

RAPORT ȘTIINȚIFIC 2022

ETAPA 3. DEZVOLTAREA DE NOI SISTEME DE MICROFLUIDICĂ ȘI A UNOR APLICAȚII CU BIOCATALIZATORII PREPARAȚI

Act 3.1. Noi sisteme de microfluidică cu transaminazele immobilizate

Biocatalizatorii obținuți în etapele anterioare au fost testați inițial în reacții de tip batch, în regim discontinuu. Această testare este necesară pentru caracterizarea corectă cât mai detaliată a noilor biocatalizatori, precum și stabilirea parametrilor de reacție de pornire pentru dezvoltarea ulterioară a reacțiilor în regim continuu.

Reacțiile în regim continuu permit creșterea productivității procesului, dar este imperios necesar pentru realizarea acestora stabilitatea crescută a biocatalizatorului astfel încât aceeași șarjă de biocatalizator să poată fi folosită un timp îndelungat fără ca activitatea enzimei pe care o conține să scadă în timp în mod semnificativ.

Utilizarea reactoarelor flow în regim continuu pot conduce la îmbunătățirea performanțelor biocatalizatorului odată cu productivitatea procesului, pot scădea timpul necesar reacției și pot intensifica procesele de transfer de masă, în consecință pot determina îmbunătățirea randamentelor de reacție și creșterea productivității procesului. Mai mult de atât, prin alegerea corespunzătoare a temperaturii și a debitelor pe baza profilului de inactivare a biocatalizatorului, performanța procesului este ușor de controlat într-un reactor în regim continuu în cazul utilizării enzimelor immobilizate.

Bineînțeles, dacă se lucrează cu un mini-reactor construit adecvat cresc șansele considerabil de a îmbunătăți operabilitatea întregului sistem. Mini-reactorul utilizat în efectuarea experimentelor a fost umplut cu biocatalizatorul immobilizat uscat sub acțiunea vidului pentru a obține un strat de biocatalizator cât mai compact. După umplerea cu biocatalizator, mini-reactorul a fost așezat în poziție verticală, etanșat și "inundat" cu ajutorul unei pompe cu o soluție apoasă de HEPES pH 7 la partea inferioară a reactorului. După îndepărtarea aerului prezent din microchip s-a testat *compresibilitatea stratului de biocatalizator* depus în reactor. Pentru asta, prin mini-reactor a fost vehiculată o soluție tampon HEPES (pH 7) cu un debit tot mai mare, în intervalul 0.1 mL/ min - 5 mL/ min, și s-a determinat o cădere de presiune pe reactor de doar 1.5 bari.

Acest experiment a fost repetat și prin pomparea unei soluții tampon din sens invers, și s-a observat aceeași cădere de presiune ca și în experimentul convențional. Microchipurile astfel obținute au fost inspectate vizual fără a se observa o compactare a stratului de biocatalizator.

Preparatele obținute prin imobilizarea transaminazelor Sr-TA și Psp-TA prin:

- a. tehnica sol-gel (care presupune încapsularea acestora într-o matrice polimerică pe bază de siliciu)
- b. prin legare covalentă pe nanotuburi de carbon funcționalizate.

Primele trei șarje de soluție tampon care au fost trecuți prin microchip au fost colectate și analizate prin metoda Bradford pentru a determina cantitatea de enzimă care a fost desprinsă din sau de pe suprafața suporturilor. Analiza prin metoda Bradford a probelor colectate a confirmat stabilitatea legăturilor, în soluțiile colectate nu a putut fi regăsită nici o urmă de proteină.

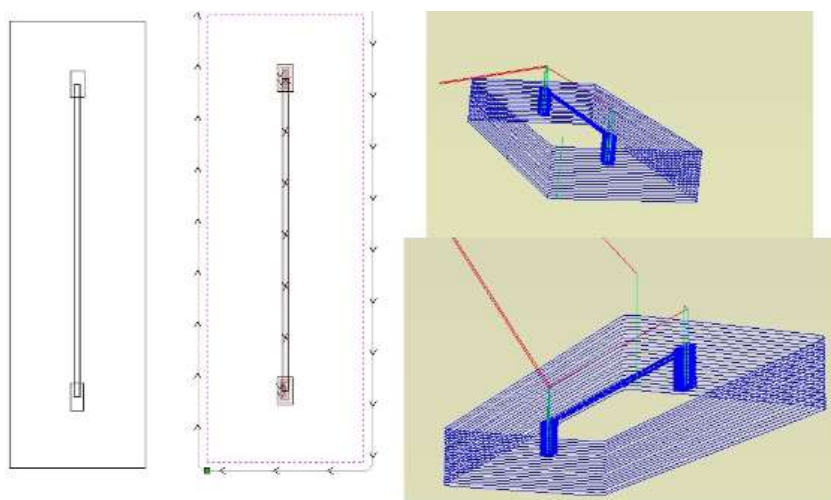


Figura 3.1. Construcția mini-reactorului.

Înainte de etanșarea microchip-ului cele două cavități rămase au fost umplute cu vată de cuarț. Un film subțire a fost depus și lipit cu ajutorul unui adeziv special care s-a solidificat prin iradiere cu radiație UV. Cele două fețe ale mini-reactorului au fost lipite între ele cu ajutorul aceluiași adeziv special, iar pentru a usca adezivul complet microchip-ul a fost ținut în lampa de UV timp de 30 de minute.

Testarea mini-reactoarelor în reacția de transaminare a 1-feniletilaminei racemice

a) Efectul temperaturii

Influența temperaturii asupra reacției de transaminare a 1-feniletilaminei racemice a fost studiată pe microchip-ul care conține varianta imobilizată în sol-gel a transaminazei *Psp*-TA. Biocatalizatorul din microchip a inclus 10 mg enzimă. Cantitatea de biocatalizator *Psp*-TA-solgel care conține 10 mg transaminază a fost determinată cu ajutorul încărcării enzimatică (cantitatea de enzimă/ cantitatea de preparat enzimatic).

Pentru a putea fi observată mai bine influența temperaturii, microchip-ul a fost incubat la diferite temperaturi și la fiecare temperatură au fost testate diferite debite de curgere prin reactor. Pentru fiecare debit la fiecare temperatură au fost prelevate câte trei probe, iar media conversiilor înregistrate este prezentată în Figura 3.2.

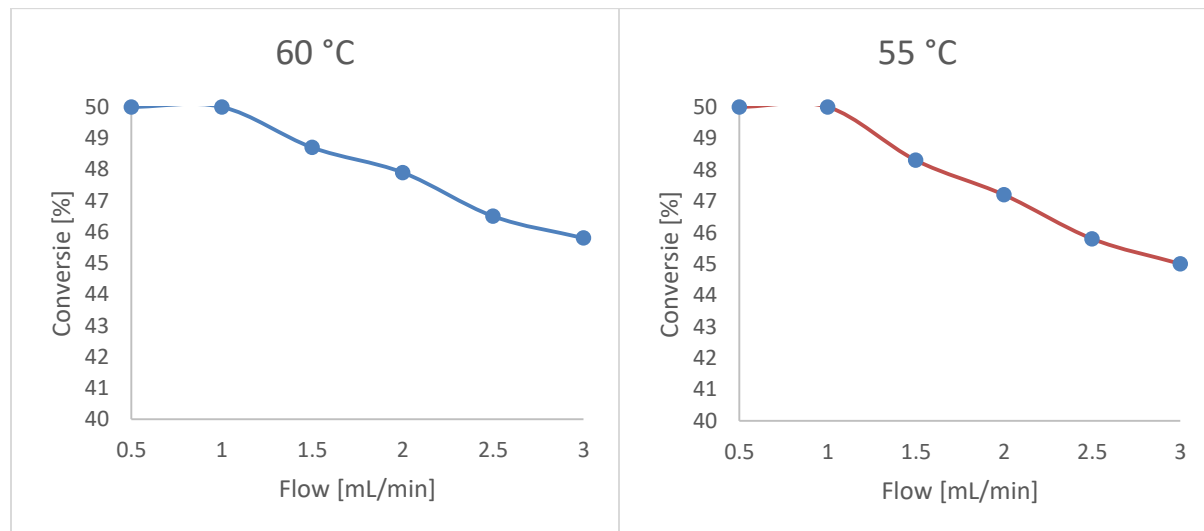


Figura 3.2. Influența temperaturii la diferite debite de curgere (55 și 60 °C).

Așa cum se poate observa în **Figura 3.2**, nu se pot observa diferențe semnificative între profilele conversiilor obținute la cele două temperaturi. Evident, conversia maximă este atinsă la un debit de curgere mai scăzut (0.5-1 mL/min) în cazul ambelor temperaturi. Timpul de rezidență este mai mare în cazul debitelor de curgere mai mici, iar biocatalizatorul are mai mult timp să acționeze asupra substratului. Odată cu creșterea debitului se observă o scădere graduală a conversiei până la aproximativ 45% în cazul ambelor temperaturi, dar această conversie poate fi considerată ridicată având în vedere că este vorba de un proces continuu.

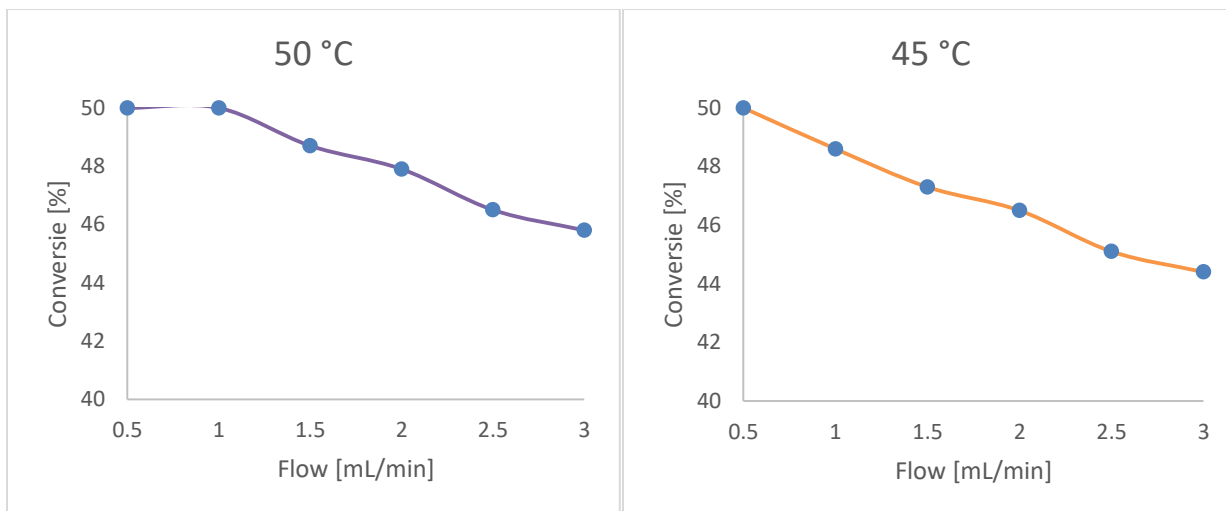


Figura 3.3. Influența temperaturii la diferite debite de curgere (45 și 50 °C).

În **Figura 3.3** sunt ilustrate profilele transformării 1-feniletilaminei racemice de către *Psp*-TA la 45 și 50 °C la diferite debite de curgere (0.5-3 mL/min). Din câte se poate observa, conversia maximă este prezervată și la un debit de curgere mai ridicat în cazul temperaturii de 50 °C, dar în cazul ambelor temperaturi se înregistrează conversii ridicate inclusiv la debite de curgere relativ ridicate (conversii de peste 45% la debit de 3 mL/min).

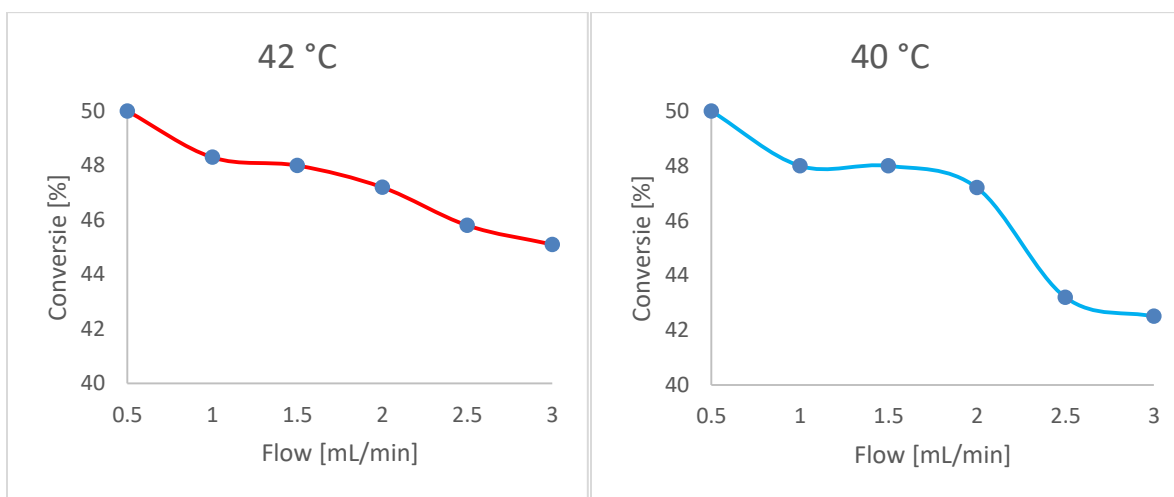


Figura 3.4. Influența temperaturii asupra conversiei la diferite debite (40 și 42 °C).

În **Figura 3.4** este reprezentat profilul conversiilor reacției de transaminare a 1-feniletilaminei racemice în flow la temperaturile de 40 și 42 °C la diferite debite de curgere. Din câte se poate observa, în cazul ambelor temperaturi conversia maximă este atinsă la un debit de curgere de 0.5 mL/ min ceea ce era de așteptat deoarece conversia crește odată cu creșterea timpului de rezidență. O ușoară scădere a conversiei este observată până la un debit de 2 mL/ min (aproximativ 47% în cazul ambelor temperaturi) în timp ce o scădere mai abruptă a conversiei este înregistrată în cazul temperaturii de 40 °C la creșterea debitului de curgere (conversie de 43% la un debit de 3 mL/ min) în timp ce în cazul temperaturii de 42 °C conversia reacției rămâne aproximativ similară inclusiv la un debit mai mare de curgere (46% la un debit de 3 mL/ min).

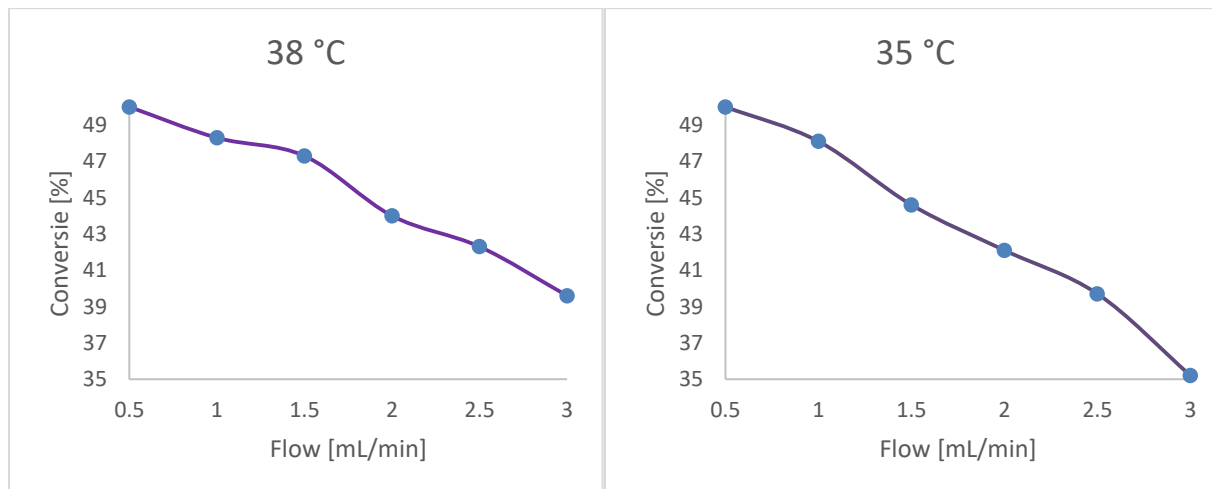


Figura 3.5. Influența temperaturii asupra conversiei la diferite debite de curgere (35 și 38 °C).

La temperaturi mai scăzute (35, respectiv 38 °C) se poate observa o scădere mai abruptă a conversiei odată cu creșterea debitului de curgere (**Figura 3.5**). La un debit mic (0.5 mL/min) aproape se atinge conversia maximă în cazul ambelor temperaturi, iar la creșterea debitului de curgere se observă o scădere liniară a valorii conversiei (sub 40% la un debit de curgere de 3 mL/ min). Această scădere a conversiei este mai evidentă la temperaturi mai joase deoarece biocatalizatorul utilizat în microchip este o transaminază immobilizată în sol-gel, deci difuzia substratului și a celorlalte componente

are loc mai greu la temperaturi mai scăzute, dar și datorită timpului de rezidență mai scăzut când un debit mai mare de curgere este în discuție.

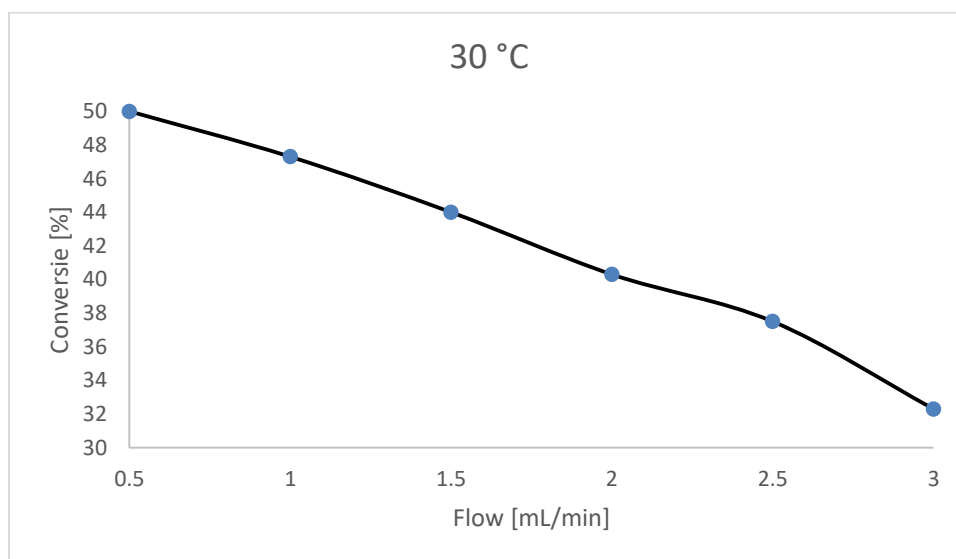


Figura 3.6. Influența temperaturii asupra transformării 1-feniletilaminei racemice la diferite debite de curgere (30 °C).

↑

În **Figura 3.6** este prezentat profilul conversiilor reacției de transformare a 1-feniletilaminei racemice catalizată de *Psp*-TA imobilizată în sol-gel la temperatura de 30 °C la diferite debite de curgere (0.5-3 mL/ min). Cum era de așteptat, conversia maximă este atinsă atunci când timpul de rezidență este mare (un debit de curgere scăzut – 0.5 mL/ min), iar odată cu creșterea debitului de curgere se poate observa o scădere liniară a conversiei atingând o valoare a conversiei de aproximativ 33 % la un debit de curgere de 3 mL/ min.

b) Efectul concentrației substratului

Când se ia în discuție orice proces industrial de obținere a unui compus, cel mai ilustrativ parametru este productivitatea procesului, care trebuie să fie cât mai ridicată. Productivitatea unui proces apare în discuții atât în cazul unui proces discontinuu (în șarje) cât și în cazul unui proces continuu (în flow). Un parametru care influențează productivitatea unui proces este concentrația inițială de substrat. O concentrație inițială ridicată a substratului conduce la o cantitate mai mare de produs obținută la finalul

procesului, în cazul în care biocatalizatorul utilizat este activ și la concentrații mai ridicate ale substratului.

Un impediment care ar putea apărea la o concentrație inițială de substrat mai ridicată este inhibiția de substrat. Un alt impediment care ar putea apărea în cazul utilizării unei cantități ridicate de substrat este inhibiția de produs, dar acest impediment poate apărea doar în cazul unui proces discontinuu. Când este în discuție un proces continuu, inhibiția de produs nu poate interveni deoarece produsul este eliminat din sistem în mod continuu.

Pentru creșterea productivității procesului continuu, implicit pentru a putea lucra cu o concentrație inițială mare de substrat, trebuie examinați cu atenție doi parametri ai procesului și anume: temperatura de lucru, respectiv debitul de curgere. Temperatura influențează conversia reacției datorită faptului că o temperatură mai ridicată favorizează difuzia substratului și a celorlalte componente (fiind în discuție un biocatalizator obținut prin imobilizarea *Psp*-TA în sol-gel care este o metodă de imobilizare prin încapsulare).

Debitul de curgere este un alt parametru extrem de important care, ales corespunzător, poate determina atingerea unei conversii maxime. În funcție de debitul de curgere este influențat timpul de rezidență al substratului în mini-reactor. Un timp de rezidență scăzut, implicit un debit de curgere ridicat, poate conduce la scăderea conversiei reacției deoarece biocatalizatorul nu ar avea timp suficient să transforme cantitatea de substrat care curge prin microchip. În același timp, productivitatea unui proces depinde invers proporțional de timpul de reacție, deci ar trebui ales un timp de rezidență corespunzător astfel încât să fie îndeajuns de mic, dar suficient de mare pentru a permite atingerea unei conversii a reacției cât mai apropiată de valoarea maximă. Pentru aceasta s-au efectuat experimente de stabilire a concentrației inițiale optime a substratului la diferite temperaturi și debite de curgere.

Așa cum se poate observa în **Figura 3.7** conversia maximă se atinge doar pentru un debit de 0.1 mL/ min la 60 °C. Odată cu creșterea valorii debitului de curgere se poate observa o scădere treptată a valorii conversiei atingând o valoare de aproximativ 25% la 1 mL/ min. Din această figură se poate observa dependența valorii conversiei de

debitul de curgere, un timp de rezidență prea mic ducând la o scădere drastică a conversiei indiferent de temperatura de lucru.

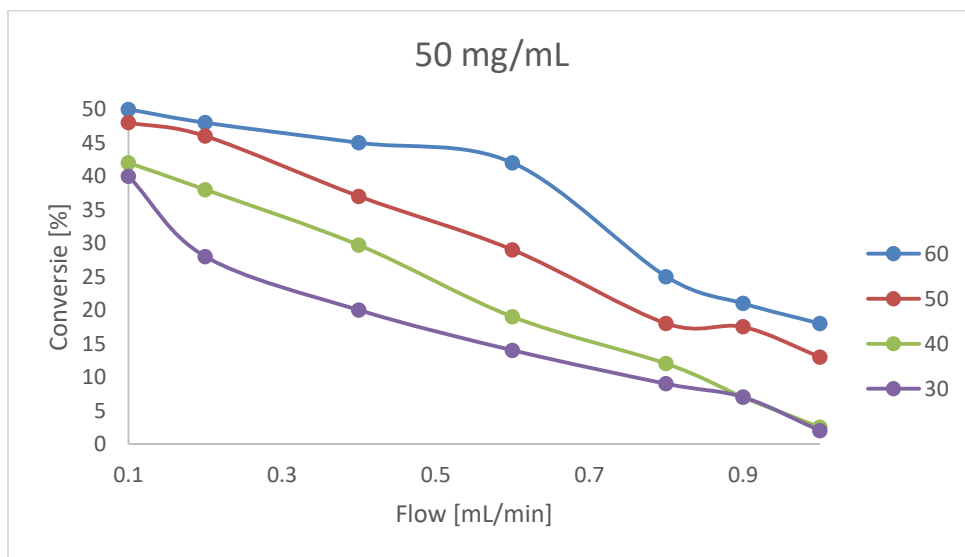


Figura 3.7. Influența temperaturii și a debitului de curgere asupra conversiei de transformare a 1-feniletilaminei racemice pornind de la o concentrație inițială de substrat de 50 mg/ mL.

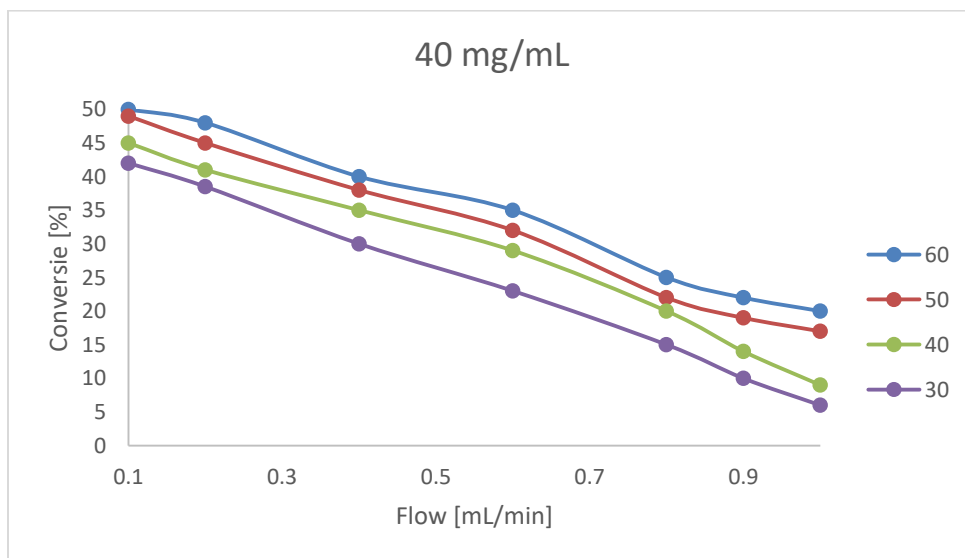


Figura 3.8. Influența temperaturii și a debitului de curgere asupra conversiei de transformare a 1-feniletilaminei racemice pornind de la o concentrație inițială de substrat de 40 mg/ mL.

În cazul în care s-ar lucra cu o concentrație inițială a substratului de 40 mg/ mL se observă în **Figura 3.8** că în cazul în care se lucrează la un debit de 0.1 mL/ min conversia maximă se atinge la temperaturile de 50 și 60°C, dar o conversie satisfăcătoare se atinge și la un debit de 0.2 mL/ min în cazul temperaturii de 60°C (aproximativ 49%). Odată cu creșterea debitului de curgere se poate observa o scădere drastică a conversiei și în cazul în care se lucrează cu o concentrație inițială de substrat de 40 mg/ mL (sub 25%).

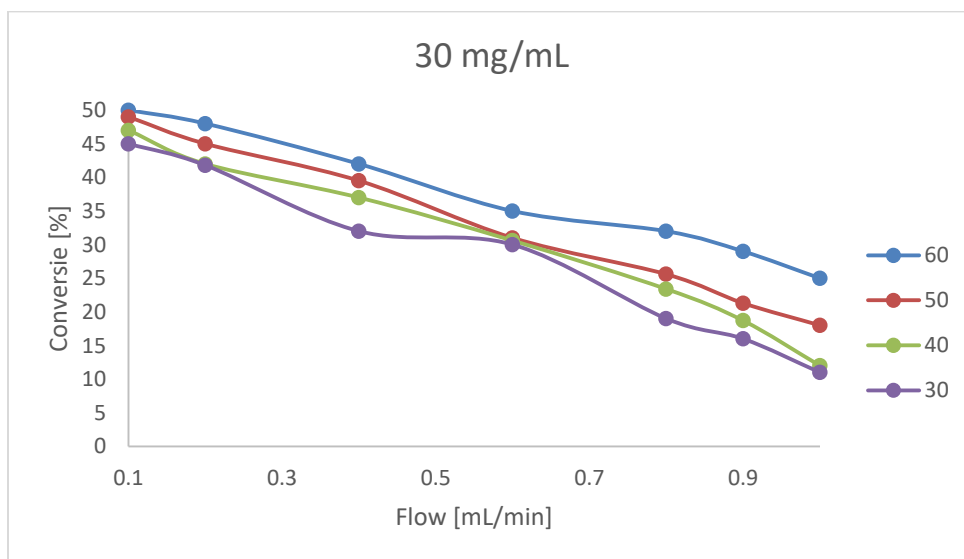


Figura 3.9. Influența temperaturii și a debitului de curgere asupra conversiei de transformare a 1-feniletilaminei racemice pornind de la o concentrație inițială de substrat de 30 mg/ mL.

În cazul în care se lucrează cu o concentrație inițială de substrat de 30 mg/ mL și un debit de curgere de 0.1 mL/ min (timp de rezidență mare) nu apar diferențe semnificative (sub 5% diferență între valorile conversiei) indiferent de temperatura de lucru (conform **Figurii 3.9**). Diferențe mai mari între valorile conversiei la diferite temperaturi apar la debite mai mari de curgere (aproximativ 30% conversie în cazul în care temperatura de lucru este 60°C, în timp ce la 30°C valoarea conversiei nu depășește 15% la un debit de 1 mL/ min).

Așa cum se observă în **Figura 3.10** în cazul în care se lucrează cu o concentrație inițială de substrat de 20 mg/ mL conversia maximă este atinsă indiferent de temperatura de lucru la un debit de 0.1 mL/ min. Important este faptul că în cazul în care am lucra cu un debit de curgere de 0.6 mL/ min și o temperatură de 60°C se atinge

aproape conversia maximă. Ca și în cazurile anterioare, odată cu creșterea debitului de curgere (scăderea timpului de rezidență) apare o scădere a valorii conversiei 1-feniletilaminei racemice și în cazul în care am lucra cu o concentrație inițială de substrat de 20 mg/ mL (până la 18% conversie la temperatura de 30 °C la un flow de 1 mL/ min).

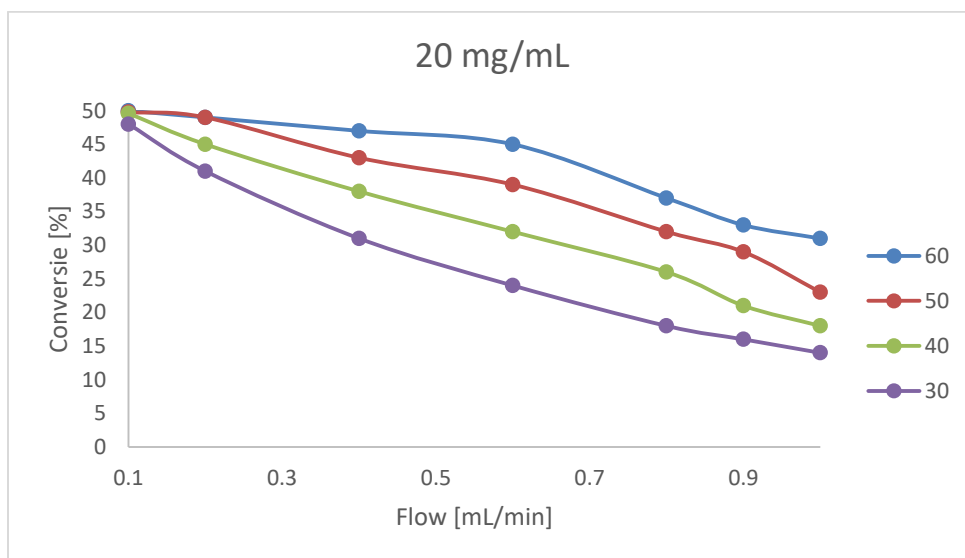


Figura 3.10. Influența temperaturii și a debitului de curgere asupra conversiei de transformare a 1-feniletilaminei racemice pornind de la o concentrație inițială de substrat de 20 mg/ mL.

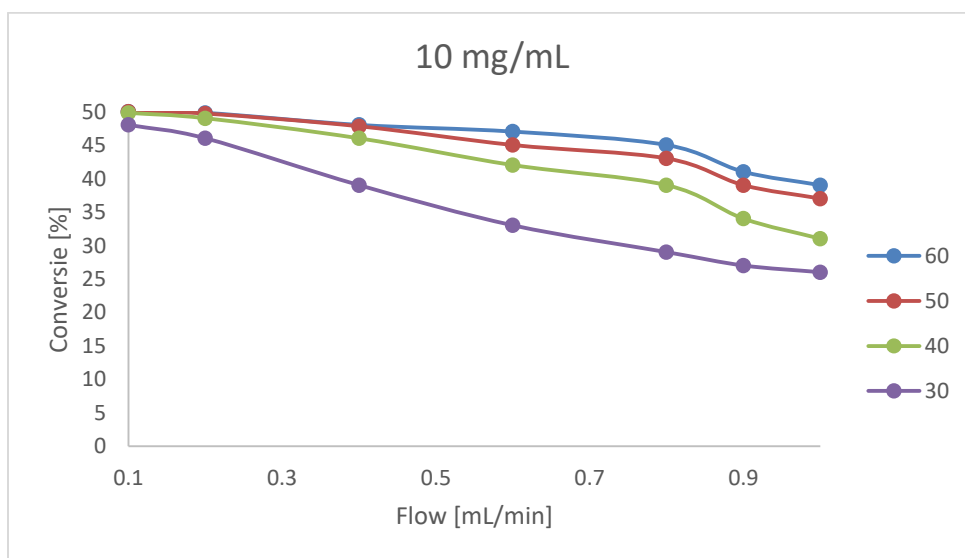


Figura 3.11. Influența temperaturii și a debitului de curgere asupra conversiei de transformare a 1-feniletilaminei racemice pornind de la o concentrație inițială de substrat de 10 mg/ mL.

În cazul în care se lucrează cu o concentrație inițială de substrat de 10 mg/ mL și o temperatură de 60 °C se poate observa faptul că conversia rămâne aproximativ maximă chiar și la un debit de curgere de 0.8 mL/ min (conform **Figurii 3.11**). La un debit de 1 mL/ min lucrând la aceeași temperatură se poate observa că conversia scade până la o valoare de 45%, ceea ce este o valoare a conversiei acceptabilă având în vedere că discutăm de un regim continuu. În cazul în care se lucrează cu temperaturi mai scăzute nu se pot observa diferențe semnificative, doar în cazul în care am lucra la o temperatură de 30 °C, deoarece la o temperatură mai joasă și un timp de rezidență mai scăzut (debit de curgere mai mare) difuzia substratului și a produsului și a altor componente are loc mai lent, deci e logic ca conversia reacției să fie mai scăzută în acest caz.

În **Figura 3.12** sunt prezentate în mod sintetic și comparativ rezultatele discutate anterior cu privire la efectul a trei parametri extrem de importanți asupra productivității procesului și anume:

- temperatura de lucru,
- concentrația inițială a substratului
- debitul de curgere, corelat cu timpul de rezidență în reactor, deoarece analizăm un proces continuu.

Așa cum se poate observa productivitatea maximă a procesului este obținută în cazul în care se utilizează o concentrație inițială a 1-feniletilaminei de 50 mg/ mL, se lucrează la o temperatură de 60 °C și cu un debit de 0.6 mL/ min.

Transaminaza *Psp*-TA imobilizată în sol-gel și depusă într-un microchip a fost folosită în continuare pentru transformarea altor amine racemice în condițiile optime determinate pe substratul model, așa cum s-a prezentat, adică la temperatura de 60 °C, cu un debit de curgere de 0.6 mL/ min, pornind de la o concentrație inițială a aminei racemice de 50 mg/ mL.

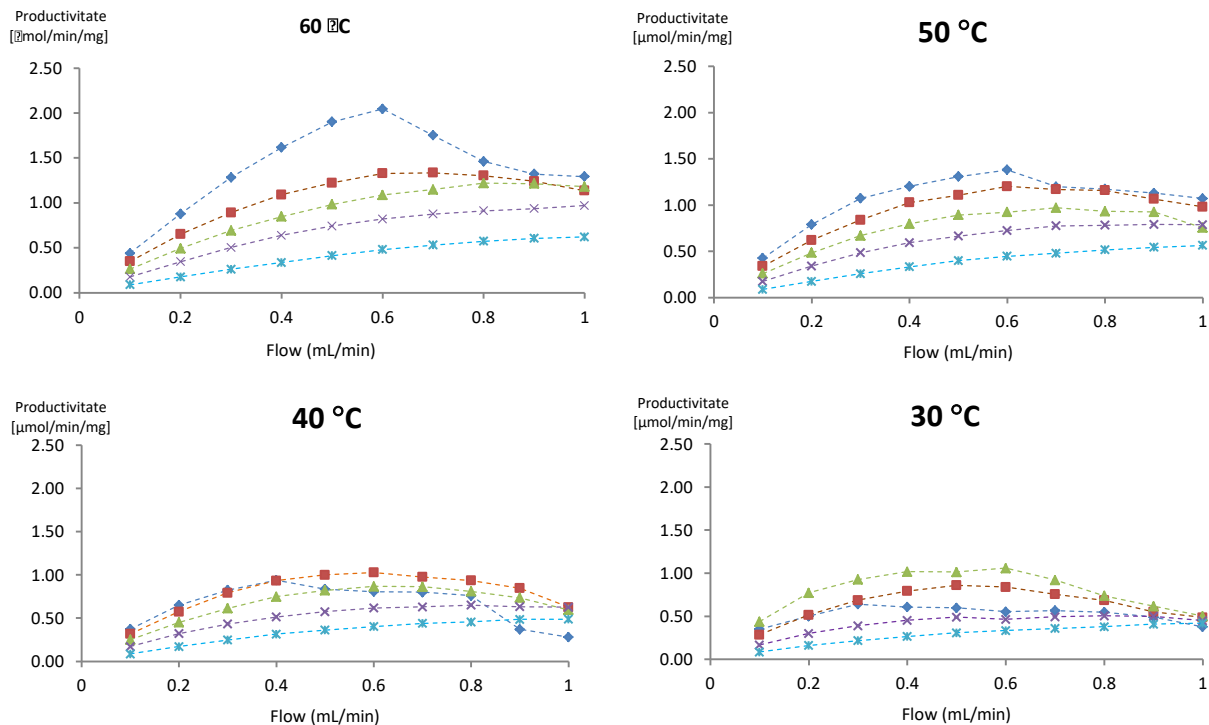


Figura 3.12. Dependența productivității ($\mu\text{mol}_{\text{produs}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ biocatalizator) *Psp*-TA-solgel în funcție de debitul de curgere la diferite temperaturi și diferite concentrații inițiale de substrat (\blacklozenge 50 mg mL^{-1} ; \blacksquare 40 mg mL^{-1} ; \blacktriangle 30 mg mL^{-1} ; \times 20 mg mL^{-1} ; \ast 10 mg mL^{-1}).

Act 3.2. Aplicații relevante ale transaminazelor

Au fost investigate diferite substraturi în procese de rezoluție cinetică catalizate de de *Psp*-TA imobilizate prin încapsulare în sol-gel.

Aminele racemice (*rac*-**1a-j**; 5 mM) au fost dizolvate în soluție tampon HEPES (50 mM, pH 7,5) care conține piruvat de sodiu (20 mM), PLP (0,1 mM) și 5 % DMSO. Microchipul umplut cu biocatalizator a fost pre-spălată cu soluție tampon HEPES de 50 mM ($100 \mu\text{L min}^{-1}$ timp de 60 min), urmată de pomparea soluției de substrat prin microchip la debitul de $600 \mu\text{L min}^{-1}$ la $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

Reacțiile au fost monitorizate în timp, cu ajutorul cromatografiei de lichide de înaltă performanță (HPLC), utilizând coloana chirală Crownpak CR-I (+) (4 mm x 250 mm) iar ca eluent s-a utilizat amestecul format din HClO_4 (pH 1.5) și acetonitril în proporție de 80:20 (v/v) cu debitul de 0.4 mL/min .

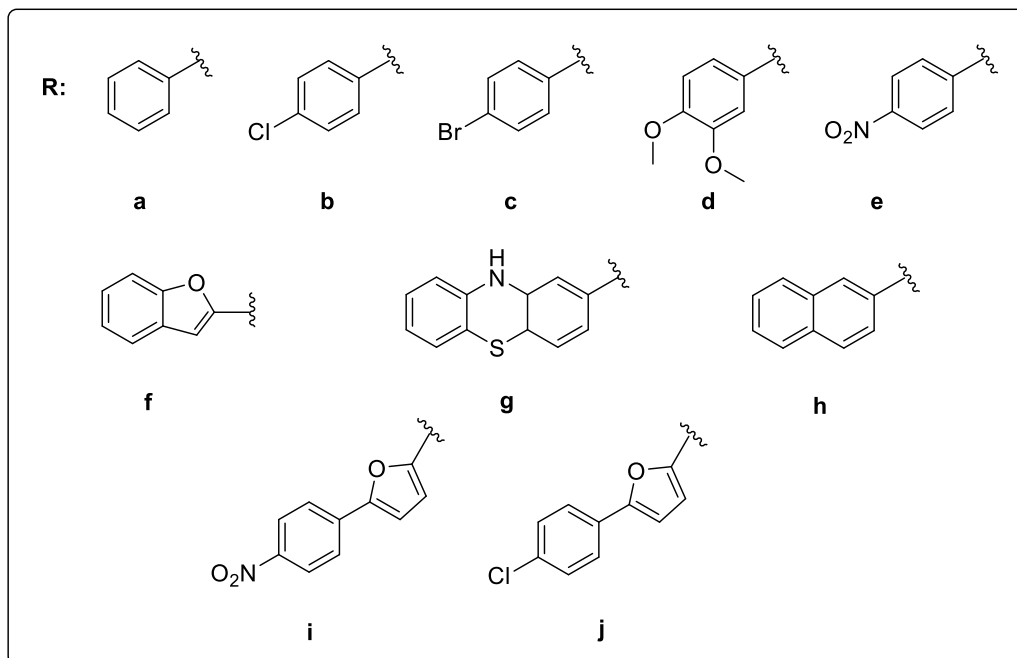
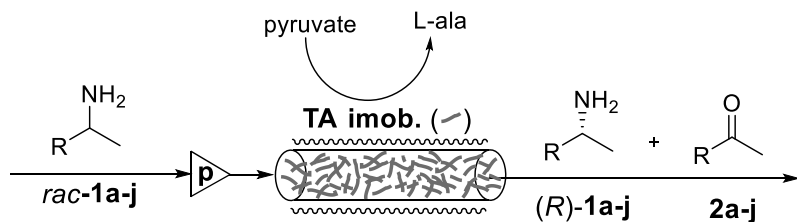


Figura 3.13. Rezoluție cinetică în flux continuu a aminelor racemici (*rac-1a-j*) cu *Psp-TA* imobilizate prin încapsulare în sol-gel.

Tabel 3.1. Transformare aminelor catalizată de *Psp-TA* imobilizată prin încapsulare în sol-gel.

Substrat	ee_{substrat} (%)	c (%)
<i>rac-1a</i>	21	16
<i>rac-1b</i>	92	48
<i>rac-1c</i>	61	38
<i>rac-1d</i>	10	9
<i>rac-1e</i>	9	8
<i>rac-1f</i>	29	23
<i>rac-1i</i>	0,6	< 1
<i>rac-1j</i>	6	5

Cromatogramele obținute la analiza amestecurilor de reacție, utilizate la caracterizarea procesului (conversie și exces enantiomeric al substratului) sunt prezentate în Figurile 3.14-3.20:

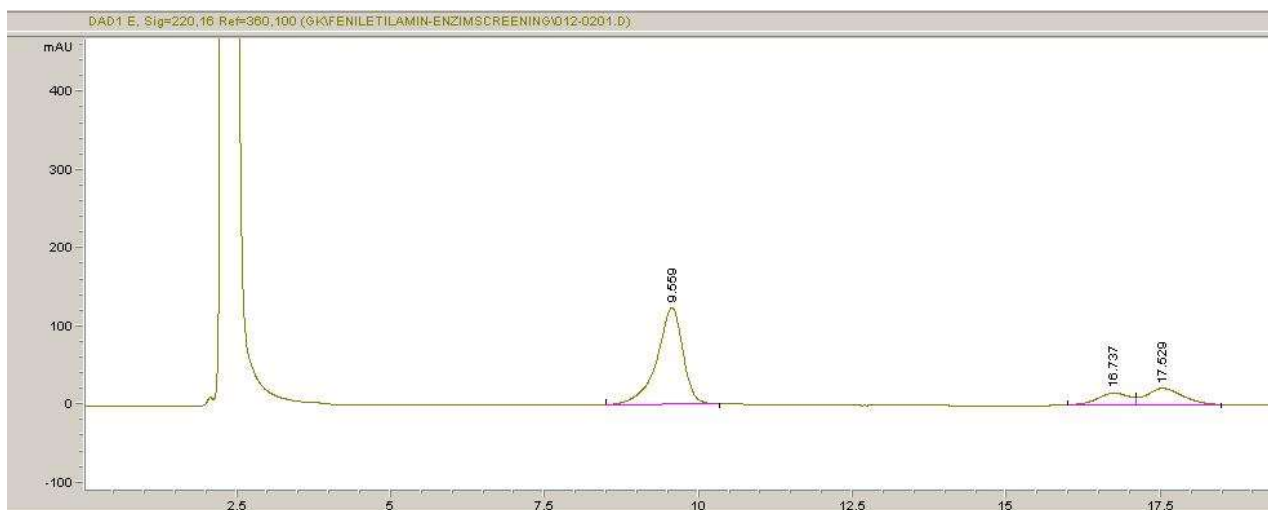


Figura 3.14. Rezoluție cinetică catalizată de *Psp*-TA imobilizată prin încapsulare în sol-gel a *rac*-1a.

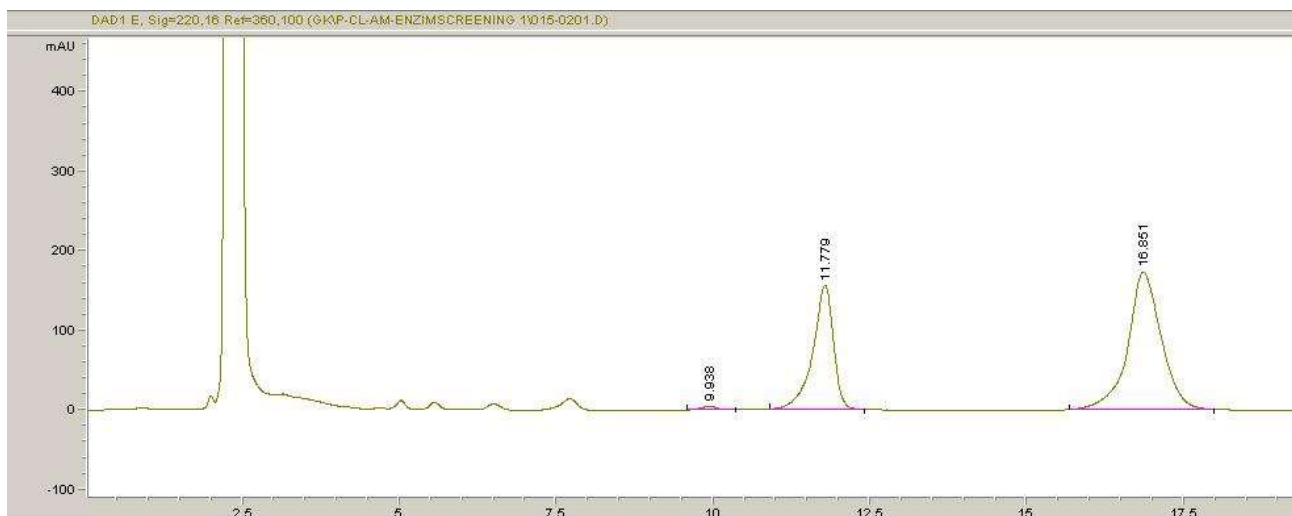


Figura 3.15. Rezoluție cinetică catalizată de *Psp*-TA imobilizată prin încapsulare în sol-gel a a *rac*-1b.

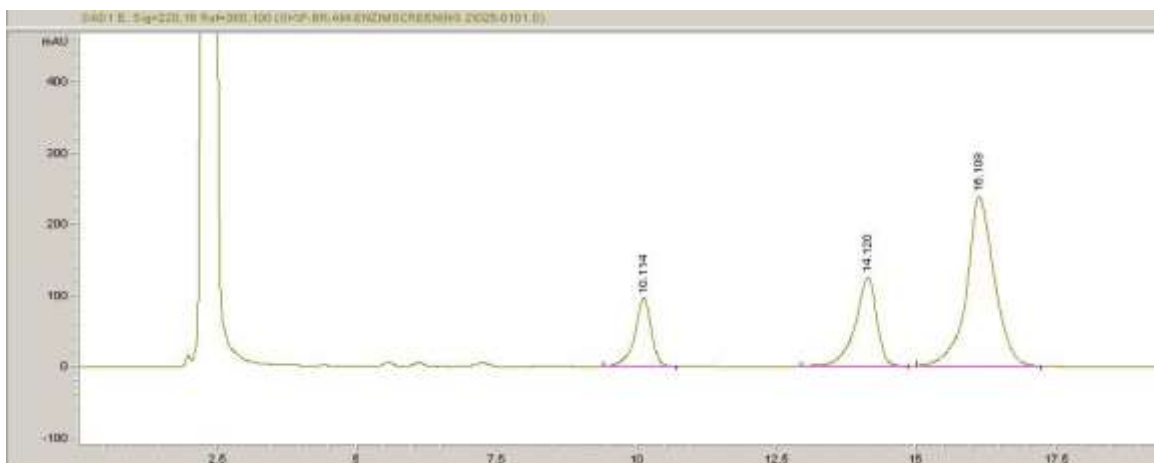


Figura 3.16. Rezoluție cinetică catalizată de *Psp*-TA imobilizată prin încapsulare în sol-gel a *rac*-1d.

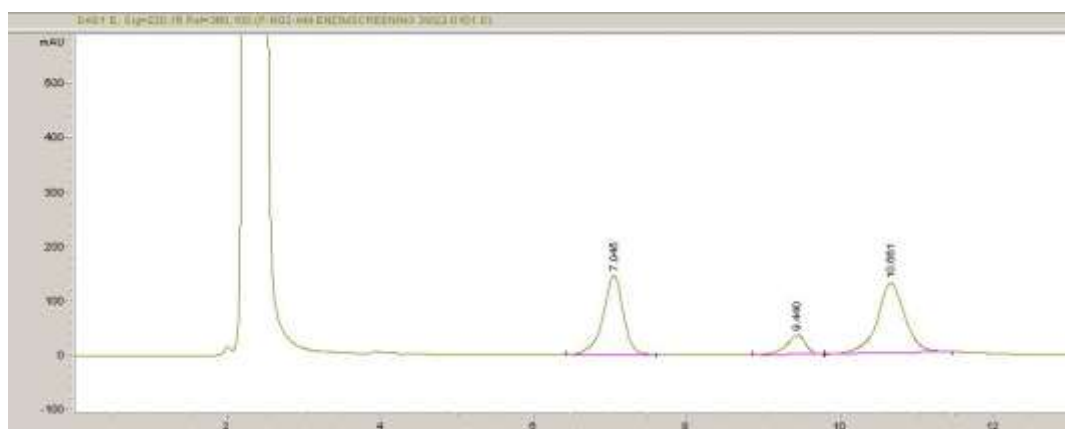


Figura 3.17. Rezoluție cinetică catalizată de *Psp*-TA imobilizată prin încapsulare în sol-gel a *rac*-1e.

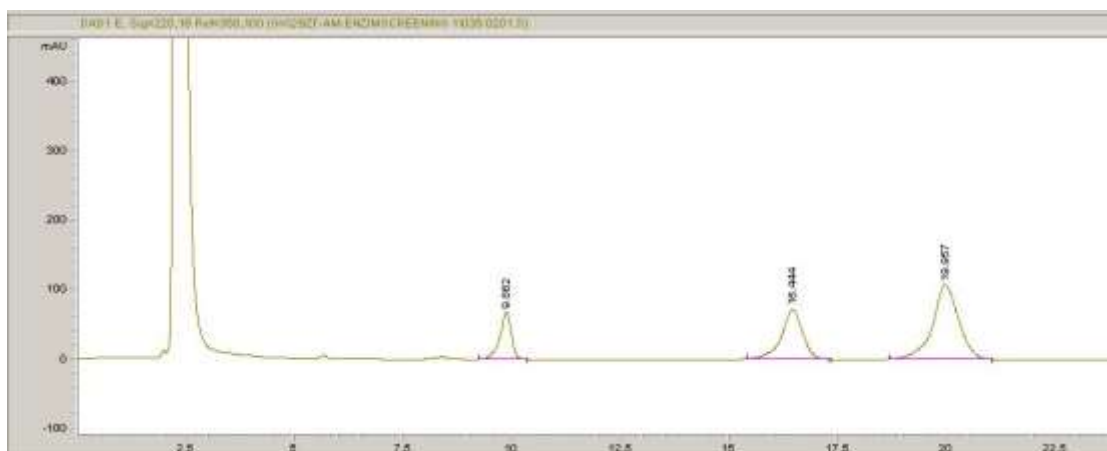


Figura 3.18. Rezoluție cinetică catalizată de *Psp*-TA imobilizată prin încapsulare în sol-gel a *rac*-1f.

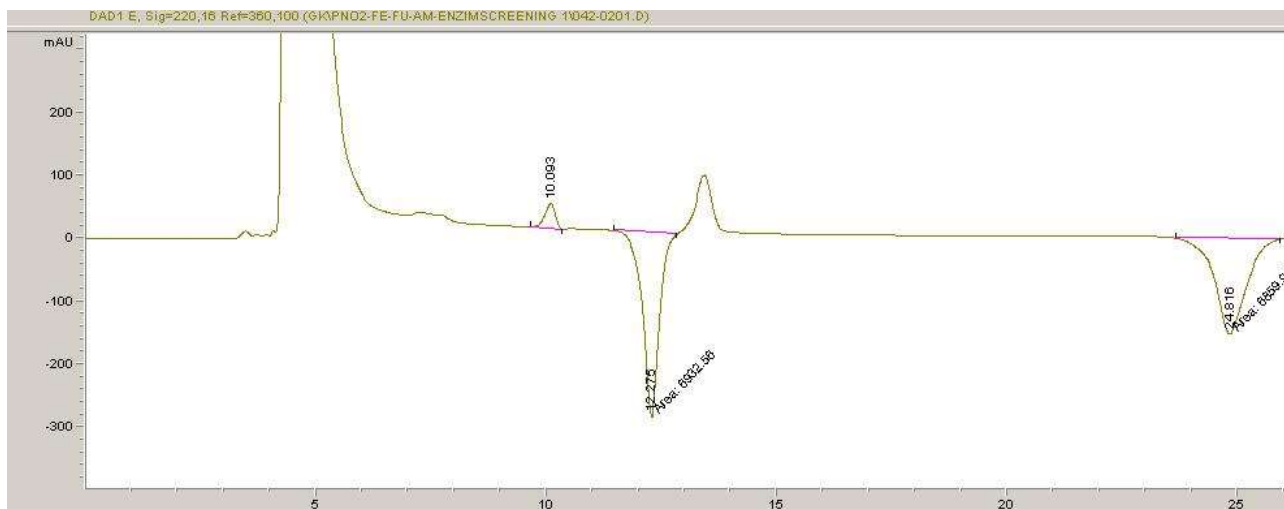


Figura 3.19. Rezoluție cinetică catalizată de *Psp*-TA imobilizată prin încapsulare în sol-gel a *rac*-1i.

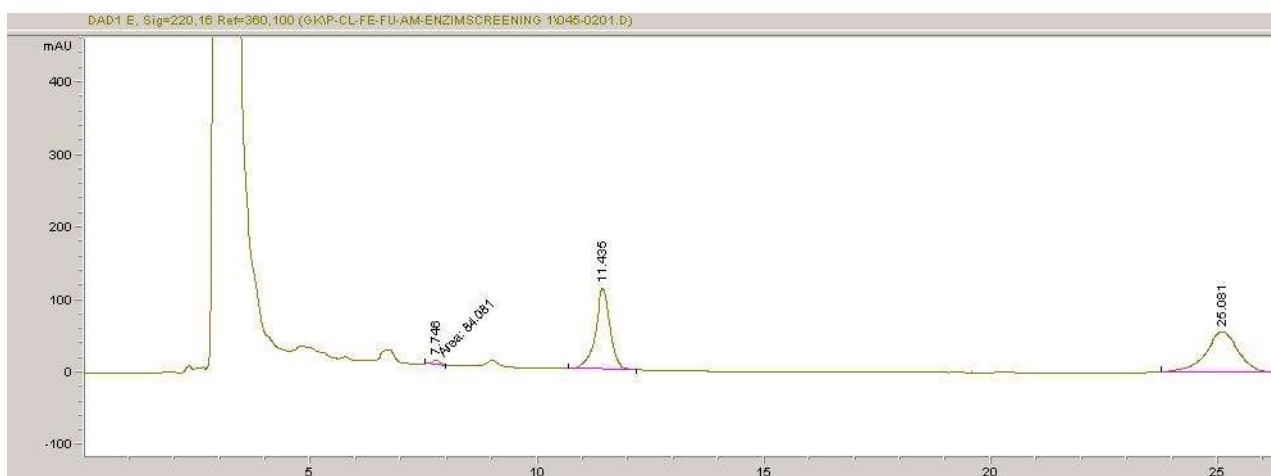


Figura 3.20. Rezoluție cinetică catalizată de *Psp*-TA imobilizată prin încapsulare în sol-gel a *rac*-1j.

Legarea prin afinitate pe suporturi nanostructurate

A fost realizată în vederea testării și legarea transaminazei *Psp*-TA (izolată din *Pseudomonas psychrotolerans*) pe suporturi de afinitate, folosind ca suport rășina de tip Ni-NTA (nichel-acid nitrilotriacetic) utilizată și în etapa de purificare a enzimelor prin cromatografie de afinitate. Cromatografia de afinitate se bazează pe formarea legăturilor coordinative dintre ionii metalici (Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+})

imobilizați pe suport (agaroză, sefaroză) și resturile bazice din enzime (His-tag). Capacitatea de legare a rășinii de Ni-NTA este de 5-10 mg proteină pe 1 mg suport.

Rășina Ni-NTA este disponibilă comercial și păstrată într-o soluție de EtOH 20 %. În primul pas al imobilizării (legării), suportul este spălat cu soluție tampon 50 mM HEPES (5 mL × 3) pentru a elimina etanolul, care poate să denatureze enzima. Enzima *Psp-TA* (300 μL, 1mg/mL) este incubată cu 100 μL de Ni-NTA, la 4 °C timp de 5 min, după care suspensia este filtrată prin centrifugare, folosind tuburi Eppendorf speciale cu frită. Filtratul se readaugă peste rășină pentru a eficientiza legarea enzimei. După etapa de imobilizare, au fost realizate încă trei spălări ale rășinii pentru a îndepărta proteina legată nespecific.

Activitatea și reutilizabilitatea enzimei imobilizate au fost investigate în rezoluție cinetică. Amestecul de reacție a conținut 5 mM feniletilamina, 20 mM acid piruvic, 5% DMSO, 0.1 mM PLP și 50 μg *Psp-TA* imobilizată pe Ni-NTA. În **Tabelul 3.2** sunt prezentate rezultatele reutilizării enzimei *Psp-TA* imobilizată pe Ni-NTA. Figurile 3.21-3.23 prezintă pentru ilustrare cromatogramele obținute la analiza unor amestecuri de reacție.

Tabel 3.2. Rezoluție cinetică enzimatică a *rac*-1-feniletilaminei catalizată de *Psp-TA* imobilizată pe Ni-NTA.

<i>Nr. cicluri</i>	<i>ee (%)</i>	<i>c (%)</i>
0	27	21
1	53	35
2	65	39
3	58	36
4	59	37
5	61	38
6	63	38

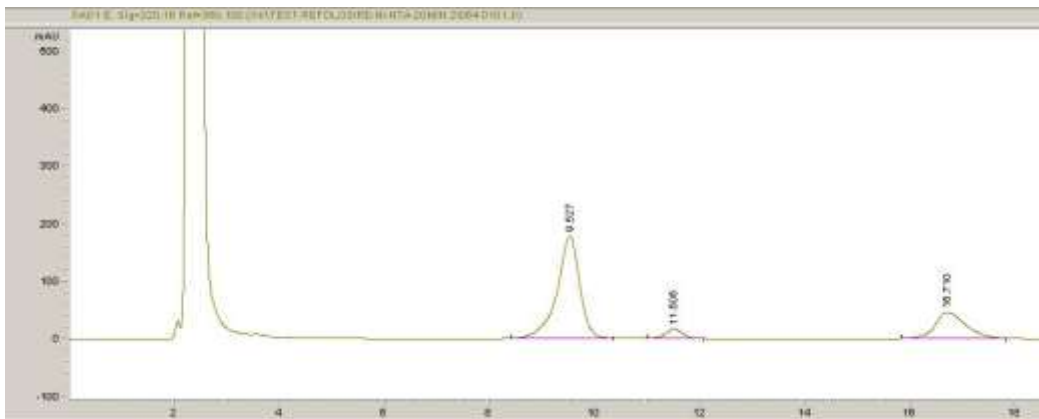


Figura 3.21. Reacția de rezoluție cinetică după 20 de minute și după a doua refolosire.

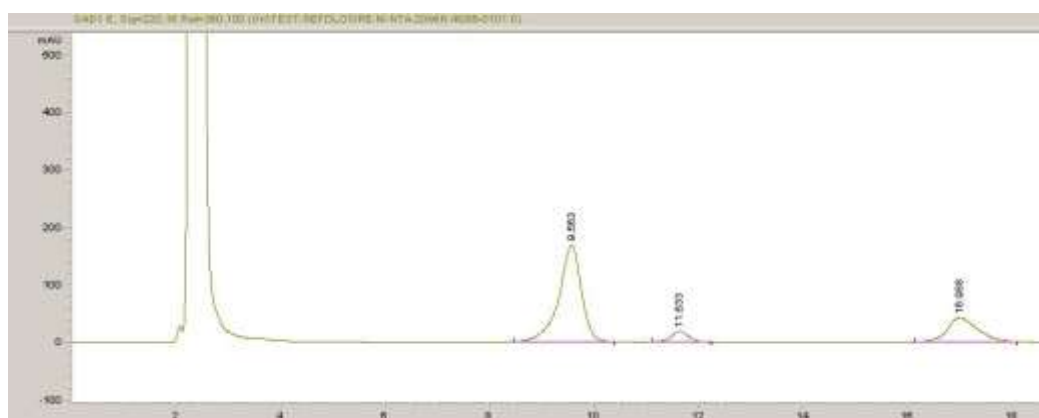


Figura 3.22. Reacția de rezoluție cinetică după 20 de minute și după a patra refolosire.

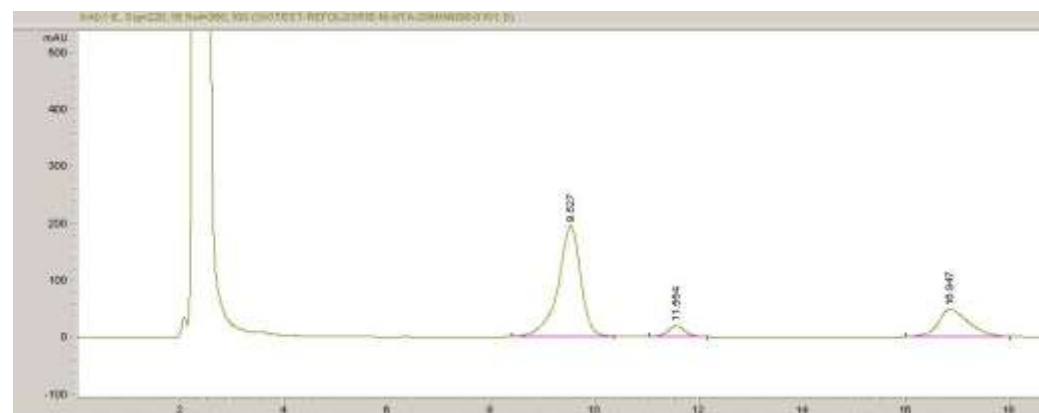


Figura 3.23. Reacția de rezoluție cinetică după 20 de minute și după a șasea refolosire

3.3. Aplicații avansate ale transaminazelor în dezvoltarea unor cascade enzimatice prin cuplare cu anhidraza carbonică umancă (hCA II)

Anhidraza carbonică umancă (hCA II) este o enzimă surprinzătoare, care poate realiza reducerea stereoselectivă a cetonelor prochirale folosind fenilsilanul ca donor de hidruură.

Mecanismul de acțiune al acestei enzime, o metaloenzimă cu zinc, presupune în etapa inițială preluarea ionului de hidruură de către zinc și apoi transferul acestuia pe fața *Re* a unei cetone prochirale, cu generarea (*S*)-alcoolului într-un proces cu enantiotop selectivitate ridicată.

Prin cuplarea transaminazelor cu anhidraza carbonică, cetona generată ca produs secundar în EKR poate fi valorificată rapid prin transformarea ei în (*S*)-alcool, ceea ce favorizează și deplasarea echilibrului reacției de transaminare și permite obținerea de conversii maxime, respectiv purități și purități optice ridicate ale enantiomerului aminei format. În plus, la transpunerea la scală preparativă a proceselor de EKR s-a constatat că apare ca produs secundar imina formată din amină și cetona rezultată ca produs secundar care, prin transformare rapidă, ar fi prezentă astfel într-o concentrație insuficientă pentru a consuma amina. Astfel, prin utilizarea acestei cascade enzimatice se pot prepara dintr-o amină racemică doi produși valoroși:

- (*R*)-amina și (*S*)-alcoolul la utilizarea combinației transaminază (*S*)-selectivă-hCA II
- (*S*)-amina și (*S*)-alcoolul la utilizarea combinației transaminază (*R*)-selectivă-hCA II

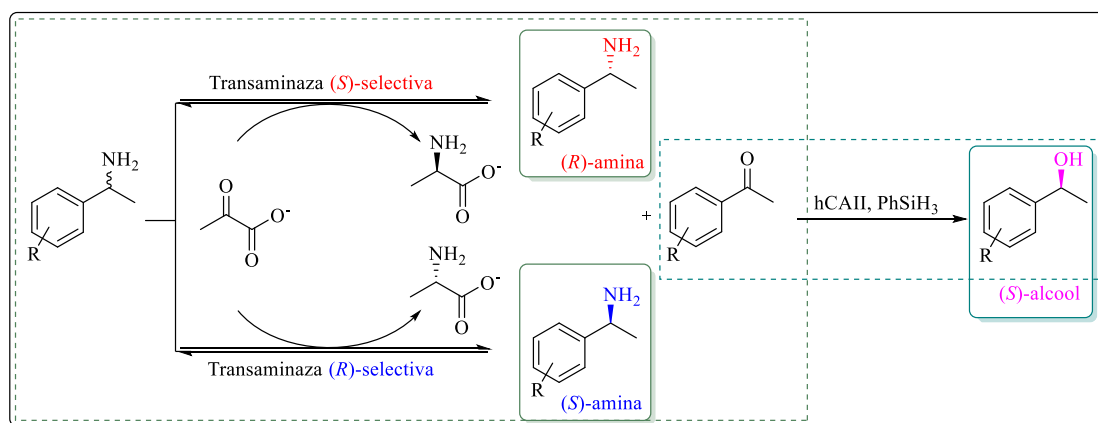


Figura 3.24. Cascada enzimatică propusă pentru rezolvarea amestecurilor racemice ale aminelor

Folosind cele două transaminaze cu selectivitate diferită, (*S*)- sau (*R*)-selectivă, ne-am propus dezvoltarea acestei cascade enzimatice. Prima etapă, cea mai dificilă de fapt, presupune compatibilizarea celor două reacții ale cascadei enzimatice, astfel încât toate condițiile utilizate la bioprosesare să fie acceptate de ambele enzime. Dacă pentru cele două transaminaze studiile au fost efectuate, pentru anhidraza carbonică cercetările sunt abia la început.

A. Stabilirea domeniului de pH

În timp ce *PpS*-TA și *SrR*-TA sunt active în mai multe sisteme tampon (HEPES, 50 mM, pH 7.0, PB, 50 mM și 100 mM, pH 7.0), hCAII este active în tampon TRIS (pH 8.0, 50 mM). Au fost studiate reacțiile catalizate de hCA II ale mai multor acetofenone **2a-d** în tampon TRIS (50 mM, pH 8.0) la 25 °C cu o transformare aproape cantitativă în (*S*)-alcooli. Prin modificarea soluțiilor tampon s-au obținut rezultatele prezente în Figura 3.25.

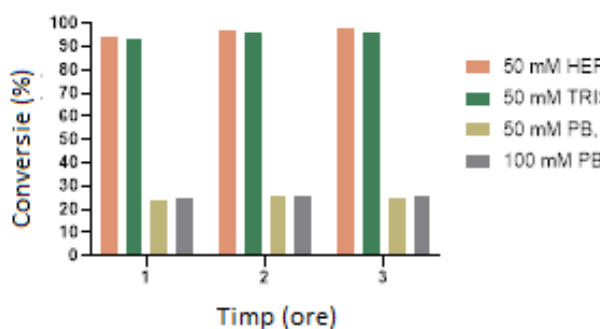


Figura 3.25. Efectul pH-ului și sistemului tampon în reacția de refucere a acetofenonei catalizată de hCAII

B. Toleranța la cosolvenți

Pentru a putea introduce în cascada enzimatică și substraturi cu hidrosolubilitate scăzută, se utilizează adesea cosolvenți (dimetilsulfoxidul cel mai adesea), cu condiția ca enzimele să fie stabile în aceste sisteme. Toleranța la DMSO a hCA II a relevat faptul că stabilitatea acesteia scade odată cu conținutul amestecului în DMSO.

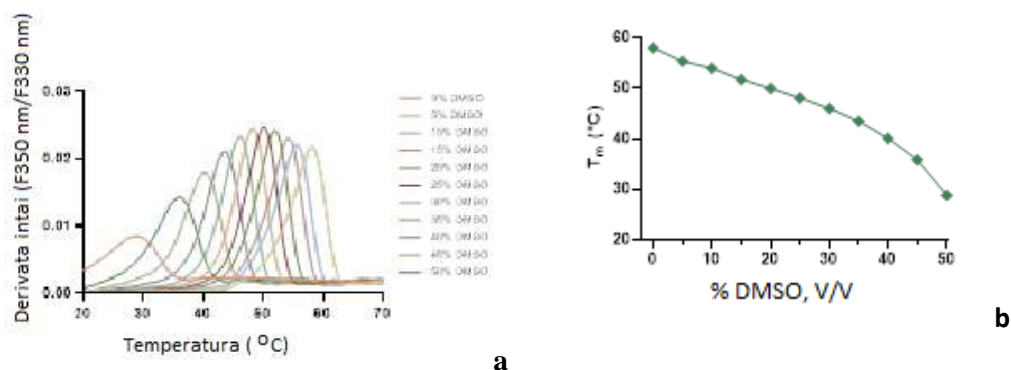


Figura 3.26 Procesul de denaturare termică a hCAII în prezența DMSO, determinat prin nanoDSF (Prometheus NT.48)

C. Efectul temperaturii asupra eficienței catalitice a hCA II

Enantiopuritatea maximă a alcoolului format (*ee* ~95%) s-a înregistrat la 20 și 25 °C, după care scade gradual și atinge doar 92% la 45 °C, temperatură la care s-a detectat și prezența substratului netransformat în amestec, probabil datorită inactivării enzimei a hCAII.

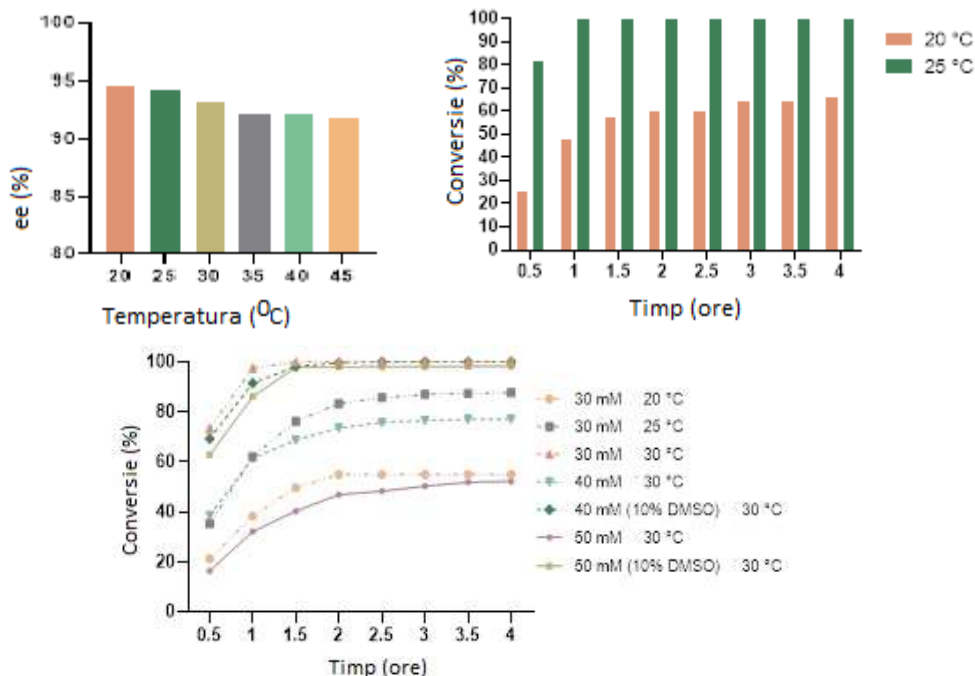


Figure 3.27. Efectul temperaturii asupra reacției de transformare a acetofenonei mediată de hCAII

D. Efectul DMSO asupra eficienței procesului de EKR catalizat *PpS-TA*

Testele preliminare arata (Figura 3.28) că transaminaza *PpS-TA* este eficientă chiar și la o concentrație de 20mM substrat racemic în prezența a 20% DMSO, cosolvent necesar pentru realizarea cascade enzimatice studiate.

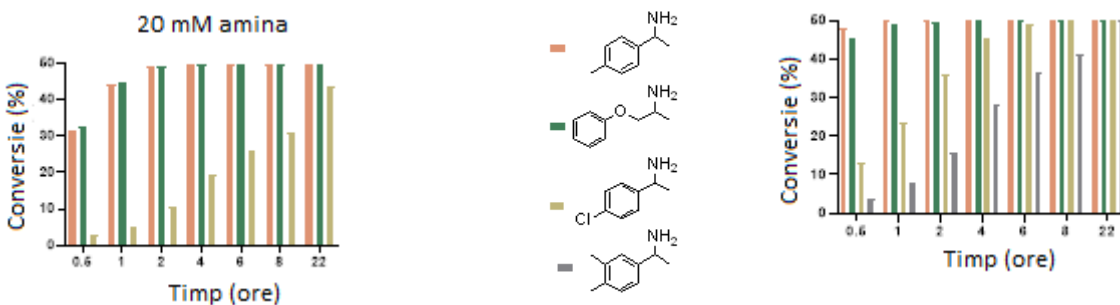


Figura 3.28. Evoluția conversiei în timp la EKR a unor amine chirale mediate de *PpS-TA* în soluție tampon HEPES pH 7, 50 mM cu 30% DMSO (V/V)

Studiul de dezvoltare a acestei cascade enzimatice este în curs de finalizare și va fi trimis spre publicare în perioada imediat următoare.

Director proiect,
Prof. Dr. Ing. László POPPE

László Poppe