin substituție sau prin rezoluția cinetică dinamică enzimatică a clorohidrinei în prezența unor catalizatori de ruteniu. A fost publicată relativ recent sinteza stereoselectivă a (*S*)-bufuralolului (95% randament, *ee* 98%) *via* (*S*)-cianohidrina corespunzătoare, obținută prin cianurarea enantiotop selectivă a aldehidei în cataliza metaloorganică homochirală.

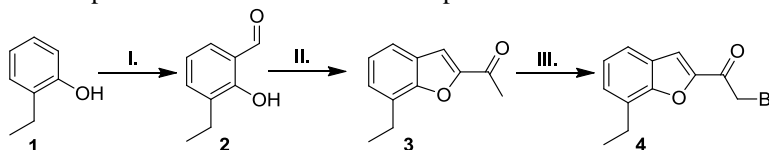
Lipazele (EC 3.1.1.3) sunt catalizatori sintetici foarte atractivi datorită toleranței largi de substrat, a stereoselectivității ridicate, a disponibilității comerciale, a faptului că nu necesită cofactori și a eficienței catalitice remarcabile. Turner și colab. au realizat acilarea enantiomer selectivă a *rac*-7-etilbenzofuran-2-il-cloroalcoholului. S-a demonstrat că lipazele din specii de *Pseudomonas* și *Candida* pot rezolva eficient amestecul racemic, cu formarea (*R*)-bufuralolului.

**Studiile fecetuate în cadrul acestei etape a proiectului au permis elaborarea a două metodologii chemoenzimatiche de sinteză stereoselectivă a ambilor enantiomeri ai bufuralolului.**

Prima se bazează pe biotransformarea cu drojdie a acetatului de 2-(7-etilbenzofuran-2-il)-2-oxoetil **5** și a 1-(7-etilbenzofuran-2-il)-2-hidroxi-2-oxoetil **6** din Schema 1, cu formarea ambilor enantiomeri ai diolului, intermediari folosiți apoi la sinteza bufuralolului. Cealaltă are la bază acilarea enantiomer selectivă a 2-bromo-1-(7-etilbenzofuran-2-il)etanonei racemic *rac*-**8**, cu formarea, la o conversie de 50%, a unui enantiomer sub forma de ester și a celuilalt ca și alcool netransformat. Toți intermediarii obținuți au fost apoi transformați în moleculele țintă prin reacții chimice care nu afectează configurația atomului stereogenic, deci fără alterarea purității enantiomere, cu randamente bune.

#### 1. Sinteza chimică a substraturilor

2-Etilfenolul **1** disponibil comercial a fost format cu paraformaldehida în poziția *orto*-pentru sinteza 3-ethylsalicilaldehidei **2** cu randamente ridicate (Schema 1). Prin reacție cu cloroacetona, aceasta a fost transformată în 7-etilbenzofuran-2-il-etanona **3** care prin bromurare cu tribromura de piridiniu a condus la bromo-cetona **4**.



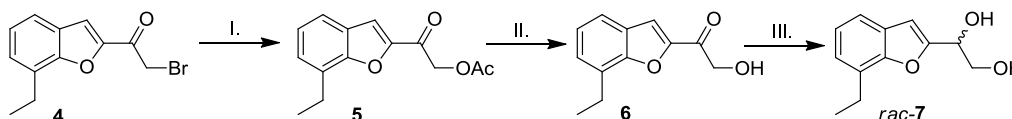
I. Paraformaldehida,  $NEt_3$ ,  $MgCl_2$ ,  $CH_3CN$ ; II. Cloroacetona,  $K_2CO_3$ ,  $CH_3CN$ ; III.  $C_5H_5NBr_3$ ,  $CH_3COOH$ .

**Schema 1.** Sinteza chimică a  $\alpha$ -bromo-cetonei

#### 2. Sinteza (*R*)- și (*S*)-bufuralolului prin intermediul etandiolilor obținuți prin biotransformare cu drojdie

Pornind de la bromocetona **4**, au fost preparate cetonele prochirale **5** și **6**, folosind o metodologie dezvoltată anterior de grupul nostru (Schema 2). Mai întâi din reacția bromocetonei **4** cu acetat de sodiu în prezența eterului coroană 18C6 ca și catalizator de transfer interfazic, în condiții anhidre, a fost preparată  $\alpha$ -acetoximetil-cetona **5** care prin etanoliză neselectivă mediată de lipaza B din *Candida antarctica* (Novozym 435) a condus la  $\alpha$ -hidroximetil-cetona **6** cu randamente ridicate. Prin reducerea acestui compus cu borohidruș de sodiu a fost sintetizat și 1,2-etandiolul racemic *rac*-**7** (84% randament global, raportat la **4**) folosit pentru determinarea condițiilor de separare cromatografică pe coloane chirale, în scopul investigării selectivității biotransformărilor realizate ulterior.

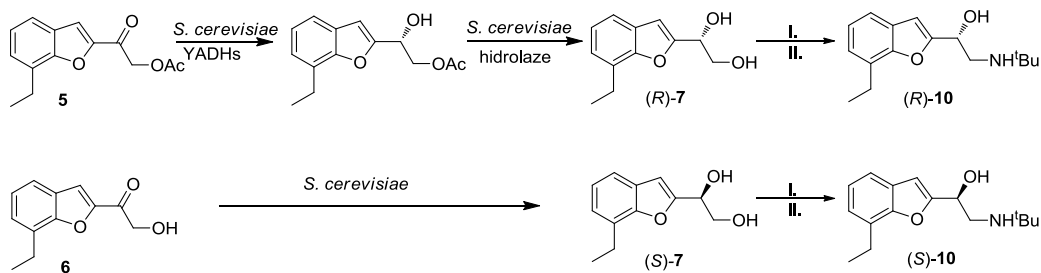
Prin biotransformare cu celule de *Saccharomyces cerevisiae*, folosind oxidoreductazele și hidrolazele prezente, au fost elaborate metodologii de obținere a ambilor enantiomeri ai aril-etandiolilor enantiopuri prin alegerea corespunzătoare a substratului, cetona  $\alpha$ -substituită, cu randament teoretic de 100%. Astfel  $\alpha$ -acetoximetilcetonele sunt reduse și apoi hidrolizate cu formarea enantiomerului diferit de cel obținut la reducerea  $\alpha$ -hidroxicetonei (Schema 3).



I.  $CH_3COO^-Na^+$ , 18-C6, 1,4-dioxan; II. Novozym 435, EtOH; III.  $NaBH_4$ , MeOH, r.t

**Schema 2.** Sinteza chimică a cetonei  $\alpha$ -substituite **5** și **6** și a diolului racemic **7**.

Biotransformarea cetonei **5** și **6** (Schema 3), a fost realizată în sistem fermentativ și nefermentativ, fiind studiată și influența unor aditivi recomandați asupra enantiopurității produsului obținut (Tabelul 2). Dacă în cazul biotransformării acetoxicetonei **5** majoritatea aditivilor au îmbunătățit performanțele procesului, în cazul hidroxicetonei **6** majoritatea aditivilor au scăzut stereoselectivitatea procesului. Cele mai mari selectivități s-au obținut în sistem fermentativ, în prezența L-Cisteinei (Tabel 2, număr 4).



**Schema 3.** Transformarea chemoenzimatică a cetonelor  $\alpha$ -substituite **5** și **6** în (*R*)- și (*S*)-Bufuralol  
 I. TsCl, Et<sub>3</sub>N, Bu<sub>2</sub>SnO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t.; II. *tert*-Butilamina, EtOH, reflux

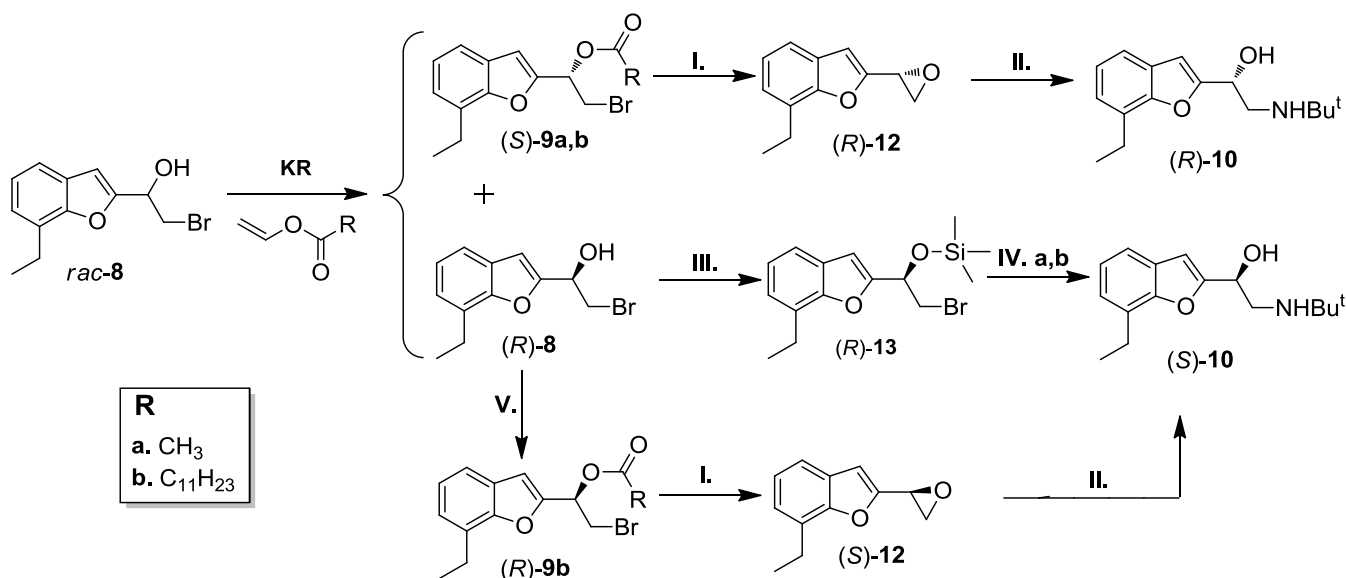
(*R*)- și (*S*)-Heteroaril-1,2-diolii (*R*)- and (*S*)-**7** izolați au fost utilizați după purificare pentru sinteza celor doi enantiomeri ai Bufuralolului prin activarea regioselectivă a grupării alcoolice primare a fiecărui enantiomer al diolului cu clorura de tosil, în prezența oxidului de dibutil staniu ca și catalizator, urmată de reacția cu *tert*-butilamina (Schema 3) cu obținerea produsului final cu o enantiopuritate ușor redusă (*ee* 96% pentru (*R*)-**10** și 93% pentru (*S*)-**10**) comparativ cu cea a diolului de pornire (*ee* 98% pentru (*R*)-**7** și 96% pentru (*S*)-**7**), cu un randament global mai mare de 40% raportat la diol.

**Tabelul 2.** Biotransformarea celulară a cetonelor prochiral **5** și **6** în sistem fermentative și nefermentativ

Nr.	Aditiv (0.5% w/w)	<i>ee</i> <sub>(<i>R</i>)-7</sub> <sup>a</sup>		<i>ee</i> <sub>(<i>S</i>)-7</sub> <sup>b</sup>	
		Fermentativ	Nefermentativ	Fermentativ	Nefermentativ
1	fără	92	90	86	87
2	Alcool alilic	96	96	80	80
3	<i>n</i> -hexan	98	95	50	78
4	L-Cisteină	96	95	96	76
5	Bromoacetat de etil	–	–	–	–
6	MgCl <sub>2</sub>	96	92	62	50
7	DMSO	95	94	76	77

<sup>a</sup> din acetoxicetona **5**; <sup>b</sup> din hidroxicetona **6**

3. Sinteza (*R*)- și (*S*)-bufuralolului prin rezoluție cinetică mediate de lipaze a 2-bromo-1-(7-etilbenzofuran-2-il)-etanolului



**KR.** Enzima, donor acil, r.t., 800 rpm; **I.** LiOH, EtOH, r.t.; **II.** *tert*-Butilamina, reflux; **III.** DMCTMS, Et<sub>2</sub>O, r.t.; **IV.** a) *tert*-Butilamina, MeOH, r.t.; b) HF, MeOH; **V.** Dodecanoat de vinil, CaL-A, DIPE

**Schema 4.** Sinteza (*R*)- și (*S*)- Bufuralolului din producții obținute prin rezoluția cinetică enzimatică a bromoetanolului

Cealalta metodologie dezvoltată pentru sinteza ambilor enantiomeri ai Bufuralolului implică *O*-acilarea enantioselectivă catalizată de lipaze a 2-bromo-1-(7-etilbenzofuran-2-il)etanolului racemic, *rac*-**8** (Schema 4), preparat prin reducerea cu borohidruură a bromocetonei **4**. Dintre lipazele disponibile comercial testate în reacția la scară analitică doar lipaza A din *Candida antarctica* a prezentat o activitate mare, dar enantioselectivitate redusă, în timp ce lipaza din *Pseudomonas fluorescens* (L-AK), *Candida rugosa* (CRL) și specii de *Pseudomonas* (LPS) au fost selective dar mai puțin active, indiferent de acil-donorul și solvenții utilizați. Lipaza B din *Candida Antarctica*, CaL-B, s-a dovedit a fi biocatalizatorul optim. Rezultatele prezentate în Tabelul 3 au permis alegerea condițiilor optime și transpunerea acestora la reacția preparativă.

**Tablul 2.** Acilarea enantioselectivă *rac*-**8** cu acetat sau dodecanoat de vinil catalizată de CaL-B (după 16 ore)

Nr	Solvent	$ee_p$ (%)	$ee_s$ (%)	$c$ (%)	$E$
1	MTBE <sup>a</sup>	99	49	33	» 200
2	MTBE <sup>b</sup>	99	41	29	>200
3	DIPE <sup>a</sup>	>99	>99	50	» 200
4	<i>n</i> -hexan <sup>a</sup>	>99	69	41	>200
5	<i>n</i> -hexan <sup>b</sup>	>99	93	48	» 200
6	Acetonitril <sup>a</sup>	>99	42	30	>200
7	Toluen <sup>a</sup>	>99	71	41	» 200
8	Toluen <sup>b</sup>	>99	99	50	» 200
9	<i>n</i> -Octan <sup>a</sup>	>99	99	50	» 200

<sup>a</sup> acetat de vinil; <sup>b</sup> dodecanoat de vinil

Pentru a preveni reacțiile nedorite, inclusiv cele de racemizare, sinteza enantiomerului bufuralolului din intermediarii chirali obținuți s-a făcut după activarea prealabilă a acestora. Astfel gruparea alcoolică a (*R*)-**8** a fost protejată cu trimetilsilil-*N,N*-dimetilcarbammat (DMCTMS, Schema 4), urmată de înlocuirea bromului cu amină și deprotejarea cu HF, însoțită de o racemizare parțială cu formarea (*S*)-bufuralolului (*S*)-**10** cu enantiopuritate redusă ( $ee$  90%) la un randament global de 35%.

(*R*)-bufuralolul (*R*)-**10** a fost preparat din bromohidrinele (*S*)-**9a,b** după transformarea lor în epoxidul (*R*)-**12** în prezența LiOH și reacția sa cu tertbutilamina cu obținerea (*R*)-**10** cu un randament de 53% și un exces enantiomeric foarte bun ( $ee$  98%).

Această metodă a fost folosită apoi și pentru obținerea (*S*)-bufuralolului, prin transformările prezentate în Schema 4, obținându-se (*S*)-Bufuralolul ( $ee$  98%).

#### A. Sinteze chimice

##### 1. Sinteza 3-etil-2-hidroxibenzaldehidei (**2**)

În amestecul 2-etilfenolului (**1**) (9.77 g, 80 mmol), clorurii de magneziu (11.42 g, 120 mmol) și trietilaminei (30.36 g, 300 mmol) în acetonitril (100 mL) se adaugă la temperatura camerei, sub agitare, în porții mici paraformaldehida (16.21 g, 540 mmol). Reacția de perfectează la reflux 5 h, apoi 12 h la temperatura camerei și în final se acidulează cu soluție diluată de HCl (5%, 200 mL). Stratul organic rezultat după extracția cu diclorometan (2×100 mL) se usucă pe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se elimină solventul prin distilare la vid, iar produsul util se izolează prin distilare la presiune scăzută cu randament de 98%.

##### 2. Sinteza 1-(7-etilbenzofuran-2-il)etanonei (**3**)

Se adaugă cloroacetona (7.32 g, 79.2 mmol) în picături în amestecul 3-etil-2-hidroxibenzaldehidei **2** (10.8 g, 72 mmol) și carbonatului de potasiu anhidru (9.95 g, 72 mmol) în acetonitril (60 mL) la 35°C. După perfectarea reacției la reflux timp de 5 h se răcește la temperatura camerei, se filtrează precipitatul și se spală cu acetonitril (2×10 mL). Se distilă solventul la vid iar amestecul brut se purifică prin distilare urmată de recristalizare din *n*-hexan, obținându-se produsul dorit **3** cu randament de 73% (9.9 g).

##### 3. Sinteza 2-bromo-1-(7-etilbenzofuran-2-il)etanonei (**4**)

Se adaugă în soluția compusului **3** (16 g, 0.1 mol) în acid acetic (100 mL) tribromura de piridiniu (28.7 g, 0.9 equiv.) în porții mici, la 35°C. Reacția se perfectează la 50°C (control cromatografic, aproximativ 2 h). Amestecul de reacție se toarnă peste apă cu gheață, se filtrează precipitatul format și se redizolvă în diclorometan. După uscarea soluției pe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidru, se elimină la vid solventul și se purifică produsul dorit cromatografic cu *n*-hexan-diclorometan 1:4 (v/v) ca eluent.

##### 4. Sinteza acetatului de 2-(7-etilbenzofuran-2-il)-2-oxoetil (**5**)

În soluția etanonei **4** (900 mg, 3.4 mmol) în 1,4-dioxan (10 mL) se adaugă acetat de sodiu anhidru (830 mg, 10.1 mmol) și catalizatorul de transfer interfacial 18-C6 (0.1 equiv., 89 mg). Amestecul se refluxează până la terminarea reacției și după răcire se filtrează precipitatul depus, se spală cu dioxan și se recristalizează din etanol.

##### 5. Sinteza of 1-(7-etilbenzofuran-2-il)-2-hidroxiestanonei (**6**)

Amestecul intermediarului **5** (300 mg, 1.2 mmol) și CaL-B (300 mg) în etanol (23 mL) se agită la 300 rpm la temperatura camerei până la completarea reacției, aproximativ 4 h. După filtrarea și spălarea enzimei cu etanol se distilă solventul la vid și produsul brut se recristalizează din etanol.



#### 6. Sinteza 1-(7-etilbenzofuran-2-il)etan-1,2-diolului racemic (rac-7)

În soluția hidroxiketonei **6** (2 g, 9.8 mmol) în metanol (40 mL) se adaugă borohidrida de sodiu (2 equiv., 1.11 g) în porții mici sub agitare, până la transformare completă. Metanolul se distilă la vid, apoi se acidulează cu HCl soluție 5%, se extrage cu diclorometan (3×50 mL) și din faza organică anhidrificată se separă prin concentrare diolul, care se recrystalizează din *n*-hexan.

#### Sinteza 2-bromo-1-(7-etilbenzofuran-2-il)-etanolului racemic (rac-8)

Se realizează similar cu obținerea diolului racemic. Se obține produsul dorit sub forma unui semisolid de culoare galbenă.

### B. Biotransformări

#### 1. Biotransformarea cu cellule de drojdie a acetatului de 2-(7-etilbenzo-furan-2-il)-2-oxoetil (**5**) și a 1-(7-etilbenzofuran-2-il)-2-hidroxiethanonei (**6**)

Se suspendă 2 g de drojdie proaspătă în 15 mL apă. După 15 minute se adaugă aditivul testat, respective în cazul sistemului fermentative se adaugă de la început și zaharoză (1 g) iar aditivii se adaugă după 30 minute. Imediat se adaugă soluția substratului **5** sau **6** (10 mg) dizolvată în etanol (0.5 mL), sub agitare energică. Se iau probe periodice, după 18 și 40 ore, se extrage în acetat de etil, se usucă pe Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidru, se evaporă solvenul și se analizează amestecul obținut prin redizolvare în *n*-hexan-izopropanol 9:1 (v/v) cromatografic.

#### 2. Sinteza (R)- și (S)- 2-tert-butilamino-1-(7-etil-benzofuran-2-il)etanolului (R)- și (S)-**10**

În soluția alcoolului optic pur (R)- sau (S)-**7** (200 mg, 1 mmol) în diclorometan (20 mL) se adaugă Bu<sub>2</sub>SnO (50 mg, 0.2 mmol), *p*-TsCl (190 mg, 1 mmol) și Et<sub>3</sub>N (100 mg, 1 mmol); reacția se perfectează sub agitare până la transformare completă, aproximativ 30 minute. Se filtrează suspensia, filtratul se concentrează la vid iar reziduul se purifică cromatografic cu diclorometan ca eluent.

Din produsul brut astfel obținut, diolul tosilat, se dizolvă (145 mg, 0.5 mmol) în etanol absolut (10 mL) și se adaugă *tert*-butilamina (110 mg, 1.5 mmol), după care se refluxează amestecul peste noapte. Se distila la vid toti componenții volatili iar reziduul se purifică cromatografic cu diclorometan-metanol 8:2 (v/v) ca eluent.

#### 3. Rezoluția cinetică enzimatică a 2-bromo-1-(7-etilbenzofuran-2-il)etanolului (rac-8)

##### Acilarea enzimatică a rac-8

Se adaugă lipaza CaL-B (1 g) în soluția care conține alcoolul **8** (1 g), acetat sau dodecanoat de vinil (2 equiv.) în solvenul potrivit (33 mL). Reacția se perfectează la temperatură camerei pentru 24ore, se distilă solvenul la vid și amestecul brut rezultat se separă în componenți prin cromatografie pe coloană cu diclorometan ca eluent.

#### 4. Sinteza (S)-bufuralolului din (R)-8

Se adaugă trimetilsilil *N,N*-dimetilcarbammat (640 μL, 3.7 mmol) în soluția alcoolului (R)-**8** (500 mg, 1.86 mmol) în dietileter anhidru (15 mL) în atmosferă de argon. Se perfectează reacția sub agitare până la transformarea complete, se elimină produșii volatili la vid și se obține astfel intermediarul urmărit (589 mg, 93% randament).

Se adaugă *tert*-butilamina (300 μL, 3 mmol) în soluția lui (R)-**13** (500 mg, 1.46 mmol) în metanol (15 mL) și apoi se agită la temperatură camerei circa 30 min. Îndepărtarea grupării protectoare se realizează prin adaos de acid fluorhidric (1M, 1.5 mL) în picături. Se distilă metanolul la vid, reziduul se dizolvă în acetat de etil (40 mL), se spală cu apă (2x 40 mL) și stratul organic separate și anhidrificat onduce prin îndepărtarea solvenului la (S)-bufuralol pur cu randament de 35% yield (raportat la (R)-**8**).

#### 5. Sinteza (R)-bufuralolului din bromohidrina acilată (S)-**9a,b**

Se adaugă în soluția bromohidrinei acilate (350 mg) în etanol (10 mL), LiOH×H<sub>2</sub>O (1.2 equiv) și după circa 20 minute se observă cromatografic transformarea complete în epoxid. Se adaugă soluție saturate de NaHCO<sub>3</sub> s (2 mL) și se distilă la vid etanolul. Reziduul se spală cu saramură (2 mL) și se extrage cu dietil eter (3×10 mL). Din fazele organice reunite uscate se obține prin concentrare epoxidul brut (R)-**12**. Peste acest amestec (circa 200 mg) se adaugă *tert*-butilamina (300 μL, 3 mmol) și se perfectează reacția sub agitare peste noapte. Se distilă la vid amina în exces și se obțin după purificarea cromatografică (diclorometan-metanol, 8:2 (v/v) ca eluent) 158 mg (R)-Bufuralol (randament 54%).

#### 6. Sinteza (S)-bufuralolului din (R)-8 prin intermediul epoxidului (S)-**12**

În soluția (R)-**8** (200 mg) în DIPE (5 mL), se adaugă CaL-A adsorbită pe Celita (50 mg) și dodecanoat de vinil (330 μL, 2 equiv.); reacția se perfectează sub agitare la temperatură camerei, aproximativ 16 ore. După filtrarea și spălarea enzimei cu DIPE (2× 0.5 mL) se distilăsolvenul la vid obținându-se intermediarul (R)-**9b** (325 mg, 97%) care se utilizează ca atare în reacția de sinteză a (S)-epoxidului (S)-**12** și a (S)-bufuralolului, similar cu obținerea enantiomerului R prezentată anterior în paragraful 4.

## 5. BIBLIOGRAFIE

1. J.G. Zeikus, M.K. Jain, P. Elankovan - *Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products*, Applied Microbiology in Biotechnology 1999, 51, 345-352.
2. T. Willke, K.D. Vorlop - *Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry*, Applied Microbiology in Biotechnology 2004, 66, 131-142.
3. H. Song, S.Y. Lee - *Production of succinic acid by bacterial fermentation*, Enzyme and Microbial Technology 2006, 39, 352-361.
4. Y.P. Liu, P. Zheng, Z.H. Sun, Y. Ni, J.J. Dong, L.L. Zhu - *Economical succinic acid production from cane molasses by Actinobacillus succinogenes*, Bioresource Technology 2008, 99, 1736-1742.
5. D. Cașcaval, A.I. Galaction - *The European colour of biotechnology is white*, Romanian Biotechnology Letters 2007, 12(6), 3489-3494.
6. N.O. Van Gylswyk - *Succiniciclasticum ruminis gen-nov, sp-nov, a ruminal bacterium converting succinate to propionate as the sole energy-yielding mechanism*, International Journal of Systematic Bacteriology 1995, 45, 297-300.
7. M. Inui, S. Murakami, S. Okino, H. Kawaguchi, A.A. Verties, H. Yukawa - *Metabolic analysis of Corynebacterium glutamicum during lactate and succinate production under oxygen deprivation conditions*, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 2004, 7, 182-196.
8. S.K. Moon, Y.J. Wee, J.S. Yun, H.W. Ryu - *Production of fumaric acid using rice brain and subsequent conversion to succinic acid through a two-step process*, Applied Biochemistry and Biotechnology 2004, 113-116, 834-855.
9. J.B. McKinlay, J.G. Zeikus, C. Vieille - *Insights into Actinobacillus succinogenes fermentative metabolism in a chemically defined growth medium*, Applied and Environmental Microbiology 2005, 71, 6651-6656.
10. Y.P. Liu, P. Zheng, Z.H. Sun, Y. Ni, J.J. Dong, P. Wei - *Strategies of pH control and glucose-fed batch fermentation for production of succinic acid by Actinobacillus succinogenes CGMCC1593*, Journal of Chemical Technology & Biotechnology 2008, 83, 722-729.
11. H. Song, S.H. Jang, J.M. Park, S.Y. Lee - *Modeling of batch fermentation kinetics for succinic acid production by Mannheimia succiniciproducens*, Biochemical Engineering Journal 2008, 40, 107-115.
12. R.I. Corona-Gonzalez, A. Bories, V. Gonzalez-Alvarez, C. Pelayo-Ortiz - *Kinetic study of succinic acid production by Actinobacillus succinogenes ZT-130*, Process biochemistry 2008, 43, 1047-1053.
13. S.K.C. Lin, C. Du, A. Koutinatis, R. Wang, C. Webb - *Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by Actinobacillus succinogenes*, Biochemical Engineering Journal 2008, 41, 128-135.
14. M.P. Dorado, S.K.C. Lin, A. Koutinatis, C. Du, R. Wang, C. Webb - *Cereal-based biorefinery development: Utilisation of wheat milling by-products for the production of succinic acid*, Journal of Biotechnology 2009, 143, 51-59.
15. Q. Li, D. Wang, Y. Wu, M. Yang, W. Li, J. Xing, Z. Su - *Kinetic evaluation of products inhibition to succinic acid producers Escherichia coli NZN111, AFP111, BL21, and Actinobacillus succinogenes 130ZT*, Journal of Microbiology 2010, 48, 290-296.
16. P. Zheng, L. Fang, Y. Xu, J.J. Dong, Y. Ni, Z.H. Sun - *Succinic acid production from corn stover by simultaneous saccharification and fermentation using Actinobacillus succinogenes*, Bioresource Technology 2010, 101, 7889-7894.
17. Y. Arikawa, T. Kuroyanagi, M. Shimosaka, H. Muratsubaki, K. Enomoto, R. Kodaira, M. Okazaki - *Effect of gene disruptions of the TCA cycle on production of succinic acid in Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Bioscience and Bioengineering 1999, 87, 28-36.
18. E.T.M. Ling, J.T. Dibble, M.R. Houston, L.B. Lockwood, L.P. Elliott - *Accumulation of 1-trans-2,3-epoxysuccinic acid and succinic acid by Paecilomyces varioti*, Applied and Environmental Microbiology 1978, 35, 1213-1215.
19. M. McIntyre, B. McNeil - *Effects of elevated dissolved CO<sub>2</sub> levels on batch and continuous cultures of Aspergillus niger A60: an evaluation of experimental methods*, Applied and Environmental Microbiology 1997, 63, 4171-4177.
20. H. David, M. Akesson, J. Nielsen - *Reconstruction of the central carbon metabolism of Aspergillus niger*, Journal of Dairy Science 2003, 270, 4243-4253.
21. A. Vlysidis, M. Binns, C. Webb, C. Theodoropoulos - *Utilisation of glycerol to platform chemicals within the biorefinery concept: A case for succinate production*, Chemical Engineering Trans. 2009, 18-26.
22. J. Li, M. Jiang, C. Chen, L. Shang, P. Wei, H.Y.Q. Ye, P. Ouyang, H. Chang - *Enhanced production of succinic acid by Actinobacillus succinogenes with reductive carbon source*, Process Biochemistry 2010, 45, 980-985.
23. K. Chen, M. Jiang, P. Wei, J. Yao, H. Wu - *Succinic acid production from acid hydrolysate of corn fiber by Actinobacillus succinogenes*, Applied Biochemistry and Biotechnology 2010, 160, 477-485.
24. S.E. Urbance, A.L. Pometto III, A.A. DiSpirito, A. Demirci - *Medium evaluation and plastic composite support ingredient selection for biofilm formation and succinic acid production by Actinobacillus succinogenes*, Food Biotechnology 2003, 17(1), 53-65.

25. S.E. Urbance, A.L. Pometto III, A.A. DiSpirito, Y. Denli - *Evaluation of succinic acid continuous and repeat-batch biofilm fermentation by Actinobacillus succinogenes using plastic composite support bioreactors*, Applied Biochemistry and Biotechnology. 2004, 65, 664-670.
26. (a) Zaidlewicz, M.; Tafelska-Kaczmarek, A.; Prewysz-Kwinto, A.; Chechłowska, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 1659-1664; (b) Hou, X.-L.; Yang, Z.; Wong, H. N. C. In *Progress in Heterocyclic Chemistry*; Gribble, G. W.; Gilchrist, T. L., Eds.; Furans and Benzofurans; Pergamon: Oxford, **2002**; Vol. 14, pp. 139-179.
27. (a) Fothergill, G. A.; Osbond, J. M.; Wickens, J. C. *Arzneim.-Forsch. Drug. Res.* **1977**, 27, 978-981; (b) Blaber, L. C.; Burden, D. T.; Eigeumann, R.; Gerold, M. *Cardiovasc. Pharmacol.* **1984**, 6, 165-175.
28. (a) Magometschnigg, D.; Bonelli, J.; Hitzenberger, G.; Kaik, G.; Korn, A. *Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm.* **1978**, 16, 54-58; (b) Magometschnigg, D.; Bonelli, J.; Kaik, G.; Rameis, H. *Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm.* **1979**, 17, 334-340.
29. Li, D. N.; Pritchard, P. M.; Hanlon, S. P.; Burchell, B.; Wolf, C. R.; Friedberg, T. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, 289, 661-667.
30. Narimatsu, S.; Takemi, C.; Kuramoto, S.; Tsuzuki, D.; Hichiya, H.; Tamagake, K.; Yamamoto, S. *Chirality* **2003**, 15, 333-339.
31. Pruksaritanont, T.; Dwyer, L. M.; Cribb, A. E. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 50, 1521-1525.
32. Kwak, S.H.; Lee D.M.; Lee K.I. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 2639-2645.
33. Zaidlewicz, M.; Tafelska-Kaczmarek, A.; Prewysz-Kwinto, A. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, 16, 3205-3210.
34. Tafelska-Kaczmarek, A.; Prewysz-Kwinto A.; Skowerski, K.; Petrasiak, K.; Kozakiewicz, A.; Zaidlewicz, M. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, 21, 2244-2248.
35. Johnston, V.E.; Bogár, K; Bäckvall, J.E. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 4596-4599.
36. Mo, K.; Yang, Y.; Cui, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136(5), 1746-1749.
37. Hull, J.D.; Scheinmann, F.; Turner, N.J. *Tetrahedron Asymmetry* **2003**, 14, 567-576.
38. Paizs, C. Toşa, M. I., Majdik, C., Bodai, V., Novák, L., Irimie, F. D., Poppe, L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2002**, 21, 2000-2002.
39. (a) Podea, P.V., Paizs, C., Toşa, M.I., Irimie, F.D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19(16), 1959-1964; (b) Bencze, L.C., Paizs, C., Toşa, M.I., Irimie, F.D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, 21(3), 356-364.
40. Paizs, Cs.; Tosa, M.; Majdik, C.; Moldovan, P.; Novák, L.; Kolonits, P.; Marcovici, A.; Irimie, F. D.; Poppe, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 1495-1501.
41. Martonelli, J.M.; Nayyar, K.N.; Moher, D.E.; Dhokte, P.U.; Pawlak, M.J.; Vaidyanathan, R. *Organic Letters* **1999**, 1(3), 447-450.

## DISEMINAREA REZULTATELOR CERCETĂRII AFERENTE ETAPEI DIN ANUL 2014

Rezultatele obținute în urma investigațiilor experimentale originale proprii etapei derulate în anul 2014, precum și în cadrul etapelor anterioare, au fost incluse în:

- **2 articole publicate și unul acceptate în reviste cotate ISI (factor de impact cumulativ 4,198, scor relativ de influență cumulativ 2,879)**

1. Botond Nagy, Norbert Dima, Csaba Paizs, Jürgen Brem, Florin Dan Irime, Monica Ioana Toșa (2014), New chemo-enzymatic approaches for the synthesis of (*R*)- and (*S*)-bufuralol, *Tetrahedron: Asymmetry*, 25, 1316-1322 (IF: 2,097, SRI: 1,266)
2. Anca-Irina Galaction, Ramona Mihaela Matran, Marius Turnea, Alexandra Cristina Blaga, Dan Cașcaval (2014): Engineering aspects of Penicillin G transfer and conversion to 6-Aminopenicillanic acid in bioreactor with mobile bed of immobilized penicillinamidase, *Chem. Eng. Commun.* 201(12), 1568-1581 (IF: 0,788, SRI: 0,749).
3. Dan Cașcaval, Ramona Mihaela Matran, Marius Turnea, Anca-Irina Galaction, Alexandra Cristina Blaga (2014): Distribution of mixing efficiency in a split-cylinder gas-lift bioreactor for *Yarrowia lipolytica* suspensions, *Canadian Journal of Chemical Engineering* accepta spre publicare, DOI:10.1002/cjce.22107 (IF: 1,313, SRI: 0,864).

- **11 participări (postere și comunicări) la manifestări științifice internaționale**

1. Lenuta Kloetzer, Alexandra Cristina Blaga, Anca-Irina Galaction, Marius Turnea, Alexandra Carlescu, Dan Cașcaval: Comparative analysis of lipids biodegradation with immobilized *Bacillus spp.* cells in a bioreactor with mobile bed vs. basket bioreactor, *International Conference On Advances In BioInformatics Bio-Technology And Environmental Engineering*, Londra, 1-2 Iunie 2014, UK.
2. Alexandra Cristina Blaga, Alexandra Cârlescu, Marius Turnea, Anca-Irina Galaction, Dan Cașcaval: Evaluation of mixing and oxygen transfer performances for a stirred bioreactor containing *P. chrysogenum* broths, *International Conference on Chemical and Pharmaceutical Engineering*, Copenhaga, 13-14 Iunie 2014.
3. Moisă Mădălina Elena, Paizs Csaba, Toșa Monica Ioana, Irime Florin Dan: Stereoselective Enzymatic Synthesis of  $\beta$ -Amino Acid Derivatives, *14<sup>th</sup> International Symposium and Summer School on Bioanalysis*, Smolenice, 28.06-06.07.2014, Slovakia, P33
4. Paula Podea, Ioana Donca, Sonia Suvar, Monica Culea, Florin Dan Irime: Extraction and Analysis of Essential Oils from *Cuminum cyminum* and *Carum carvi* seeds, *14<sup>th</sup> International Symposium and Summer School on Bioanalysis*, Smolenice, 28.06-06.07.2014, Slovakia, P37.
5. Anca-Irina Galaction, Alexandra Cristina Blaga, Marius Turnea, Dan Cașcaval, Ramona Mihaela Matran: Succinic acid production in a bioreactor with mobile bed of immobilized *A. succinogenes*, *International Conference on Chemical and Food Engineering, ICCFE 2014*, Paris, 21-22 Iulie 2014.
6. Alexandra Cristina Blaga, Ramona Mihaela Matran, Anca-Irina Galaction, Marius Turnea, Lenuta Kloetzer, Dan Cașcaval, Analysis of mixing intensity and distribution in a split-cylinder gas-lift bioreactor for *Yarrowia lipolytica* cells suspensions, *European Symposium on Biochemical Engineering Sciences, Bioenergy and Biomolecules ESBES 2014*, Lille, 08 - 10 Septembrie 2014.
7. Alexandra Cristina Blaga, Marius Turnea, Dan Cașcaval, Alexandra Tucaliuc, Anca-Irina Galaction, Les aspects de diffusion dans la production d'acide succinique avec des cellules d'*Actinobacillus succinogenes* immobilisées dans une couche mobile, *LE HUITIÈME COLLOQUE FRANCO-ROUMAIN DE CHIMIE APPLIQUÉE COFrRoCA 2014*, Montpellier, 15-17 Septembrie 2014.
8. Ramona Mihaela Matran, Alexandra Cristina Blaga, Marius Turnea, Anca-Irina Galaction, Dan Cașcaval, Studies on mixing efficiency and its distribution in *Yarrowia lipolytica* suspensions for a split-cylinder gas-lift bioreactor, *2nd International Conference on Chemical Engineering*, Iasi, 5 - 7 Noiembrie 2014.
9. Alexandra Tucaliuc, Alexandra Cristina Blaga, Marius Turnea, Anca-Irina Galaction, Dan Cașcaval, Engineering aspects of degradation of lipids from olive oil mill wastewaters in a stationary basket bioreactor with immobilized *Bacillus spp.*, *2nd International Conference on Chemical Engineering*, Iasi, 5 - 7 Noiembrie 2014.
10. Alexandra Cristina Blaga, Corina Dancescu, Marius Turnea, Anca-Irina Galaction, Dan Cașcaval, Distribution of oxygen transfer rate in polyphasic system GLLS containing simulated and real fermentation broths, *2nd International Conference on Chemical Engineering*, Iasi, 5 - 7 Noiembrie 2014.
11. Norbert Dima, Botond Nagy, Csaba Paizs, Florin Dan Irime, Monica Ioana Toșa New chemo-enzymatic approaches for the synthesis of (*R*)- and (*S*)-bufuralol *2<sup>nd</sup> International Conference on Chemical Engineering*, Iasi, 5 - 7 November 2014

**ÎN CONCLUZIE, APRECIEM CĂ OBIECTIVELE ACESTEI ETAPE A PROIECTULUI AU FOST ATINSE ÎN TOTALITATE, APRECIERE SUSȚINUTĂ DE PRODUCȚIA ȘTIINȚIFICĂ DIN ACEST AN A ECHIPEI DE CERCETARE A CONSORȚIULUI IMPLICAT ÎN REALIZAREA PROIECTULUI.**

**Conf. Dr. Ing. Monica Ioana TOȘA**