RAPORT ŞTIINŢIFIC ŞI TEHNIC 2017

Programul: Parteneriate in domenii prioritare, contract nr. 206/01/07.2014
Denumirea programului: Kit inovativ în sinteza compuşilor chimici optic puri prin combinarea biocatalizei cu procesarea prin reacţii tip click
Acronim proiect: BIOCLICK

Etapa 4. Prelucrarea de tip click a produşilor cu puritate enantiomerică ridicată.

Rezumatul etapei

A fost continuată şi optimizată sinteza şi purificarea unor substraturi modificate cu grupări azidice de tipul propiniloxi-acetaţilor racemici, în vederea utilizării acestora în reacţii de tip click. Aceştia au fost utilizaţi atât pentru stabilirea metodelor de separare cromatografică chirală cât şi pentru elaborarea protocolului de separare bazat pe reacţii click. Conform acestui protocol, compusul racemic având o grupare OH secundară a fost supus rezoluţiei cinetice mediate de lipaze în prezenţa unui ester având grupare etinilică terminală, iar esterul optic activ rezultat a fost mai departe transformat într-un compus triazolic ciclic prin reacție cu o azidă. Pentru etapa de separare a produşilor EKR prin reacţii tip click s-a ales (2-azido-etil)-dietilamina, o amină terţiară funcţionalizată cu grupare azido care prezintă avantajul că poate fi extrasă într-o soluţie apoasă acidă. Astfel, separarea produșilor de reacție s-a realizat printr-o simplă extracţie, iar cel de-al doilea enantiomer al substratului inițial a fost obținut prin alcooliza enzimatică a legăturii esterice a compusului triazolic format.

Metodologia click a fost utilizată pentru separarea produșilor reacţiilor de acilare enzimatică a substraturilor sintetizate în laborator, care au fost operate inclusiv la scară preparativă, în condiţiile de reacţie optime identificate la scară analitică. Au fost sintetizaţi cu purităţi optice ridicate (93-99%) şi randamente între 90-95% o serie de compuşi heteroaromatici.

A fost testată eficiența unor preparate enzimatice imobilizate prin metoda sol-gel în reacții de rezoluție cinetică enzimatică în sistem continuu, atât pentru substraturi alifatice cât și aromatice. În cazul rezoluției cinetice a etanolilor heteroaromatici, lipaza CalB imobilizată prin entrapare în sistem ternar sol-gel s-a dovedit a fi superioară lipazei din *Pseudomonas fluorescens* imobilizată prin entrapare în sistem binar sol-gel, astfel încât la 65 °C s-a atins o conversie de două ori mai mare (41% vs. 20%). Enantioselectivitatea reacţiilor enzimatice a fost maximă (E » 200) pe tot domeniul de temperaturi investigat.

Pentru rezoluția cinetică enzimatică a acidului *rac*-2-cloromandelic lipaza din *Candida anatractica* A s-a dovenit activă, iar dintre preparatele imobilizate entraparea în matrici de sol-gel utilizând amestec ternar de silani combinată cu adsorbție pe Celite s-a dovedit cea mai eficientă. Parametrii optimi determinați au condus la o productivitate de 1.7 μmoli min^{-1} g^{-1}.

Pentru două dintre substraturile testate, reacțiile au fost optimizate prin programe experimentale factoriale utilizând metoda Box-Behnken. Valorile productivității pentru ambele substraturi au fost considerabil mai mari decât cele raportate în literatură, demonstrând eficența și stabilitatea biocatalizatorului. În cazul acilării enatioselective a *rac*-2-octanolului condițiile optime au fost concentrația substratului 0.5 M, temperatura 50°C, debit 0.8 ml/min. După 144 h de reacție în sistem continuu s-a obținut o productivitate medie de 145 μmoli min^{-1} g^{-1} și un raport enantiomeric mai mare de 280.

Rezultatele acestei etape au fost diseminate prin publicarea a trei lucrări ştiinţifice în reviste cu factor de impact (ISI) şi prin prezentarea a două lucrări, la o conferinţă internaţională de prestigiu din domeniul biocatalizei şi la o conferinţă internă. În concluzie, se poate afirma că obiectivele asumate pentru Etapa a 4-a a proiectului au fost îndeplinite.

Descrierea ştiinţifică şi tehnică

Activitatea 4.1. Separarea amestecurilor obţinute în urma rezoluţiei cinetice enzimatice prin reacţii de tip click

Sinteza unor substraturi modificate cu grupari azidice.

- Date în curs de publicare -

Activitatea 4.2. Studiul rezoluţiei cinetice enzimatice utilizând un bioreactor continuu-Partea II

Acilarea enzimatică în sistem continuu a *rac*-2a cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil, mediată de CaL-B-SWCNT

Pentru acilarea enzimatică în sistem continuu a ***rac*-2a** s-a utilizat un mini-reactor tubular cu deplasare (30 × 4.6 mm) în care s-a introdus biocatalizatorul CaL-B-SWCNT (119 mg), alimentat continuu cu soluţia formată din substratul (*rac*-1-feniletanol *rac*-**2a**), agentul de acilare (2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil) şi *n*-hexan. S-au luat probe pentru HPLC din timp în timp pentru a verifica atingerea regimului staţionar şi pentru a determina conversia. Temperatura de operare a fost de 60°C, s-au testat diferite concentraţii de substrat *rac*-**2a** (10 - 100 mM), diferite cantităţi de agent de acilare 0.75 – 4 echiv.) şi diferite debite (0.1 – 0.5 mL min^{-1}).

Iniţial reacţia de acilare enzimatică a *rac*-**2a** în sistem continuu a fost studiată utilizând concentraţia substratului de 10 mM şi 0.75 echiv. agent de acilare la 60 °C şi debite de 0.1-0.5 mL min^{-1}. Conversia maximă a fot de 42% la 0.1 mL min^{-1}. În scopul creşterii conversiei reacţiei s-au testat diferite cantităţi de agent de acilare (2, 3 şi 4 echiv.). Rezultatele sunt prezentate în **Figura 1**. Conversia maximă (50%) a fost atinsă cu excese mari de agent de acilare (3 şi 4 echiv.).

Pentru a mări productivitatea procesului studiat, s-au investigat diferite concentraţii de substrat utilizând 4 echiv. de agent de acilare la 60 °C la debite de 0.1 şi 0.5 mL min^{-1} (**Tabelul 10**). Productivitatea a crescut o dată cu creşterea concentraţiei substratului, valoarea maximă obţinându-se la concentraţia de 100 mM şi 0.5 mL min^{-1} (88.2 μmol min^{-1} g^{-1}).

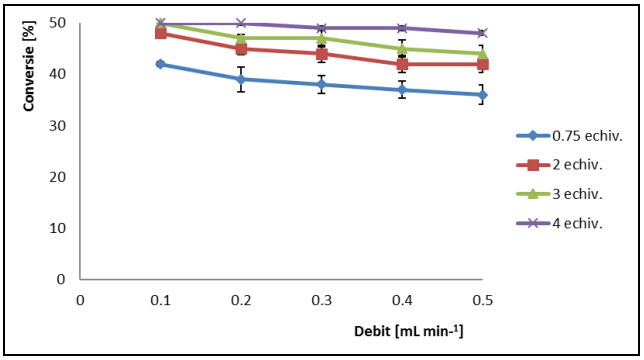

Figura 1. Influenţa cantităţii de agent de acilare asupra rezoluţiei cinetice în sistem continuu a *rac*-**2a** (10 mM) cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil în *n*-hexan la 60 °C mediată de CaL-B-SWCNT

Tabelul 10. Influenţa debitului şi a concentraţiei substratului asupra rezoluţiei cinetice în sistem continuu a *rac*-**2a** cu 2-(prop-2-in-1-iloxi)acetat de 2,2,2-trifluoroetil (4 echiv.) mediată de CaL-B-SWCNT în *n*-hexan la 60 °C

Nr. crt.	Debit [mL min^{-1}]	Concentraţia substratului [mM]	Conversie (%)[a]	Productivitate [µmol min^{-1} g^{-1}][b]
1	0.1	10	50 (± 0.5)	4.2
2		20	48 (± 0.5)	8.1
3		50	48 (± 0.8)	20.2
4		100	45 (± 2.1)	37.8
5	0.5	10	48 (± 0.5)	20.2
6		20	40 (± 1.4)	33.6
7		50	29 (± 1.4)	60.9
8		100	21 (± 2.2)	**88.2**

[a] experimentele s-au realizat în triplicat şi deviaţiile standard sunt trecute în paranteze; [b] calculate utilizând valorile medii ale conversiilor

Un alt scop a fost compararea productivităţilor în sistem discontinuu şi continuu. Preparatul enzimatic CaL-B-SWCNT a prezentat productivitate mult mai mare în sistem continuu decât în sistem discontinuu ($r_{discont}$= 1.0 µmol min^{-1} g^{-1}, r_{cont} = 17.6 µmol min^{-1} g^{-1}, la conversia de 42%, 60 °C, concentraţia substratului 10 mM, 2 echiv. agent de acilare şi debit de 0.5 mL min^{-1}).

Acilarea mediată de lipaze imobilizate a unor etanoli heteroaromatici în sistem continuu

Preparatele de lipaze imobilizate prin entrapare în matrici de sol-gel care au dovedit cele mai bune performanţe (activitate, enantioselectivitate şi stabilitate) în reacţiile în sistem discontinuu (CaL-B 1 TS* şi AK 1 BS) au fost testate şi în sistem continuu utilizând microreactoare tubulare. Substraturile investigate au fost *rac*-1-benzofuran-2- şi 3-il-etan-1-olii *rac*-**2c,d** şi rac-acid-2-cloromandelic (**Figura 2**).

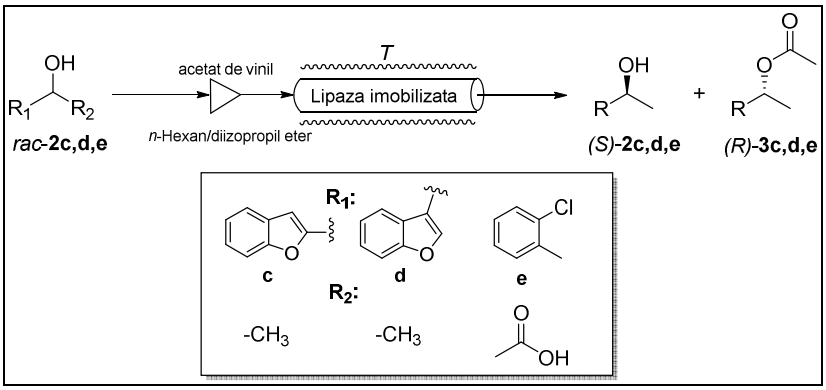

Figura 2. Rezoluţia cinetică enzimatică a benzofuranil-etanolilor în sistem continuu

Iniţial s-au testat temperaturi în intervalul 25- 65 °C pentru reacţiile în sistem continuu de acilare enzimatică a substraturilor *rac*-**2c,d** (10 mM) la debitul de 0.5 mL min^{-1}. În cazul ambelor preparate enzimatice s-a observat o creştere a conversiei odată cu creşterea temperaturii, valoarea maximă obţinându-se la 65 °C. Lipaza B din *Candida antarctica* imobilizată prin entrapare în matrici de sol-gel sistem ternar (CaL-B 1 TS*) s-a dovedit a fi superioară lipazei din *Pseudomonas fluorescens* imobilizată prin entrapare în sistem binar sol-gel (AK 1 BS): la 65 °C s-a atins o conversie de două ori mai mare (41% vs. 20%) (**Figura 3A**). Enantioselectivitatea reacţiilor enzimatice a fost maximă (*E* » 200) pe tot domeniul de temperaturi investigat.

În scopul creşterii conversiei reacţiilor de transesterificare investigate au fost testate diferite debite între 0.1 – 0.5 mL min^{-1}, menţinând temperatura la 65 °C, ceea ce a condus la conversii aproape maxime (48% şi 50%, **Figura 3B**).

În continuare, pentru a mări productivitatea sistemelor continue studiate, s-au investigat diferite concentraţii de substrat la 65 °C la debite de 0.1 şi 0.5 mL min^{-1} (**Figura 3C**). În cazul reacţiilor mediate de CaL-B 1 TS* nu s-au observat scăderi semnificative ale conversiei pe domeniul de concentraţii 10- 50 mM la debitul de 0.1 mL min^{-1}, chiar şi la concentraţia de 100 mM conversia fiind ridicată (44%). Pe de altă parte, pentru reacţiile catalizate de AK 1 BS conversia a scăzut o dată cu creşterea concentraţiei substratului, la 100 mM obţinându-se jumătate din valoarea conversiei de la 10 mM. Excesele enantiomerice ale produşilor au fost maxime (*ee* > 99%) pe tot domeniul de concentraţii investigat.

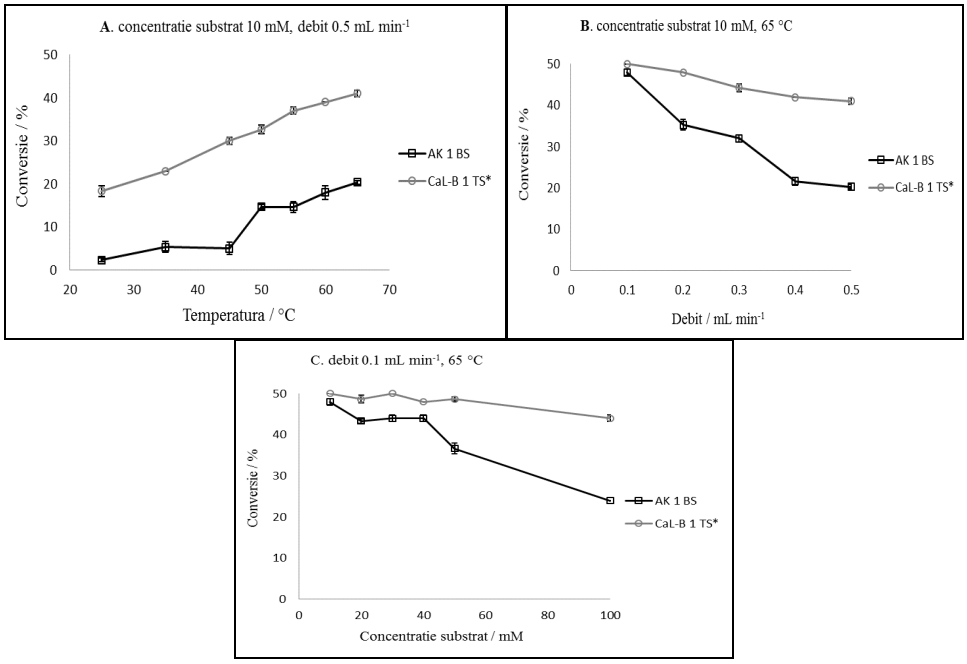

Figura 3. Efectul temperaturii (**A**), debitului (**B**) şi concentraţiei substratului (**C**) asupra reacţiilor de acilare enzimatică în sistem continuu a *rac*-**2c,d** cu acetat de vinil (0.75 şi respectiv 3 echiv.) în *n*-hexan catalizate de lipazele AK 1 BS (–□–) şi CaL-B 1 TS* (–○–)

A fost determinată influenţa temperaturii, a debitului şi a concentraţiei substratului asupra productivităţii reacţiilor de acilare a *rac*-**2c,d** în sistem continuu (**Tabelele 1S** şi **2S,** material suplimentar).

S-a studiat de asemenea stabilitatea operaţională în sistem continuu a celor doi biocatalizatori. Preparatul AK 1 BS şi-a menţinut 81% din activitatea iniţială la 65°C după 44 h de funcţionare iar la 55°C a manifestat stabilitate foarte bună, păstrându-şi 95% din activitatea

inițială după 100 h. Biocatalizatorul CaL-B 1 TS* a manifestat stabilitate superioară întrucât la 65 °C după 100 h activitatea a rămas constantă (**Figura 4**).

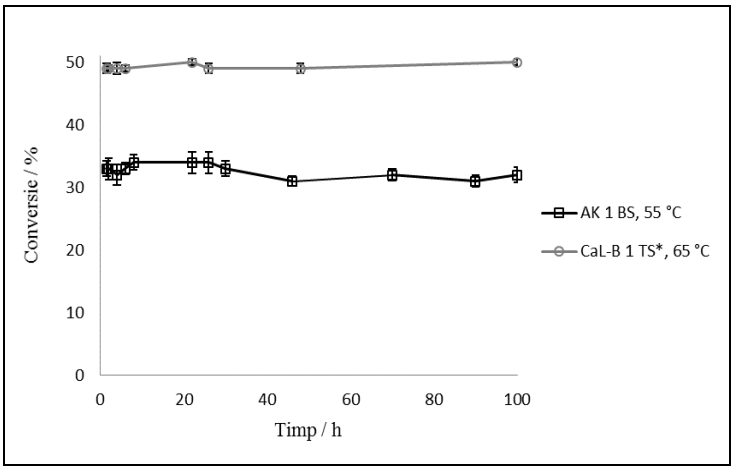

Figura 4. Stabilitatea operațională în sistem continuu a biocatalizatorilor AK 1 BS și CaL-B 1 TS* în reacțiile de acilare a *rac*-**2c,d** (10 mM) cu acetat de vinil (0.75 și respectiv 3 echiv.) în *n*-hexan la 55 °C și respectiv 65 °C la debitul de 0.1 mL min^{-1}

Rezoluția cinetică enzimatică a acidului *rac*-2-cloromandelic (*rac*-2e)

Influența metodei de imobilizare și a temperaturii asupra reacției de trasesterificare enantioselective a acidului 2-cloro mandelic.

Studiile inițiale de selecție a biocatalizatorului pentru substratul *rac*-acid-2-cloro-mandelic (*rac*-**2e**) au indicat o eficiență ridicată în reacția de transesterificare enantioselectivă a lipazei din *Candida antarctica* A (CalA). Pentru a studia efectul metodei de imobilizare asupra enantioselectivității lipaza CalA a fost imobilizată prin două metode de entrapare în matrici de sol-gel, obținute cu diferite combinații de silani precursori. Rezultatele, prezentate în **Tabelul 11** indică un efect puternic al metodei de imobilizare asupra conversiei și a raportului enantiomeric. Cele mai bune rezultate, conversie de 48% și *ee* de 86%, au fost obținute când biocatalizatorul a fost imobilizat utilizând un amestec ternar de silani precursori PhTMOS:VTMOS:TMOS in 1.6:0.4:1, utilizând NaF ca și catalizator pentru formarea matricii. Valorile *ee* obținute au fost ușor mai mari prin entraparea în matrici de sol-gel combinată cu adsorbție pe Celite 545, demonstrând eficiența metodei combinate cu adsorbție (cantitatea de enzimă utilizată a fost mai scăzută). Valorile raportului enantiomeric E obținute utilizând metoda cu NaF au fost peste 200, demonstrând fiabilitatea metodei de imobilizare .

Efectul temperaturii asupra reacției de transesterificare a fost studiat utilizând preparatele obținute prin ambele metode de entrapare la trei valori de temperatură: 20°C, 40°C și 55°C. Rezultatele prezentate în **Tabelul 11** indică o creștere a conversiei și a *ee* până la 40°C, urmată de o scădere. Considerând aceste rezultate, în experimentele ulterioare s-a lucrat la temperatura de 40°C.

Tabel 11. Efectul parametrilor de imobilizare și a temperaturii de reacție asupra eficienței catalitice și a enantioselectivității preparatului imobilizat CalA. Reacțiile de transesterificare a *rac*-**2e** cu acetat de vinil (raport molar 1:3) au fost efectuate în diizopropil eter, 24h.

Metoda	Silani precursori	Raport molar	Conversia [%]			ee_s [%]		
			20°C	40°C	55°C	20°C	40°C	55°C
A	VTMOS:TMOS	1:1	19	14	35	13	6	22
A	OcTMOS:TMOS	1:1	19	44	27	38	60	27
A	PhTMOS:TMOS	1:1	21	43	33	32	67	50
A	PhTMOS:MeTMOS: TMOS	1.6:0.4:1	24	47	30	48	82	17
A	PhTMOS:VTMOS: TMOS	1.6:0.4:1	19	48	31	32	86	44
A	PhTMOS:VTMOS: TMOS + Celite 545	1.6:0.4:1	22	48	43	31	90	86
B	OcTMOS:TMOS	1:1	31	32	39	1	3	7
B	VTMOS:TMOS	1:1	40	43	43	7	1	3
B	PhTMOS:MeTMOS: TMOS	1.6:0.4:1	45	48	49	0	0	0
B	PhTMOS:VTMOS: TMOS	1.6:0.4:1	44	47	50	0	2	0
B	PhTMOS:VTMOS: TMOS + Celite 545	1.6:0.4:1	n.d.	22	50	n.d.	0	0

n.d. - nedeterminat

Rezoluția cinetică enzimatică a *rac*-2e în sistem continuu

Reacțiile de transesterificare a acidului *rac*-2-cloromandelic în sistem continuu au fost efectuate la 40°C, în diizopropil eter, la două concentrații ale substratului (5 mM sau 10 mM), la un raport molar între reactanți de 3:1, debit 0,3 sau 0,5 ml/min. Probele colectate la un interval de 2,5 h au fost analizate prin cormatografie chirală HPLC. Conversiile nu au depășit valoarea de 30%, indicând faptul că timpul de staționare a substratului în bioreactor a fost prea scurt (**Tabelul 12**).

Tabelul 12. Influența concentrației de substrat și a debitului asupra rezoluției cinetice enzimatice *rac*-2e în sistem continuu. Experimentele au fost efectuate la 40°C la două concentrații ale substratului 5 mM respectiv 10 mM, în diizopropil eter.

Debit [ml/min]	Timp [h]	Conversia [%]		ee_s [%]		ee_p		Productivitate [μmol h^{-1} g^{-1}]	
		5 mM	10 mM	5 mM	10 mM	5 mM	10 mM	5 mM	10 mM
0.3	1.0	24	24	27	26	>99%	>99%	80	94
	1.5	22	22	39	25			31	95
	2.0	19	20	25	29			55	89
	2.5	21	19	39	20			26	67
0.5	1.0	17	25	26	19	>99%	>99%	63	78
	1.5	16	24	13	17			104	94
	2.0	18	27	12	22			122	103
	2.5	15	28	13	26			95	110

Creșterea debitului a fost benefică pentru productivitate (100 μmoli h^{-1} g^{-1}), dar nu și pentru *ee*. Totuși valorile raportului enantiomeric E au fost mai mari de 200.

Optimizarea prin design experimental a sistemului de bioreactor continuu cu enzimă imobilizată

Optimizarea rezoluției enzimatice a *rac*-2-octanolului și *rac*-1-fenil-etanolului în sistem continuu prin dezvoltarea unui program experimental factorial

Selecția lipazei imobilizate s-a realizat pe baza rezultatelor obținute în studiile preliminare în sistem discontinuu. În acest sens a fost optimizat raportul silanilor precursori, iar stabilitatea termică și capacitatea de reutilizare a preparatelor au fost caracterizate în detaliu. Dintre preparatele testate, lipaza din CalB entrapata în matricea obtinută din PhTMOS:VTMOS:TMOS la un raport molar de silani precusori de 1.6:0.4:1 a demonstrat o activitate de 1.32 mol h^{-1} mg^{-1} și un exces enantiomeric >95% pentru rezolutia cinetica a *rac*-2-octanolului, precum și o stabilitate termică excelentă în n-hexan la temperaturi de până la 70°C.

Rezolutia cinetică a *rac*-2-octanolului în sistem continuu

Reactia de acilare a *rac*-2-octanolului cu acetat de vinil a fost investigată în n-hexan la 40°C, în sistem continuu folosind un reactor de tip packed-bed umplut cu lipaza CalB imobilizată în matrici de sol-gel. Optimizarea parametrilor care influențează reacția de acilare s-a realizat prin dezvoltarea unui program experimental factorial, utilizând metoda Box-Behnken. Variabilele independente selectate au fost: debitul, temperatura, concentratia substratului și raportul molar (substrat/acetat) iar limitele maxime si minime au fost stabilite pe baza rezultatelor obținute în sistem discontinuu. Ca și variabile de răspuns au fost selectatate următoarele mărimi: excesul enantiomeric ee_p (%), raportul enantiomeric E si productivitatea mol min^{-1} g^{-1}.

Rezultatele obținute experimental după primul set de 27 de experimente (**Tabelul 3S,** material suplimentar) au fost analizate statistic folosind tehnica ANOVA, analiza efectelor și analiza suprafetelor de răspuns. Dintre modelele predefinite disponibile în pachetul Unscrambler®, cea mai mare valoare a coeficientului de corelare 0,918 a fost obținut pentru modelul pătratic.

Rezultatele analizei statistice (valoarea p, testul t si limitele de incredere pentru fiecare efect) când productivitatea a fost selectată ca și variabilă de răspuns (**Tabelul 4S**, material suplimentar) valorile p au fost mai mici de 0.05 pentru debit și concentratia de substrat, demonstrand ca modelul este important din punct de vedere statistic si ca variabilele sunt corelate.

Analiza efectelor s-a realizat pentru variabilele de ieșire calculate pe baza analizelor GC pentru fiecare variabilă independentă selectată. Rezultatele, prezentate în **Tabelul 13** indică o corelare directă a debitului și a concentratiei de substrat cu E si productivitatea. În ceea ce privește temperatura, s-a observat o corelatie indirectă cu E în timp ce efectul raportului molar al reactanților a fost nesemnificativ.

Tabelul 13. Analiza efectelor asupra variabilelor de răspuns pentru primul design experimental de rezoluție cinetică a substratului *rac*-2-octanol (N.S. - nesemnificativ)

Variabilă	E	Productivitate [mol min^{-1} g^{-1}]
(A) Debit [ml/min]	+	+++
(B) Concentrație substrat [M]	+++	+++
(C) Temperatură [°C]	–	N.S.
(D) Raport molar reactanți	N.S.	N.S.
AB	N.S.	N.S.
AC	N.S.	N.S.
AD	N.S.	N.S.
BC	N.S.	+
BD	N.S.	N.S.
CD	N.S.	N.S.

Analiza suprafețelor de răspuns Pentru a determina influența debitului și a concentrației de substrat asupra productivității, raportului enantiomeric E și a excesului enantiomeric ee_p s-a realizat analiza suprafețelor de răspuns. Rezultatele au indicat o creștere continuă, atât pentru productivitate cât și pentru raportul enantiomeric, pentru tot intervalul studiat, pentru ambii parametri selecați (**Figurile 1S și 2S**, material suplimentar).Aceste rezultate au sugerat că valorile optime pot fi obținute la valori mai mari ale debitului și ale concentrației de substrat, de aceea s-a generat un nou set de experimente.

Al doilea program experimental factorial a fost realizat folosind trei variabile independente: temperatura în intervalul 40–60°C, debitul și concentrația de substrat (in intervalul 0,5-1,25 ml min^{-1}, respectiv 0.5–1.25 M). Variabilele de raspuns au fost raportul enantiomeric E și productivitatea. Pentru toate experimentele, valorile excesului enatiomeric ee_p au fost mai mare de 88%. Rezultatele experimentale obținute (**Tabelul 5S**, material suplimentar) au fost supuse analizei statistice folosind tehnica Anova, analizei efectelor și analizei suprafețelor de răspuns. Valoarea celui mai mare coeficient de regresie a fost 0,969, acesta fiind obținut când a fost ales modelul predefinit pătratic. Valorile p pentru termenii debit si concentratia substratului au fost mai mici de 0,05 **(Tabelul 6S,** material suplimentar).

Analiza efectelor (**Tabelul 14**) indică faptul că debitul și concentrația substratului au efect semnificativ și sunt corelate direct cu creșterea productivității. Pentru concentrația de substrat s-a obținut o corelare indirectă cu conversia, excesul enantiomeric și raportul enantiomeric E, stabilindu-se o valoare optimă a acestui parametru.

Tabelul 14. Analiza efectelor asupra variabilelor de răspuns

Variabile	E	Productivitate [mol min^{-1} g^{-1}]
Debit [ml/min]	–	++
Concentrația de substrat [M]	–	++
Temperatura [°C]	N.S.	++

Pentru a elucida și a întelege mai bine efectele variabilelor studiate asupra variabilelor de răspuns au fost reunite toate datele de la ambele experimente, generând grafice ale suprafețelor de răspuns. Reprezentarea valorilor productivității în funcție de concentrația de substrat și debit indică o crestere continuă a stabilității și performanței biocatalizatorului la concentratii mai mari de 1.25 M (**Figura 5a**). Spre deosebire productivitate, dependența raportului enantiomeric E ca o funcție a aceloraşi parametri a permis stabilirea valorilor optime de 0.5 M pentru concentratia de substrat și 0.8 mL/min pentru debit (**Fig. 5b**.).

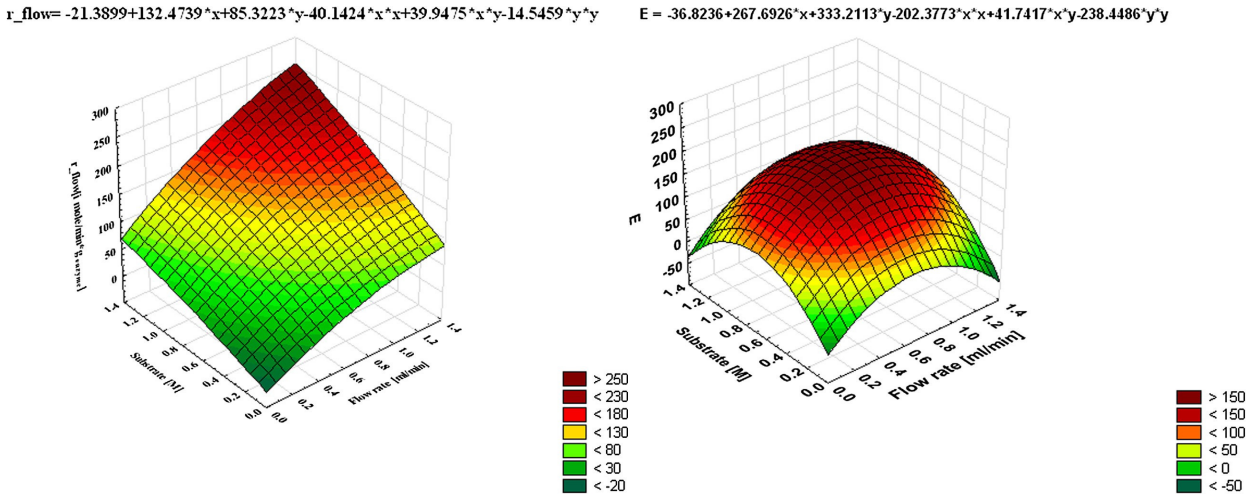

Figura 5. Efectul combinat al concentrației de substrat și debit asupra productivității (a) Efectul combinat al concentrației de substrat și debit asupra E (b) asupra rezoluției enzimatice a *rac*-2-octanolului.

Rezolutia cinetică enzimatică a *rac*-1-feniletanolului

În acest studiu, rezoluția cinetica a *rac*-1-feniletanolului a fost efectuată în sistem continuu, folosind același bioreactor utilizat și în studiile anterioare cu lipaza Cal B imobilizată prin entrapare in sol-gel și NaF ca și catalizator. Optimizarea condițiilor de reacție s-a realizat printr-un program experimental Box-Behnken. Studiile au fost efectuate la temperaturi în intervalul 40-60°C, debitul în intervalul 0.3-1.25 mL/min și concentratia de substrat în domeniul 0.05M-1.25M. Rezultatele (prezentate în **Tabelul 7S**, material suplimentar) au fost supuse analizei ANOVA și RSM. Valoarea de corelare a coeficientului de regresie de 0.996 obtinută prin potrivirea rezultatelor productivității cu modelul pătratic indică o predicție bună a modelului comparativ cu datele experimentale. Valorile foarte scăzute ale lui p (**Tabel 8S**, material suplimentar) obținute pentru toate cele trei variabile independente selectate și pentru efectul combinat au indicat că acești parametrii au importanță statistică semnificativă și influențează procesul. Valoarea optimă a productivității rezultată din optimizare a fost 104,3 mol min^{-1} g^{-1} și această valoare poate fi atinsă la o concentrație de substrat de 0,9 M, debit de 1.05 ml/min și 40°C. Graficul suprafeței de răspuns pentru E ca funcție a debitului și a concentrației de substrat (**Figura 3S**, material suplimentar) a indicat o scădere a valorii E, dacă valorile parametrilor independenți cresc peste o anumita limită. Pentru a atinge valoarea dorită a enantioselectivitatii (E>200), debitul și concentratia de substrat nu trebuie să depășească 0.45 ml/min, respectiv o concentratie de 0.2M. În acest caz poate fi atinsă o valoare rezonabilă a productivității, de 40.4 mol min^{-1} g^{-1}.

Determinarea productivității bioreactorului continuu în condiții operaționale optime

Pentru determinarea productivitații în condiții operaționale optime a fost selectată reacția de acilare a *rac*-2-octanolului în sistem continuu, folosind parametri optimizați anterior. Rezultatele sunt prezentate in **Figura 6,** observându-se că timp de 144 de ore de reactie s-au obtinut valori constante ale productivității, de aproximativ 145 mol min^{-1} g^{-1} și un raport enantiomeric E > 280, demonstrând o stabilitate operațională excelentă a biocatalizatorului imobilizat.

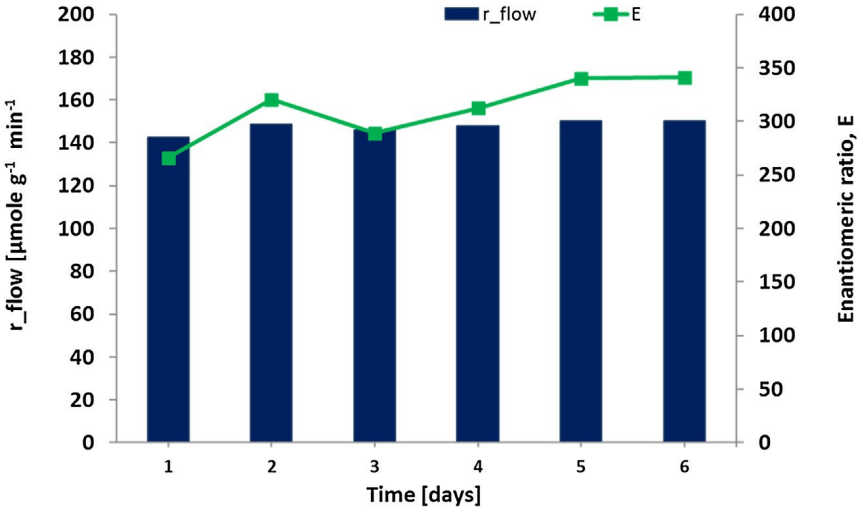

Figura 6. Diagrama productivitatii (r_{flow}) si enantioselectivitatea (E) vs. timp într-un sistem continuu, folosind un reactor multitubular pentru rezoluția cinetică a *rac*-2-octanolului.

<u>Activitatea 4.3.</u> Dezvoltarea unei procedeu de tip click pentru prelucrarea produşilor cu puritate enantiomerică ridicată – Partea II

- Date în curs de publicare -

<u>Activitatea 4.4.</u> Diseminarea și valorificarea rezultatelor obținute

În conformitate cu planul de activităţi al proiectului, s-a realizat diseminarea rezultatelor prin publicarea a două lucrări în reviste cu factor de impact, trimiterea unei a treia lucrări pentru publicare într-o revistă cu factor de impact și prezentarea a două lucrări, la o conferință internațională de prestigiu din domeniul biocatalizei respectiv o conferință locală.

Articole în reviste de specialitate indexate în baza de date Web of Science (ISI)

1. A. Todea, P. Borza, A. Cimporescu, C. Paul, F. Peter, Continuous kinetic resolution of aliphatic and aromatic secondary alcohols by sol-gel entrapped lipases in packed bed bioreactors, *Catalysis Today*, 2017, https://doi.org/10.1016/j.cattod.2017.02.042.

2. B. Nagy, M. E. Moisă, A. Filip, L. C. Bencze, M. I. Toșa: *Lipase catalyzed parallel kinetic resolution of ibuprofen*, *Studia Universitas Babeş-Bolyai - Chemia*, 2016, *51(4),* 255-266.

3. M. E. Moisă, C. G. Spelmezan, C. Paul, H. J. Bartha-Vári, L. C. Bencze, F. D. Irimie, C. Paizs, F. Péter, M. I. Toșa: *Tailored sol-gel immobilized lipase preparates for the enzymatic kinetic resolution of heteroaromatic alcohols in batch and continuous flow systems***,** în curs de evaluare la *RSC Advances.*

Studii prezentate la conferințe

1. M. E. Moisă, L. Poppe, F. D. Irimie, M. I. Toșa, C. Paizs, Click Reaction Strategy for the Efficient Separation of EKR Products, 13th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation, Biotrans 2017, 9-13 Iulie, Budapesta, Ungaria.

2. M. E. Moisă: Sinteza stereoselectivă a unor alcooli secundari heteroaromatici prin rezoluţie cinetică enzimatică în sistem continuu, Conferinţa interdisciplinară a doctoranzilor Universităţii Babeş-Bolyai, 23-25 Iunie 2017, Baru-Mare, România - prezentare orală.