

Raport științific și tehnic

Proiect: PN-III-P1-1.1-TE-2019-1573

Acronim proiect: Green_Polygel

Titlu proiect: Sinteza enzimatică unor oligoesteri biodegradabili printr-un procedeu verde de tip cascadă

Coordonator: Universitatea Politehnica Timișoara

Director proiect: Ș.l.dr.ing. Anamaria Todea

Perioada de implementare: 2020-2022

Etapa 1/2020: Sinteza enzimatică și optimizarea conversiei glicerinei în acizi glicerici și tartronic

Rezumat

În cadrul primei etape a proiectului s-au realizat o serie de studii privind reacția de oxidare a glicerinei la acizi glicerici și tartronic, în conformitate cu activitățile planificate. S-au efectuat de asemenea studii privind dezvoltarea unui nou catalizator prin utilizarea unor suporturi de tip rășină metacrilică funcționalizată și nanoparticule magnetice în diferite variante pentru imobilizarea lacazei din *Aspergillus oryzae*. Pentru monitorizarea reacției de oxidare a fost necesară dezvoltarea unei metode de analiză cromatografică de lichide, iar în acest sens au fost testate mai multe coloane cromatografice utilizând diferite faze mobile la diferite temperaturi. Pe baza rezultatelor obținute a fost elaborat un protocol de analiză a acizilor. Creșterea eficienței reacției de oxidare s-a realizat prin utilizarea unui inițiator, (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxil, TEMPO, care a favorizat reacția de oxidare, iar randamentul de reacție a fost îmbunătățit, obținându-se rezultate promițătoare. Acidul tartronic a fost caracterizat prin spectroscopie FT-IR și ¹H-RMN. În continuare s-au realizat studii de imobilizare a lacazei pe 7 suporturi, urmate de investigarea biocatalizatorilor obținuți în reacția de oxidare a 2,6-dimetoxifenolului. Au fost utilizate rășini metacrilice funcționalizate cu grupări epoxidice și amino, precum și nanoparticule magnetice care au fost funcționalizate cu grupări amino utilizând 2 silani precursori, rezultând 13 preparate enzimatic. Doi dintre cei 5 biocatalizatori magnetici au fost caracterizați DLS. Pentru toți cei 13 biocatalizatori a fost studiată stabilitatea operațională în 6 cicluri succesive de reacție, doi dintre aceștia prezentând rezultate foarte bune. Pe baza rezultatelor obținute a fost elaborat un protocol de imobilizare a lacazelor prin legare covalentă. În concluzie, toate obiectivele acestei etape au fost îndeplinite.

Activitatea 1.1. Investigarea unor lacaze din diferite surse microbiene ca biocatalizatori pentru sinteza acizilor glicerici și tartronic și stabilirea parametrilor de reacție - Partea I

Sinteza enzimatică a acizilor glicerici și tartronic s-a realizat utilizând 2 lacaze native disponibile comercial din *Aspergillus oryzae* și *Trametes versicolor*, utilizând glicerina ca substrat.

Formarea produșilor de reacție a fost monitorizată prin cromatografie de lichide utilizând un sistem HPLC Jasco, echipat cu pompă cuaternară PU-2089 și două detectoare: UV-2070 Plus, și RI-2031 Plus Intelligent (Jasco International Co., Japonia). În această etapă a fost necesară dezvoltarea unei metode de analiză pentru acizii mezoxalic, tartronic și glicerici iar în acest sens au fost testate diferite faze mobile și 5 coloane cromatografice: Zorbax-NH₂ (Agilent), C12 (Phenomenex), C18-Kinetex (Phenomenex) și Luna Omega Polar C18 (Phenomenex) și o coloană pentru oligozaharide Rezex RSO Ag + 4% (Phenomenex). Eluțiile s-au realizat prin utilizare de apă/acetoneitril ca fază mobilă, cu debite între 0,3-1 mL/min și o temperatură a coloanei de 25°C, respectiv 85°C în cazul coloanei Rezex RSO Ag + 4% (Phenomenex). Dintre coloanele testate cea mai eficientă s-a dovedit coloana Luna Omega Polar C18 (Phenomenex).

Reacțiile de oxidare a glicerinei s-au efectuat utilizând 200 mM glicerină, 20-50 mM TEMPO în soluție tampon acetat 100 mM pH 5, la 25°C, 1000 rpm fiind colectate probe după 3, 6, 12, 24, 48, respectiv

72h. Rezultatele obținute indică o conversie rapidă a glicerolului în gliceraldehidă, urmată de oxidarea acestui intermediar cu formare de acid glicolic și acid tartronic.

Activitatea 1.2. Investigarea unor inițiatori pentru reacții de oxidare enzimatică - Partea I

Primul inițiator studiat a fost (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxil (TEMPO) deoarece, pe baza datelor de literatură, acesta s-a dovedit foarte eficient în diferite reacții de oxidare catalizate de lacaze. Reacțiile de oxidare a glicerinei s-au efectuat în soluție tampon acetat 100 mM pH 5, 200 mM glicerina, 50 mM TEMPO, 50 U/g substrat lacaza, la 25°C, 1000 rpm, fiind colectate probe după 24, 48, 72h.

Rezultatele obținute indică o interdependență între formarea acizilor glicerici și tartronic și concentrația de TEMPO. Reacția de oxidare va fi optimizată în etapa 2.

Activitatea 1.3. Caracterizarea produsilor de reacție prin metode spectroscopice FT-IR și RMN-Partea I

Produsul de oxidare, acidul tartronic, precum și materia primă au fost caracterizate prin Spectroscopie FT-IR și ¹H-RMN.

Spectrele de infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) au fost colectate utilizând un spectrometru Bruker Vertex 70 (Bruker Daltonic GmbH, Germania) echipat cu un spectrometru Platinum ATR, Bruker Diamond Tip A225/QI. Spectrele ¹H-RMN au fost înregistrate cu spectrometrul RMN Bruker FOURIER 300 în D₂O/CD₃OH.

Glicerină: FT-IR: $\nu_{OH} = 3272.82 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{C-O} = 1105.08, 1031.8 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{CH} = 2921.82 \text{ cm}^{-1}, 2883.25 \text{ cm}^{-1}$

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD, δ ppm): 3.65 (qv, 1H); 3.58 (dd, 2H, J = 11.2, 4.8 Hz); 3.50 (dd, 2H, J = 11.1, 6.0 Hz);

Acid tartronic: FT-IR $\nu_{OH} = 3492.68 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{C-O} = 1706.8 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{C-O} = 1283 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_{CH} = 2981.6, 2948.82 \text{ cm}^{-1}$. ¹H-NMR (300 MHz, D₂O, δ ppm): 5.34 (s, 1H).

Activitatea 1.4. Imobilizarea lacazelor prin legare covalenta pe diferite suporturi - Partea I

Pentru imobilizarea prin legare covalentă lacaza selectată a fost cea din *Aspergillus oryzae*, utilizând 8 suporturi diferite. Dintre acestea 3 au fost rășini metacrilice funcționalizate cu grupări metacrilice și amino și 5 suporturi magnetice funcționalizate cu grupări amino. A fost elaborat protocolul de imobilizare pentru fiecare metodă. Particulele magnetice au fost puse la dispoziție de Institutul de cercetare al Academiei Maghiare din Budapeste, în baza acordului de colaborare existent cu grupul de Biocataliză al UPT.

Imobilizarea lacazei din Asp. oryzae pe rășini metacrilice funcționalizate cu grupări epoxi/epoxi-butil metacrilat

S-au cântărit 50 de mg suport în tuburi Eppendorf peste care s-au adăugat 5 mL soluție enzimatică 2 mg/mL. Probele au fost agitate 24 h la 25 °C și 1000 rpm, iar după care îndepărtarea supernatantului preparatele au fost spălate de 2 ori cu soluție tampon acetat 100 mM pH 5.

Imobilizarea biocatalizatorilor pe rășini metacrilice funcționalizate cu grupări amino

S-au cântărit 50 de mg suport care a fost spălat cu soluție tampon de pH 6.00 cu piridină 0,01 M, activat cu 5 mL soluție glutaraldehidă 5 %, la 25 °C, 1000 rpm 3 h și ulterior spălate de 3 ori cu tampon de cuplare pH 6,00. Peste suporturile activate s-a adăugat 5 mL soluție enzimatică 2 mg/mL și s-au agitat la 1000 rpm și 25°C timp de 24 de ore. Supernatantul a fost îndepărtat prin filtrare și preparatele au fost spălate de 3 ori cu soluție tampon acetat 100 mM pH 5.

Imobilizarea biocatalizatorilor pe particule magnetice

Pentru utilizarea particulelor magnetice ca și suport de imobilizare, a fost necesară funcționalizarea cu grupări amino. În acest scop s-au utilizat 2 silani precursori 3-aminopropil-trimetoxisilan și cu 3-aminopropil-trietoxisilan (200 μ l) care au fost adăugați peste pulberile magnetice și incubăți la 70°C, 1000 rpm, 24h. Pentru îndepărtarea silanilor în exces s-a utilizat etanol (2 spălări) și soluție tampon de pH 6.00 cu piridină. Ulterior pentru efectuarea imobilizării s-a utilizat metoda similară utilizată pentru imobilizarea biocatalizatorilor pe rășini metacrilice funcționalizate cu grupări amino.

Pentru fiecare preparat enzimatic obținut, s-a calculat randamentul de imobilizare și s-a determinat activitatea enzimatică utilizând 2,6-dimetoxifenol ca substrat.

Determinarea activității lacazei imobilizate

Într-un Eppendorf de 2 mL s-au cântărit aproximativ 10 mg preparat enzimatic, peste preparat s-au pipetat 1 mL soluție tampon acetat pH 5,0 și 0,75 mL 2,6 DMP (4 mM), amestecul de reacție a fost incubat timp de 4 min la 25°C, după care amestecul de reacție s-a filtrat și s-a citit absorbanta la 469 nm, reacțiile s-au făcut în duplicat iar citirea s-a făcut față de blanc (blanc = 0,5 mL soluție tampon pH 5,0 și 0,25 mL 2,6 DMP, 4 mM), unde: A = absorbanta, 27,5 = coeficientul molar de extincție al 2,6-dimetoxifenolului [mM], timp = timpul de reacție [min], $m_{enzimă}$ = cantitate de biocatalizator utilizat în reacție [g].

$$A_{enzimatică} = \frac{A \cdot 1000}{27,5 \cdot \text{timp} \cdot m_{enzimă}} \left[\frac{\mu\text{mol} \cdot \text{produs}}{\text{min} \cdot \text{g}} \right]$$

Rezultate obținute sunt prezentate în indica faptul că dintre suporturile pe bază de rășini metacrilice, activitatea enzimatică cea mai ridicată s-a obținut pentru suportul funcționalizat cu grupări amino.

Activitatea 1.5. Caracterizarea lacazelor imobilizate: stabilitate termică, influența pH-ului, stabilitate operațională - Partea I

Pentru toate cele 13 preparate enzimaticice a fost studiată stabilitatea operațională în cicluri consecutive de reacție. Cel mai stabil biocatalizator este cel imobilizat pe rășină metacrilică funcționalizată cu grupări amino, pentru care după 6 cicluri de reacție, mai mult de 60% din activitatea inițială a fost regăsită. Pentru preparatele magnetice s-a observat o scădere mai pronunțată după primul ciclu de reacție, cu excepția preparatului MG5.

Activitatea 1.6. Caracterizarea lacazelor imobilizate prin DLS, SEM/TEM, FT-IR - Partea I

Dimensiunea particulelor magnetice a fost determinată utilizând analizorul HORIBA LA 950 A2 laser particle size analyzer (HORIBA Scientific, USA). Rezultatele obținute indică o distribuție unitară și un diametru al particulelor mai mic de 10 μm .