



UNIVERSITATEA ,POLITEHNICA' din BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ

Nr. Decizie.....din.....

TEZĂ DE DOCTORAT

Studii privind cinetica unor procese enzimatic de oxido-reducere cu
importanță în industria de sinteză a zaharidelor

Kinetic studies on some oxido-reduction enzymatic processes of
importance in the monosaccharide industry

Autor: ing. Manuela Diana BUBOI (ENE)

Conducător de doctorat: Prof. dr. ing. Gheorghe MARIA

COMISIA DE DOCTORAT

Președinte	Prof. dr. ing. Mircea TEODORESCU	de la	Universitatea Politehnica din București
Conducător de doctorat	Prof. dr. ing. Gheorghe MARIA	de la	Universitatea Politehnica din București
Referent	Prof. / CS1 dr. ing. Ștefan SZEDLACSEK	de la	Institutul de Biochimie al Academiei Române București
Referent	Prof. dr. ing. Peter FRANCISC	de la	Universitatea Politehnica din Timișoara
Referent	Prof. dr. ing. Vasile LAVRIC	de la	Universitatea Politehnica din București

BUCUREȘTI 2013



MINISTERUL EDUCAȚIEI NAȚIONALE
Universitatea POLITEHNICA din București

Splaiul Independenței nr.313, București - 060042, ROMÂNIA
Telefon: 021 318 10 00; Fax: 021 318 10 01

Înregistrat ca operator de date cu caracter personal sub nr. 3291

Decizia nr. 224 / 25.07.2013

C ă t r e

Vă facem cunoscut că în ziua de a.c., în cadrul Scolii Doctorale de Chimie Aplicată și Știința Materialelor din Universitatea POLITEHNICA București, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**„STUDII PRIVIND CINETICA UNOR PROCESSE ENZIMATICE DE
OXIDO-REDUCERE CU IMPORTANȚĂ ÎN INDUSTRIA DE SINTEZĂ
A ZAHARIDEOR”**

elaborată de **BUBOI MANUELA - DIANA (ENE)**

în vederea acordării titlului științific de **DOCTOR**,

în domeniul fundamental **ȘTIINȚE INGINEREȘTI**

domeniul **INGINERIE CHIMICĂ**

cu următoarea comisie:

PRESEDINTE: **Prof.dr.ing. MIRCEA TEODORESCU**

CONDUCĂTOR

ȘTIINȚIFIC: **Prof.dr.ing. GHEORGHE MARIA**

MEMBRI: **C.S.I.dr.ing. ȘTEFAN SZEDLACSEK**

– Institutul de Biochimie al Academiei Române București

Prof.dr.ing. PETER FRANCISC

– Universitatea Politehnica din Timișoara

Prof.dr.ing. VASILE LAVRIC

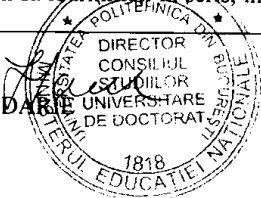
– Universitatea Politehnica din București

În acest scop vă trimitem rezumatul tezei de doctorat și vă invităm să participați la susținerea publică a tezei.

În cazul în care doriți să faceți eventuale aprecieri sau observații asupra conținutului lucrării, vă rugăm să le trimiteți scris, în dublu exemplar, pe adresa universității până la data de:

Rector,

George DABIE



Secretar,

Carmen POSTELNICU

Cuprins

	pag.
LISTĂ DE NOTĂȚII	4
REZUMAT	6
INTRODUCERE – OPORTUNITATEA TEMEI ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI	8
CAPITOLUL I - CONSIDERAȚII TEORETICE PRIVIND KINETICA PROCESELOR ENZIMATICE	13
I.1. REACȚII ENZIMATICE CU UN SUBSTRAT	20
I.1.1. Principalele etape ale catalizei enzimatic	21
I.1.2. Reacții enzimatic în condiții de staționaritate	22
I.1.3. Reacții enzimatic în condiții de nestaționaritate	25
I.1.4. Inhibiția catalizei enzimatic	26
I.1.5. Efecte cinetice ale activatorilor catalizei enzimatic	30
I.2. REACȚII ENZIMATICE CU DOUĂ SAU MAI MULTE SUBSTRATURI	30
I.3. FACTORII CARE INFLUENȚEAZĂ VITEZA REACȚIILOR ENZIMATICE	32
I.3.1. Dependența de temperatură a vitezei reacțiilor enzimatic	32
I.3.2. Dependența de pH a vitezei reacțiilor enzimatic	33
I.4. REACTIVITATEA ENZIMELOR LIBERE ȘI IMOBILIZATE	35
I.5. TIPURI DE REACTOARE ENZIMATICE EXPERIMENTALE ȘI INDUSTRIALE	39
I.5.1. Operarea în sistem discontinuu	41
I.5.2. Operarea în sistem semi-continuu (“fed batch”)	42
I.5.3. Operarea în sistem continuu	43
CAPITOLUL II – PROCESE ENZIMATICE ÎN INDUSTRIA ZAHARIDELOR	45
II.1. APLICAȚII INDUSTRIALE ALE ENZIMELOR - GENERALITĂȚI	45
II.2. TIPURI DE ÎNDULCITORI EXISTENȚI PE PIAȚA DIN ROMÂNIA	47
II.3. PROCESE ENZIMATICE ÎN INDUSTRIA ZAHARIDELOR CU APLICAȚII DIVERSE	49
CAPITOLUL III – SECȚIUNEA EXPERIMENTALĂ	60
III.1. REACTIVI ȘI ENZIME	60
III.2. SOLUȚII	62
III.3. ECHIPAMENTE	63
III.4. METODE ANALITICE	64

CAPITOLUL IV - DETERMINAREA EXPERIMENTALĂ A COEFICIENTULUI TOTAL DE TRANSFER MASIC AL OXIGENULUI	69
CAPITOLUL V - CONTRIBUȚII PRIVIND STUDIUL CINETICII OXIDĂRII ENZIMATICE A D-GLUCOZEI FOLOSIND PIRANOZ OXIDAZA (P2O_x)	79
V.1. GENERALITĂȚI PRIVIND P2O _x ȘI IMPORTANȚA SA ÎN INDUSTRIA ZAHARURILOR	80
V.2. CARACTERSTICI ALE CINETICII REACȚIILOR CATALIZATE DE P2O _x . INFLUENȚA CONDIȚIILOR DE LUCRU ȘI A PREZENȚEI CATALAZEI	85
V.3. EXPERIMENTE PRIVIND OXIDAREA D-GLUCOZEI ÎN ABSENȚA ȘI PREZENȚA CATALAZEI	95
V.4. MODELAREA CINETICII OXIDĂRII D-GLUCOZEI ÎN PREZENȚA CATALAZEI LA 30 ⁰ C	96
V.5. MODELAREA CINETICII OXIDĂRII D-GLUCOZEI ÎN PREZENȚA CATALAZEI LA 25 ⁰ C ȘI CONSIDERAȚII PRIVIND INGINERIA PROCESULUI	104
CAPITOLUL VI - CONTRIBUȚII PRIVIND STUDIUL CINETICII REDUCERII ENZIMATICE A CETO-D-GLUCOZEI FOLOSIND ALDOZ REDUCTAZA (ALR)	110
VI.1. GENERALITĂȚI PRIVIND ALR CA MEMBRU AL SUPERFAMILIEI ALDO-CETO REDUCTAZELOR	111
VI.2. CARACTERSTICI ALE CINETICII REACȚIILOR CATALIZATE DE ALR. INFLUENȚA CONDIȚIILOR DE LUCRU ȘI A PREZENȚEI NADPH ASUPRA CINETICII ALR	116
VI.3. EXPERIMENTE PRIVIND REDUCEREA ENZIMATICĂ A CETO-GLUCOZEI LA FRUCTOZĂ	126
VI.4. MODELAREA CINETICII REDUCERII CETO-GLUCOZEI LA FRUCTOZĂ ȘI CONTRIBUȚIA PRIVIND PERFORMANȚELE PROCESULUI	128
CONCLUZII GENERALE	140
CONTRIBUȚII ORIGINALE	144
BIBLIOGRAFIE	147
ANEXE	156

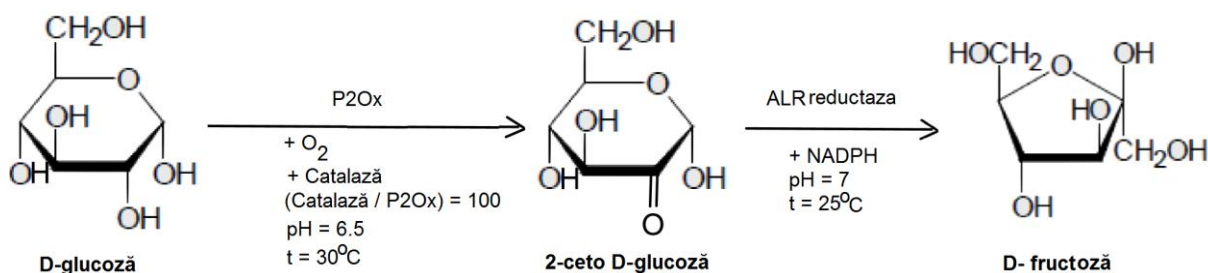
LISTĂ DE NOTĂȚII

A_{240}	-	absorbanța spectrofotometrică la 240 nm (unități relative)
c_j	-	concentrația speciei j , mM
c_{DO}^*	-	concentrația la saturație a oxigenului dizolvat, mM
$D = d \ln(V)/dt$	-	viteza de diluție a conținutului din reactor, s^{-1}
k_{cat}	-	numărul „turnover” al enzimei, s^{-1}
k_c, k_d, K_j	-	constante de viteză, (unități în s, U mL ⁻¹ , mM)
$k_{oxl} a$	-	coeficientul total de transfer masic gaz-lichid al oxigenului, s^{-1}
K_j	-	constanta enzimatică Michaelis-Menten (față de substratul c_j), sau constanta de inhibiție, mM, mM ^{α_j}
m	-	numărul speciilor observate
M_w	-	masa moleculară a apei, g mol ⁻¹
n	-	exponentul Yano-Koya
N	-	numărul total al punctelor experimentale (timp de înregistrare)
p	-	numărul parametrilor independenți din model
r_j	-	viteza de reacție a specie j , mM s ⁻¹ , U mL ⁻¹ s ⁻¹
r	-	numărul observațiilor (măsurătorilor)
s_y, s_y^2	-	abaterea standard a erorii modelului, sau dispersia erorii (în termeni relativi)
t	-	Timp (s), sau test statistic Student
v_m	-	constanta vitezei de reacție, s^{-1}
V	-	volumul de lichid, L
Y	-	coeficient stoechiometric
Grecești		
α_j	-	constanta de viteză (exponent al inhibiției)
ε_s	-	coeficient de elasticitate privitor la substrat
ε_{240}	-	coeficientul de extincție molară (în spectroscopie), mM ⁻¹ mm ⁻¹
λ	-	lungimea de undă (nm), sau valorile proprii ale inversei matricii de covarianță a parametrilor (modificate; Maria, 2004)
μ_m	-	numărul „turnover” al enzimei, mM s ⁻¹ (U mL ⁻¹) ⁻¹
ρ_w	-	densitatea apei, g L ⁻¹
σ	-	abaterea standard a erorii de măsurare, mM, U mL ⁻¹
π_{K_m}	-	coeficient de elasticitate privitor la constanta Michaelis-Menten
Index		
o	-	inițial
ox	-	compus acceptor de electroni
t	-	total
Indice superior		
*	-	saturație
$\wedge$	-	estimat

REZUMAT

Enzimele sunt catalizatori biochimici specifici vieții ce asigură desfășurarea proceselor metabolice (catabolism și anabolism) la nivel celular și care își mențin potențialul catalitic după extracția din organismul viu – această caracteristică fiind exploatată în scopuri economice diverse (industrie, medicină, mediu, agricultură). Procesele enzimatic industriale concurează în termeni de eficiență cu sinteza chimică complexă, decurgând cu o selectivitate și o specificitate ridicată, producând mai puține produse secundare, diminuând consumul de energie și generând mai puțină poluare a mediului. Cu toate acestea, enzimele au o aplicare încă limitată datorită costurilor mari de izolare, de stabilizare, sensibilității mari în raport cu condițiile de operare, reproductibilității reduse a bioprocesului, controlabilității dificile, și specificității mari de substrat. Multe din aceste inconveniente pot fi îndepărtate printr-o imobilizare eficientă a enzimelor pe suporti potriviți mediului de reacție, sau/și printr-o optimizare a condițiilor de lucru și a modului de operare al reactorului enzimatic selectat. În acest fel, reacțiile enzimatic devin alternative valoroase pentru obținerea unei game largi de produse din industria alimentară și farmaceutică, fiind folosite în egală măsură în diverse aplicații cum ar fi testele medicale, sau senzori biologici. În acest context, tematica tezei privind obținerea fructozei de înaltă puritate prin aplicarea unui nou procedeu enzimatic în două trepte (denumit și 'Cetus'), este de mare interes pentru industria zaharidelor.

Prezenta lucrare își propune să studieze experimental și teoretic cinetica și mecanismul celor două etape a procesului 'Cetus', așa cum sunt reprezentate mai jos:



Procesul include două reacții enzimatic, studiate separat, după cum urmează:

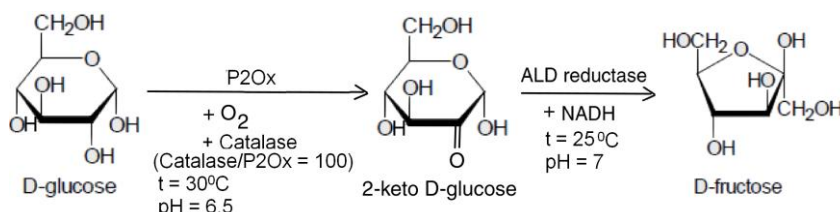
- D-glucoză este oxidată regiospecific la poziția C2-piranozică sub acțiunea piranoz-oxidazei (P2Ox) la 2-ceto-glucoză. Pentru evaluarea activității enzimatic a P2Ox comerciale (Sigma Aldrich) în prezența catalazei și a cineticii de reacție s-a elaborat un plan experimental complex, realizat în sistem discontinuu, cu respectarea condițiilor optime de pH = 6.5 și oxigenare, cu varierea concentrației de enzimă liberă și catalază (0 - 300 U U⁻¹ catalază / P2Ox), pentru două temperaturi diferite (25 °C și 30 °C) la care activitatea P2Ox și a catalazei este maximă. În urma acestor determinări a fost propus un model cinetic complex ce include pe lângă reacția principală (de tip Ping-Pong-Bi-Bi) și reacțiile de inactivare a P2Ox de către apa oxigenată și de descompunere in-situ a H₂O₂ sub acțiunea catalitică a catalazei (cinetică generalizată de tip Yano-Koya).
- Ceto-glucoză este redusă la fructoză sub acțiunea catalitică a aldoz reductazei (ALR) în prezența co-enzimei de nicotin adenin dinucleotid fosfat NAD(P)H. Evaluarea activității enzimatic a ALR (forma comercializată de ATGEN), precum și determinarea cineticii de reacție realizată pe baza unui plan experimental complex condus în sistem discontinuu, cu menținerea constantă a condițiilor optime de pH = 7 și temperatură 25°C, varierea concentrației de enzimă liberă, substrat și cofactor. Pe baza experimentelor, s-a propus un mecanism de reacție complex, similar modelelor analoge din literatură propuse pentru reducerea zaharidelor și ceto-derivaților (glucoză, galactoză, xiloză, gliceraldehidă) de către ALR / NAD(P)H sau alte aldo-ceto reductaze similare. Experimentele și modelul cinetic confirmă modificările conformaționale ale complexului E•NADP⁺ pentru a permite eliberarea NADP⁺ (etapa limitativă de viteză a întregului proces reductiv). Rezultatele confirmă de asemenea afinitatea extrem de mare a enzimei ALR față de NADPH, complexul ALR•NADPH fiind cvasi-prezent pe toată durata reacției de reducere. Experimentele realizate subliniază necesitatea stabilizării enzimei prin imobilizare, precum și a regenerării continue in-situ a co-factorului.

În concluzie, modelele cinetice propuse pentru cele două etape enzimatic ale procesului Cetus pot fi utilizate pentru calcule ingineresti de dezvoltare ulterioară a procesului de obținere a fructozei pe cale enzimatică și pentru optimizarea reactorului enzimatic.

ABSTRACT

Enzymes are the catalysts for biochemical processes of life, ensuring development of metabolic processes (catabolism and anabolism) at the cellular level. They preserve their catalytic potential after separation from the living organisms. This characteristic is used in various economic applications (industry, medicine, environment, agriculture). The industrial enzymatic processes compete in efficiency with the complex chemical synthesis, occurring with a high selectivity and specificity, producing fewer byproducts, consuming less energy, and producing less environmental pollution. However, enzymes have limited applications, due to the required high costs for purification, and stabilization, due to their high sensitivity to the operating conditions, low bioprocess reproducibility, difficult controllability, and too high substrate specificity. Many of these disadvantages can be removed by an efficient immobilization of enzymes on suitable supports, and / or by optimizing the operating conditions and the operating policy of the selected enzymatic reactor. Thus, enzymatic reactions become valuable alternatives for obtaining a wide range of food and pharmaceutical products, being equally used in various applications such as medical tests or biological sensor production. In this context, the thesis subject to obtain highly pure fructose by employing a new two-step enzymatic process (called 'Cetus' process) is of great interest for the sugar and sweetener industry.

This paper aims at studying, experimentally and theoretically, the mechanism and kinetics of the two stages of the process Cetus process, as depicted below:



The process includes two enzymatic reactions, studied separately, as follows:

- D-glucose is regiospecifically oxidized at the C2-pyranosic position to 2-keto-glucose under the action of pyranose oxidase (P2Ox). To assess the enzymatic activity of commercial P2Ox (Sigma Aldrich) in the presence of catalase and to determine the reaction kinetics, a complex experimental plan was design, conducted in a batch system under optimum pH= 6.5 and oxygenation conditions, with varying concentrations of free enzyme and catalase (0-300 U-1 U catalase / P2Ox), for two different temperatures (25°C to 30°C) at which P2Ox and catalase activity is maximum. Following these experiments, a complex kinetic model was proposed, by including in addition to the main reaction (of Ping-Pong-Bi-Bi type) also the inactivation reaction of P2Ox by hydrogen peroxide, and the in-situ decomposition of H₂O₂ due to the catalytic action of catalase (of a generalized Yano-Koya kinetics).
- Ceto-glucose is reduced at fructose under the catalytic action of Aldose reductase (ALR) in the presence of nicotine adenine dinucleotide phosphate NAD(P)H as co-enzyme. Evaluation of the ALR enzymatic activity (marketed by ATGEN) and the study of the reaction kinetics were based on a complex experimental design carried out in a batch system, by maintaining the optimum condition of constant pH=7 and 25°C, and by varying the concentrations of free enzyme, substrate, and cofactor. Based on these experiments, a complex reaction mechanism was proposed, similar to the analogous models from literature used for the reduction of saccharides and keto compounds (glucose, galactose, xylose, glyceraldehyde) by ALR / NAD(P)H or other similar aldo-keto reductases. Experiments and kinetic model confirm the conformational changes of the complex E•NADP⁺ to allow the release of NADP⁺ (rate-limiting step of the whole reductive process). The results also confirm the extremely high affinity of the ALR enzyme for NADPH, the complex ALR^{*}•NADPH being all-times present during the reduction reaction. The developed experiments underline the need to stabilize the enzyme by immobilization, and the in-situ need of a continuous regeneration of the co-factor.

In conclusion, the proposed kinetic models for the two enzymatic steps of the process Cetus process, can be used for engineering calculations for further development of the fructose production process by an enzymatic route, and for optimization of the enzyme reactor.

INTRODUCERE – OPORTUNITATEA TEMEI ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI

Evoluția societății în ansamblu este strâns legată de dezvoltarea științei și tehnicii, de succesele omului în competiție cu natura, impunând o nouă percepție și abordare a factorilor care afectează sănătatea umană, în contextul problemelor legate de poluare, conservare și managementul resurselor naturale. Astfel valorificarea superioară a resurselor naturale, identificarea unor noi surse de materie primă / intermediari precum și schimbarea atitudinii față de mediul ambiant sunt deziderate majore ale strategiilor politice și sociale la nivel național și internațional, datorită creșterii demografice și a ridicării standardelor de viață. În 1992, Summit-ul Pământului de la Rio de Janeiro a atribuit biotehnologiei un rol important prin lansarea unui nou concept, bazat pe trilogia biodiversitate, schimbare globală și dezvoltare durabilă.

Având în vedere faptul că în ansamblu său biotehnologia reprezintă un domeniu multidisciplinar al științelor naturii, tehnicii, tehnologiei și producției industriale, progresele înregistrate în domeniul cercetărilor de genetică și inginerie genetică, de biologie celulară și moleculară, de biochimie, biofizică și microbiologie au favorizat dezvoltarea acestei ramuri tehnologice, care realizează printre cele mai revoluționare concepte și aplicații industriale, cum ar fi: obținerea de vaccinuri și medicamente, produse alimentare și suplimente nutritive, biosinteze de intermediari chimici, procese enzimaticice / biologice de obținere a energiei, de tratare a poluanților și deșeurilor, etc. În prezent, aplicarea biotehnologiilor ce implică utilizarea microorganismelor existente în mod natural, selecționate prin tehnici convenționale sau reprogramate prin tehnici de inginerie genetică, sau utilizarea componentelor celulare a plantelor și animalelor, cunoaște o creștere exponențială având un impact puternic asupra îmbunătățirii calității vieții prin creștere economică.

Ca urmare a cercetărilor derulate, zilnic apar noi descoperiri în Enzimologie / Biosinteza enzimatică cu implicații majore în medicină și economie, cum ar fi: facilitarea obținerii unor mari cantități de proteine cu diverse aplicații (hormoni, interferon, enzime) greu de izolat din matricea naturală, imobilizarea de enzime în scopul optimizării bioprocесelor industriale, îmbunătățirea tehnologiilor fermentative. Un domeniu în care biotehnologia a produs o adevărată revoluție este tehnologia enzimatică, în care s-au dezvoltat numeroase metode de izolare a enzimelor de origine microbiană, convenabile atât din punct de vedere al randamentului cât și a costurilor de producție, timpul de fermentație fiind scurtat, mediul de cultură mai ieftin, iar etapele de purificare mai simple și mai eficiente.

Datorită capacității enzimelor de a asista catalitic toate transformările substanțelor din structurile organismelor vi, ele au devenit *instrumente cheie în biotehnologie*, fiind utilizate atât pentru a înțelege căile metabolice, cât și pentru a realiza *in vitro* procese de sinteză sau ameliorare a unor produse. Mecanismele care guvernează astfel de transformări sunt remarcabil de precise, fiind formate din cicluri unidirecționale desfășurate cu ajutorul unor pași discreți de cuplare-decuplare. Astfel, se pot înlocui lanțuri complicate de sinteze chimice succesive prin câteva sinteze enzimaticice, cu selectivități și randamente mari, cu reducerea drastică a consumului de energie, și de produse secundare (Wang, 2009; Vasić-Rački et al., 2011). Dezavantajul utilizării limitate a enzimelor rezidă din costul mare de obținere al lor, stabilitatea redusă în mediul de reacție, specificitatea prea mare de substrat, precum și sensibilitatea ridicată în raport cu parametrii de operare (temperatură, pH, stres hidro-mecanic sau chimic). Problemele de stabilitate și dificultățile de separare din mediul de reacție au fost surmontate prin imobilizarea acestora pe diverse suporturi (celuloză, amidon, silicagel, carbon, hidrogeluri, cleiuri, polimeri, utilizați ca particule poroase, fibre, folii, etc.). Astfel, reacțiile enzimaticice ce prezintă o selectivitate și specificitate foarte mare au devenit căi atractive pentru obținerea unei game largi de produse în industria alimentară, farmaceutică, a detergentilor, textilă, sau în cea de biosinteză și de valorificare a deșeurilor industriale (Wang, 2009; Liese et al., 2006). Totuși, deși există puternice similarități între proiectarea și operarea proceselor chimice și a celor biologice / biochimice, din cele câteva mii de enzime studiate în

detaliu doar o mică parte sunt folosite în prezent în aplicații tehnice sau terapeutice (Buchholz & Kasche, 1997, Liese, 2006).

Enzimele izolate sau imobilizate sunt utilizate în reactoare industriale de mic sau mare tonaj de mai bine de 50 de ani, fiind competitive în termeni de eficiență în raport cu sintezele chimice clasice. Procesele biocatalitice produc mai puține reziduuri, consumă mai puțină energie, și generează o poluare mai mică a mediului, utilizând concentrații mai mici de catalizator și condiții de reacție mult mai moderate (Moulijn et al., 2001; Gavrilesu & Chisti, 2005). În prezent se investesc eforturi considerabile în ingineria proteinelor, la nivel de proiectare moleculară, precum și în tratamente fizico-chimice cuplate cu fabricarea de nanostructuri bioactive, cu scopul optimizării materialului suport în vederea îmbunătățirii eficienței catalitice și a stabilității enzimei. Aceste eforturi încearcă să depășească actualele dificultăți din industria de biosinteză, respectiv costurile mari de producere a unor enzime suficient de stabile și de insensibile la impurități și la variații mici ale condițiilor de operare, dificultăți care necesită un control avansat al procesului.

Preparatele enzimatice folosite la scară industrială se axează pe metabolismul carbohidraților sau hidroliza proteinelor, cele mai utilizate fiind amilazele din *Bacillus subtilis* (stabile termic), *Aspergillus oryzae* sau *A. Niger* iar cele cu utilizare mai moderată sunt aminoacilaza, streptokinaza, penicilaza, triacilglicerol lipaza, catalaza, cheratinaza și fosfodiesteraza I (Popescu, 2002). Rezervele de carbohidrați pot servi ca substrat pentru un număr mare de procese chimice, fermentative și enzimatice. În prezent, doar reacțiile de hidroliză și izomerizare sunt utilizate în conversia enzimatică a carbohidraților la scară industrială. *Exo-enzimele* atacă polimerii de la un capăt al moleculei, îndepărtând secvențial una câte una unitățile monomerice, iar pe de altă parte, *endo-enzimele* atacă porțiuni interioare ale polimerilor, eliberând fragmente de moleculă mai mici. În linii mari, acțiunea endo-enzimelor conduce la solubilizarea macromoleculelor prin reducerea mărimii lor, în timp ce exo-enzimele produc specii cu mase moleculare mai mici din produșii de hidroliză ai endo-enzimelor (Najafpour, 2007).

Una din direcțiile de cercetare moderne ale tehnologiei de biosinteză enzimatică, investigată și în lucrarea de față, este aceea a producerii industriale de monozaharide și derivați ai lor cu utilizare în industria alimentară (îndulcitori) și medicină (medicamente). Dintre acestea, producția industrială de fructoză, studiată în detaliu în cadrul tezei, este într-o creștere accentuată în ultimii ani (ca. 1 milion de tone în 2011; Wikipedia, 2013) datorită tendinței generale de înlocuire a îndulcitorilor clasici (zaharoza) cu cei moderni, mai puțin nocivi pentru organism chiar și când sunt consumați în mod sistematic.

Implicațiile îndulcitorilor de tip mono- și poli-zaharidic în alimentație și în procesele metabolice determină în organismul uman, în funcție de natura și cantitatea îndulcitorului ingerată, o serie de modificări metabolice care nu sunt întotdeauna benefice (spre exemplu, zaharoza consumată în cantitate mare produce tulburări metabolice cu efecte negative). În scopul eliminării acestor neplăceri, s-au extins cercetările pentru obținerea unor îndulcitori naturali, ca de exemplu fructoza, cu putere de îndulcire mai ridicată decât a zaharozei și cu efecte benefice asupra stării de sănătate a individului.

În prezent multe dintre aceste zaharuri și derivații lor sunt obținuți la nivel industrial fie prin procese de hidrogenare chimică, cu o secvență de reacții complicate conduse în condiții severe cu multe limitări (materii prime de puritate avansată, temperaturi și presiuni ridicate, randamente mici), fie prin procese enzimatice de eficiență moderată. De exemplu, izomerizarea enzimatică a glucozei la fructoză este limitată termodinamic la o conversie de ca. 50%, iar operarea la temperaturi mai mari și cu reciclu este costisitoare necesitând coloane cromatografice mari pentru separarea glucozei de fructoză. În plus, izomeraza este puțin stabilă, necesitând ajustarea continuă a pH-ului și eliminarea ionilor de calciu existenți în materia primă (soluție de glucoză) provenită din hidroliza enzimatică a amidonului. Purificarea fructozei de aldoze alergene este de asemenea o

problemă stringentă pentru acest proces industrial (Liese et al., 2006; Sierks, 1994;. Soetaert, 1999; Wisselink, 2002)

Sinteza în cantități din ce în ce mai mari de fructoză este impusă de utilizarea sa ca îndulcitor de substituție pentru diabetici. Actualmente, *diabetul zaharat* a devenit o adevărată pandemie cu o prevalență și o incidență în continuă creștere în toate țările dezvoltate și în multe țări în curs de dezvoltare, inclusiv în țara noastră. La nivel mondial sunt înregistrate aproximativ 170 milioane de persoane cu diabet zaharat, estimându-se ca până în 2030 numărul cazurilor de diabetici să se dubleze (360 de milioane de persoane). În Europa prevalența acestei boli este de 7,8 % fiind afectați aproximativ 48 milioane de adulți, iar în România 3 – 5 % din populația generală, peste 75 % din cazuri fiind pacienți cu diabet tip 2 (Stumvoll et al., 2005; Wild et al., 2004). Prin urmare, așa cum rezultă din datele recente ale studiului SEPHAR II, o atenție din ce în ce mai mare este acordată găsirii, fabricării, și utilizării de îndulcitori sintetici, neagresivi, care să substituie utilizarea zahărului și a glucozei în alimente.

Deoarece procesul de metabolizare a fructozei în organismul uman este unul pasiv, fără implicarea insulinei, iar manitolul (un produs de hidrogenare al fructozei, considerat necariogenic) a primit valoarea 0 pentru indicele glicemic (75% din cantitatea ingerată fiind fermentată de flora intestinală iar restul fiind absorbită la nivelul intestinului subțire și eliminată prin urină), aceste aspecte conferă atractivitate unor zaharuri și derivaților lor pentru industria farmaceutică și alimentară, fiind utilizați ca îndulcitori și diuretici, în special în alimentele destinate persoanelor diabetice (Lee et al., 2001). Cu scopul minimizării și / sau eliminării modificărilor metabolice determinate în organismul uman, de îndulcitorii de tip mono- și polizaharidici utilizați în alimentație s-au extins cercetările pentru obținerea unor îndulcitori naturali, de tip fructoză, cu putere de îndulcire mai ridicată decât a zaharozei și cu efecte benefice asupra stării de sănătate a individului.

* * *

În contextul actual al creșterii cererii de îndulcitori de sinteză, și al dezavantajelor asociate proceselor de fabricație existente a fructozei prin hidrogenare, prin izomerizarea glucozei, sau prin hidroliza unor polizaharuri (ex. inulina), scopul lucrării de față îl constituie studiul detaliat, experimental și teoretic, al caracteristicilor cinetice și performanțelor unui *proces alternativ de fabricare a fructozei* prin două reacții enzimaticice succesive, de oxidare și de reducere, respectiv procedeul Cetus (Leitner et al., 1998).

Acest procedeu se dorește a fi o alternativă atractivă atât la procedeul chimic cât și la cele enzimaticice aplicate în prezent, deoarece se vor utiliza oxido-reductaze ce catalizează reacția de oxidare regioselectivă la carbonul 2 a glucozei și a altor zaharuri în prezența oxigenului molecular cu formare de apă oxigenată și 2-cetozaharuri. Produsul de reacție din prima etapă va fi redus enzimatic conducând la obținerea de zaharide cu grad mare de puritate, lipsite de săruri ale metalelor tranziționale sau zaharide de tip aldoză (alergene), cu o productivitate ridicată.

Prima etapă din procedeul Cetus, respectiv oxidarea enzimatică a D-glucozei este un proces complex, activitatea enzimei depinzând de un număr mare de variabile: concentrația substratului și a enzimei, stabilitatea enzimei, pH-ul, temperatura, oxigenul introdus în mediul de reacție, concentrația de apă oxigenată generată în reacție, urmele de impurități, și eficiența amestecării lichidului din bioreactor (Artolozaga et al., 1997; Leitner et al., 1998; Treitz et al, 2001). Pe de altă parte, și al doilea proces enzimatic ce urmărește reducerea enzimatică a ceto-D-glucozei la fructoză este la fel de complex, eficiența sa depinzând de concentrația de substrat, de enzimă și co-enzimă (NADPH), de stabilitatea acestora, de pH și temperatură, de prezența impurităților, etc. (Maria & Ene, 2013).

Având în vedere că un aspect critic în utilizarea eficientă a oxidazei în procesul de bioconversie a glucozei este reprezentat de menținerea unei concentrații minimale de oxigen dizolvat în mediul de reacție, o primă etapă a studiului a avut în vedere *evaluarea coeficientului total de transfer masic al oxigenului* în bioreactor, precum și dependența acestuia de condițiile de operare (Lee et al., 1994; Ene et al., 2011). Evaluarea cu acuratețe a rezistenței transferului de masă în bioreactoarele aerate

are o importanță crucială în interpretarea corectă a datelor cinetice enzimatic și în evitarea controlului difuzional al procesului.

Studiul celor două procese enzimatic s-a realizat pe baza unui program experimental extins în vederea *studierii influenței parametrilor de proces* (timp de reacție, efectul introducerii în sistem a unor co-enzime în scopul măririi stabilității oxidazei, concentrația de substrat și co-enzimă, temperatura, pH-ul). Ceto-glucoza biosintetizată în prima etapă a cercetării prin oxidarea D-glucozei a fost apoi redusă enzimatic la fructoză folosind NADPH (regenerabil) ca donor de protoni. Datele experimentale cinetice, privind ambele procese enzimatic, au oferit posibilitatea elaborării unui model cinetic complex al acțiunii oxidazei asupra glucozei și a reductazei asupra ceto-glucozei. Modelul matematic elaborat va permite evaluarea din punct de vedere al ingineriei și eficienței procesului în diverse condiții de operare și predicția condițiilor optime de operare ale reactorului enzimatic industrial.

Sintetizând, principalele **Obiective** urmărite a fi atinse în cadrul tezei sunt următoarele:

1. Studiul experimental și teoretic al activității enzimatic a piranoz-oxidazei (P2Ox) și a cineticii procesului de oxidare enzimatică a D-glucozei la 2-ceto-D-glucoză cu importanță în industria de sinteză a derivaților de zaharide.

Obiective derivate:

- 1.1. Evidențierea importanței P2Ox și a fructozei în industria zaharurilor.
- 1.2. Determinarea experimentală a coeficientului total de transfer termic al oxigenului în mediul de reacție într-un bioreactor experimental de laborator.
- 1.3. Realizarea unui plan experimental de studiu a cineticii procesului de oxidare enzimatică, și obținerea curbelor cinetice experimentale ale dinamicii speciilor chimice în condiții variate de reacție (două temperaturi, 25°C și 30°C; variația raportului inițial Catalază / P2Ox);
- 1.4. Propunerea unui mecanism și a unei scheme de reacții enzimatic pentru procesul de oxidare a D-glucozei în prezența P2Ox și catalazei.
- 1.5. Propunerea unui model cinetic și identificarea parametrilor acestuia la două temperaturi de lucru diferite și la un pH = 6.5 optim.
- 1.6. Considerații privind ingineria procesului și predicția pe baza modelului cinetic elaborat ale condițiilor optime de operare în vederea maximizării duratei de viață a enzimei P2Ox cu păstrarea unei conversii ridicate.

2. Studiul experimental și teoretic al activității enzimatic a aldooz-reductazei (ALR) și a cineticii procesului de reducere enzimatică a 2-ceto-D-glucozei la D-fructoză cu importanță în industria de sinteză a îndulcitorilor.

Obiective derivate:

- 2.1. Evidențierea importanței ALR în reacții de reducere în industria zaharurilor pentru obținerea de fructoză de înaltă puritate.
- 2.2. Realizarea unui plan experimental de studiu a cineticii procesului de reducere enzimatică, și obținerea curbelor cinetice experimentale ale dinamicii speciilor chimice în condiții variate de reacție (variația concentrației inițiale a substratului, a enzimei ALR, și a co-enzimei NADPH);
- 2.3. Propunerea unui mecanism și a unei scheme de reacții enzimatic pentru procesul de reducere a 2-ceto-D-glucozei în prezența ALR și NADPH.
- 2.4. Propunerea unui model cinetic și identificarea parametrilor acestuia în condițiile optime de temperatură și pH ale ALR precizate în literatură (25°C, pH = 7).
- 2.5. Considerații privind ingineria procesului și modalități de îmbunătățire a stabilității enzimei și de regenerare a co-enzimei.

Experimentele s-au desfășurat în cadrul Laboratorului de Transfer de Masă al Universității Politehnica București (studiul coeficientului de transfer de masă al oxigenului, și al cineticii reacției enzimatic de oxidare a D-glucozei), precum și în laboratoarele companiei Biotechnos s.a. (Otopeni, România) (studiul cinetic al reducerii enzimatic a ceto-glucozei, precum și analizele spectrofotometrice, de activitate enzimatică și volumetrice).

În sens larg, obiectivele propuse au urmărit dezvoltarea cercetării științifice din domeniul biotehnologiei prin aplicarea de tehnici experimentale și de calcul avansate în vederea caracterizării mai precise și mai detaliate a proceselor enzimatic industriale cu scopul proiectării, operării optime, și controlului avansat al acestora.

Rezultatele obținute, publicate deja în reviste de largă circulație internațională, își vor găsi în mod cert o aplicație imediată privind studiile de inginerie ale procesului enzimatic Cetus, în vederea:

- determinării condițiilor optime de operare a fiecărei etape enzimatic în parte
- ridicarea la scară a procesului și proiectarea optimală a reactorului enzimatic (semi-)continuu utilizat pentru reacția de oxidare a D-glucozei, și pentru cea de reducere a ceto-D-glucozei la fructoză
- determinării modalității de îmbunătățire a stabilității celor două enzime prin imobilizare, sau co-imobilizare împreună cu catalaza
- determinării modalității și condițiilor optime de regenerare in-situ a co-enzimei NADP+
- analizei eficienței economice globale a procesului cetus comparativ cu alte tehnologii de producere industrială a fructozei
- generalizării rezultatelor prin „translatarea” structurii celor două modele cinetice elaborate și testarea aplicabilității lor și în cazul altor reacții de oxidare și de reducere enzimatic.

CAPITOLUL I

CONSIDERAȚII TEORETICE PRIVIND CINETICA PROCESELOR ENZIMATICE

Procesele biologice sunt deosebit de complexe prin natura și rapiditatea lor, implicând un număr mare de reacții biochimice, catalizate de un număr corespunzător de enzime. Fiecare enzimă prezintă un mecanism particular de acțiune ceea ce explică varietatea mare a reacțiilor biochimice și ordonarea strictă a acestora în spațiu și în timp la nivel celular. Totalitatea proceselor complexe de sinteză, de asimilare (cu înmagazinare de energie), de degradare și de dezasimilare (însoțită de eliberare de energie), pe care le suferă substanțele dintr-un organism viu poartă denumirea de *metabolism*. Datorită complexității deosebite a unui sistem biologic (zeci de mii de compuși și sute de mii de reacții aflate într-o interdependență greu de descifrat), modelarea cinetică structurată a tuturor reacțiilor enzimatic și de transport metabolic ce se petrec într-o celulă pe durata unui ciclu de viață nu poate fi realizată în detaliu, ci doar la un nivel aproximativ și pentru câteva etape metabolice (Maria, 2005, 2006).

Cataliza este definită ca fiind procesul de accelerare al reacțiilor chimice prin intermediul unor substanțe (denumiți catalizatori) care nu suferă modificări chimice permanente în urma acestui proces. Catalizatorii reacțiilor biochimice sunt enzimele - moleculele responsabile de realizarea celor mai multor reacții chimice din organismele vii. În absența enzimelor, aceste reacții ar avea loc cu o viteză de reacție mult prea mică pentru a putea fi realizat procesul metabolic pe durata unui ciclu celular. Se consideră că rolul enzimelor este acela de a micșora energia de activare a reacțiilor pe care le catalizează, altfel, bariera energiei de activare poate fi depășită în absența catalizatorului numai la temperaturi foarte ridicate. Similar catalizatorilor chimici, enzimele se supun aceluiași legi ale catalizei: viteza unei reacții chimice este mărită, fără a se consuma în reacție sau a suferi o modificare chimică; permit realizarea reacțiilor la temperatură fiziologică datorită scăderii energiei de activare; subdivizează o reacție chimică în multe etape “pași mici” ceea ce permit apariția unor puncte de control prin care fluxul căii metabolice poate fi reglat din punct de vedere al vitezei în funcție de starea metabolică a organismului, prin acțiunea asupra activităților enzimelor implicate; nu afectează energia eliberată într-o reacție; nu modifică echilibrul termodinamic al unei reacții; fac posibilă atingerea rapidă a echilibrului în cazul reacțiilor chimice (Dumitru, 1983; Popescu, 2001).

Din punct de vedere chimic, enzimele cunoscute sunt proteine simple (holoproteine), ale căror unități de bază sunt aminoacizii legați între ei prin legături peptidice, sau pot fi constituite dintr-o parte proteică și una neproteică (heteroproteine). Faptul că enzimele sunt macromolecule proteice le conferă toate proprietățile fizico-chimice ale acestei clase de biomolecule: solubilitate, proprietăți osmotice și de difuzie, schimburi ionice, denaturare termică și labilitate la anumiți reactivi chimici (Dumitru,1983). Enzimele posedă structurile caracteristice tuturor proteinelor comportând patru grade de complexitate: structură primară, secundară, terțială și cuaternară. Specific fiecărei proteinezime este compoziția și secvența aminoacizilor ce constituie structura primară precum și numărul de lanțuri polipeptidice. Din structura primară derivă celelalte trei structuri, proprietățile fizico-chimice, configurația tridimensională și proprietățile imunologice ale protein-enzimei. În cazul proteinezimelor specificitatea funcțională este un cumul de anumite conjuncturi topografice, realizată prin structura tridimensională a unuia sau mai multor lanțuri polipeptidice. Devine astfel eficientă, în mod specific, o anumită *zonă activă* (centru catalitic activ, situs catalitic) care cuprinde un număr relativ mic de aminoacizi reprezentând uneori o parte restrânsă din întreaga proteină, prin care se manifestă conținutul informațional al acesteia. *Centrul activ* nu este situat în interiorul unui singur lanț peptidic, acesta putând cuprinde grupuri care se dispun în două sau mai multe lanțuri peptidice, fiind conținute într-un plan care poate secționa transversal în mai multe puncte un lanț peptidic cu o anumită aranjare spațială. Reactivitatea centrului activ depinde astfel nu numai de existența situsului de combinare a substratului, dar și de aranjarea spațială a grupelor de contact, deci de configurația întregului edificiu proteic, enzimele manifestând astfel următoarele tipuri de *specificitate*: de substrat, de reacție și stereochimică (Blanch & Clark, 1997, Iordăchescu et al.,1991; Niculita et al., 2006; Oniscu et al., 1978).

Un indicator al capacității catalitice este reprezentat de numărul „turnover” („turnover number”) al enzimei respective ce este definit ca fiind numărul de molecule de substrat transformate în produs, per secundă, în condițiile în care enzima este saturată cu substrat. Capacitatea catalitică a enzimelor se datorează interacțiilor moleculare precise ce apar la nivelul centrului activ, care micșorează bariera de energie și favorizează formarea stării de tranziție (Dumitru,1983).

Cataliza enzimatică este superioară *catalizei omogene* și *heterogene* concentrând avantajele acestor două tipuri de cataliză. Astfel, dispersia moleculară asigură un mare număr de zone de reacție. Mărimea și flexibilitatea lanțurilor moleculare asigură: o fixare corectă a reactanților, posibilitatea unor acțiuni modulate exercitate de efectori alosterici pe suprafețele alosterice reglatoare, altele decât centrii activi, precum și o intervenție mai pronunțată a gradelor de libertate interne ale lanțului în cadrul actului catalitic. Dat fiind faptul că enzimele sunt proteine, proprietățile lor sunt puternic influențate de mai mulți factori de mediu (temperatură, presiune, pH, solvenți chaotropici, tenside, agenți oxidanți, ioni de metale grele, agenți de chelare, impurități care blochează situsurile active ale enzimelor). Dintre aceștia, temperatura și prezența unor reactivi chimici pot contribui în mod hotărâtor la inactivarea enzimelor. Perturbațiile activității enzimatic datorate reactivilor chimici pot fi evitate prin înlocuirea lor cu alți reactivi, însă temperatura produce efecte opuse asupra activității enzimatic și a stabilității acesteia motiv pentru care este considerată variabila cheie în orice proces biocatalitic (Blanch & Clark, 1997, Iordăchescu et al.,1991; Niculita et al., 2006; Oniscu et al., 1978). Viteza reacțiilor catalizate enzimatic este afectată și de prezența inhibitorilor, respectiv a compușilor ce scad eficiența enzimei fără să compromită activitatea enzimei în totalitate. În funcție de interacțiile ce au loc între compusul cu capacitate inhibitorie și enzimă, inhibitorii sunt clasificați în două mari clase: *covalenți* (reacționează covalent cu enzima scăzându-i eficacitatea, mai sunt cunoscuți sub denumirea de inactivatori) și *non - covalenți*. Procesul de inhibiție poate fi *reversibil* (atunci când la îndepărtarea inhibitorului din sistem se revine la activitatea enzimatică inițială, iar procesul de inhibiție se caracterizează prin atingerea unei stări de echilibru dinamic) sau *ireversibil* (când procesul de inhibiție este treptat și total). În funcție de tipul de inhibiție provocată enzimelor, inhibitorii sunt la rândul lor de două tipuri: *inhibitori ireversibili* (descresc concentrația enzimei active cu descreșterea concentrației complexului ES) și *inhibitori reversibili*. Atunci când concentrația unui inhibitor scade, activitatea enzimei este regenerată (Dumitru,1983)..

Unele specii chimice pot stimula o reacție enzimatică, modificând fie afinitatea enzimei față de substrat ($1/K_m$), fie viteza maximă de reacție. Cei mai întâlniți sunt cationii metalici (Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+}) cu volum mic (raza ionică în domeniul $0,78 \div 1,03 \text{ \AA}$) a căror acțiune este una specifică. Se cunosc cazuri de antagonisme ionice când Na^+ acționează ca inhibitor al acțiunii K^+ , iar Ca^{2+} ca inhibitor al acțiunii Mg^{2+} (Dumitru, 1983).

Aplicabilitatea catalizatorilor naturali, respectiv enzimele, în procesele industriale este adeseori limitată sau chiar imposibilă datorită faptului că enzimele sunt adaptate la condițiile naturale și nu la cele industriale. Astfel stabilitatea *in vitro* a enzimelor și a proteinelor reprezintă un punct critic în dezvoltarea unei biotehnologii deoarece atât conservarea, cât și stabilitatea operațională afectează randamentul și calitatea produsilor comerciali obținuți cu ajutorul enzimelor. Stabilitatea în condiții de păstrare („shelf-life”) se referă la menținerea capacității catalitice a enzimei pe perioada dintre obținere și momentul utilizării, în timp ce stabilitatea în operare („half-life”, $t_{1/2}$) caracterizează durata de utilizare a enzimei în biosinteze. În prezent, folosirea enzimelor libere (suspendate) în biosinteze industriale (în reactoare discontinue sau semi-continue) reprezintă o alternativă atunci când enzimele prezintă o activitate mare dar și o viteză de dezactivare pronunțată, sau atunci când enzima este ieftină în raport cu produsul iar produsul poate fi ușor separat sau contaminarea sa cu enzimă nu este importantă. Din contră, utilizarea enzimelor imobilizate prezintă avantajul unei ușoare separări a produsului (cu un conținut mai mic de impurități alergice), o pierdere mai mică de enzimă, o stabilitate mai mare a acesteia (și posibilitate de stocare și reciclare), o protecție ridicată a enzimei față de agenți de stres din mediu (chimici, fizico-mecanici, biologici), și un control mai bun al procesului (Maria, 2007, 2012). Imobilizarea enzimei pe diferite tipuri de suport (pudră, gel, folii, fibre, matrici mezoporoase, etc.) se poate realiza pe o largă varietate de materiale (alumină, alumino-silicați, material ceramic, clei, geluri, cărbune, polimeri, etc.) modificați (prin funcționalizare, condensare, co-polimerizare, cristalizare, legături covalente) în scopul creșterii stabilității enzimei fără afectarea activității sale (Ghose et al., 1971, 1972, 1976; Illanes, 2008; Maria & Ene, 2013). Totuși, imobilizarea enzimelor este costisitoare și poate să conducă la o scădere apreciabilă a activității sale datorită interacțiilor matrice-enzimă (care schimbă structura enzimei) și a rezistenței introduse de transportul difuzional prin suport. În plus, atunci când viteza de dezactivare a enzimei este foarte mare, utilizarea reactoarelor în strat fix cu enzima imobilizată devine prea costisitoare și inoperabilă, necesitând regenerări / înlocuiri frecvente ale granulelor de suport-enzimă.

CAPITOLUL II

PROCESE ENZIMATICE ÎN INDUSTRIA ZAHARIDELOR

Enzimele au o aplicabilitate din ce în ce mai mare atât la nivel industrial cât și în uz casnic, procesele bazate pe cataliza enzimatică înlocuind o serie de procese chimice clasice datorită condițiilor blânde de reacție și a impactului redus asupra mediului înconjurător. Această piață este în extindere, valorând aprox. 1,5 miliarde USD în 2000, noi aplicații ale acestora fiind descoperite constant așa cum se observă din rapoartele anuale ale producătorilor de enzime (Nielsen & Villadsen, 2003). Cea mai veche datare referitoare la enzime se regăsește în textele antice, o dată cu obținerea brânzeturilor, a produselor de panificație și a băuturilor alcoolice și pentru frăgezirea produselor din carne. În 1886 Brown a descoperit că prin oxidarea propanolului și a glucozei cu *Bacterium xylinum* poate obține acid propionic și fructoză. În 1984, Novozyme a obținut prima enzimă din organisme modificate genetic utilizată în industria amidonului, comercializată în prezent sub numele de *Maltogenase*. În mod tradițional, producția industrială de polioli se realizează prin hidrogenarea zaharurilor pe catalizatori de nichel la temperaturi și presiune ridicate ($120\text{--}160^\circ\text{C}$, 20-75 atm; Makkee et al., 1985). O alternativă atractivă, sunt procesele de biosinteză ce oferă o tehnologie ecologică și posibilitatea obținerii unor produse mai sigure printr-o puritate ridicată (review Ghoreishi & Shahrestani, 2009). Cu toate acestea, costurile asociate preparatelor enzimaticice

și regenerării cofactorului pentru sinteza *in vitro* a poliolilor contribuie la percepția generală că utilizarea de culturi celulare este mai atractivă pentru a produce acești compuși din materii prime brute. În prezent, ținându-se cont de efectele pozitive în procesele metabolice ale **fructozei** (cel mai important monoglucid cu structură cetozică) pe plan mondial cercetările s-au orientat în două direcții:

- Producerea siropurilor de glucoză - fructoză (izosiropurile GFS) din materiile prime cu conținut mare de amidon, urmate de izomerizarea enzimatică a glucozei în prezența de săruri (Maria et al., 2012). Procedul prezintă însă multe dezavantaje: limitare termodinamică la o conversie de ca. 50%; operarea la temperaturi mai mari și cu reciclu este costisitoare necesitând coloane cromatografice mari pentru separarea glucozei de fructoză; izomeraza este puțin stabilă, necesitând ajustarea continuă a pH-ului și eliminarea ionilor de calciu existenți în materia primă (soluție de glucoză) provenită din hidroliza enzimatică a amidonului; purificarea fructozei de aldoze alergene este de asemenea o problemă stringentă pentru acest proces industrial (Liese et al., 2006; Sierks, 1994; Soetaert, 1999; Wisselink, 2002)
- Obținerea siropurilor de fructoză din materiile prime vegetale cu conținut ridicat de inulină (un polimer natural al fructozei cu câteva molecule terminale de glucoză), urmată de hidroliza inulinei la fructoză. Deși procedul prezintă unele certe avantaje (materie primă accesibilă și regenerabilă, randamente de peste 95% datorate conținutului mare de fructoză al inulinei), există însă și numeroase inconveniente încă nesolutionate satisfactor (probleme de purificare a produsului, procedu costisitor și încă necompetitiv din cauza instabilității hidrolazei)(Roberfroid, 2005; Rocha et al., 2006; Ricca et al., 2007; Diaz et al., 2006).

În prezent, firma Cetus propune un procedu alternativ de obținere a fructozei de mare puritate din glucoză prin reducerea 2-ceto-D-glucozei (produsul din reacția de oxidare a glucozei cu piranoz oxidază) la fructoză sub acțiunea catalitică a aldoz reductazei NAD(P)H-dependență la 25 °C, pH = 7, cu regenerarea (externă sau internă in-situ) a agentului reducător (Leitner et al., 1998; Chenault & Whitesides, 1987; Slatner, 1998; Ghoreishi & Shahrestani, 2009).

CAPITOLUL III

SECȚIUNEA EXPERIMENTALĂ

În această secțiune vor fi prezentate / caracterizate în detaliu preparatele enzimatiche, reactivii, echipamentele utilizate și metodele analitice dezvoltate cu scopul realizării programului experimental și a obiectivelor din cadrul tezei.

III.1. REACTIVI SI ENZIME - Toți reactivii au fost utilizați în starea în care au fost furnizați de către producător (Sigma, ATGEN), fără aplicarea unor procese suplimentare de purificare.

III.3. ECHIPAMENTE - Reacția de oxidare a glucozei utilizând un catalizator enzimatic P2Ox a fost realizată într-un bioreactor de laborator (Laboratorul de Transfer de Masă al Universității Politehnica din București), cu volumul de lucru de 2 L (Biostat A Plus, Sartorius) prezentat în figura III.3. - 1., fiind dotat cu control computerizat și înregistrator pentru temperatură, pH, și concentrația de oxigen dizolvat (DO)(**Figura III.3. - 1.**).

Reacția de reducere a kDG utilizând ALR drept catalizator a fost realizată direct în cuva spectrofotometrică din Quartz SUPRASIL cu drum optic de 10 mm plasată în spectrofotometrul UV/VIS Lambda 25, prevăzut cu o unitate PTP6 pentru controlul computerizat de temperatură și agitare a probelor cu următoarele performanțe: intervalul de temperatură 0-100°C, rezoluția la afișare 0.1°C, stabilitate $\pm 0.01^\circ\text{C}$, viteza de agitare – până la 1800rpm. Volumul de reacție a fost 1.8 – 2.5 ml, cuvele fiind închise pentru a preîntâmpina evaporarea solventului pe durata reacției.

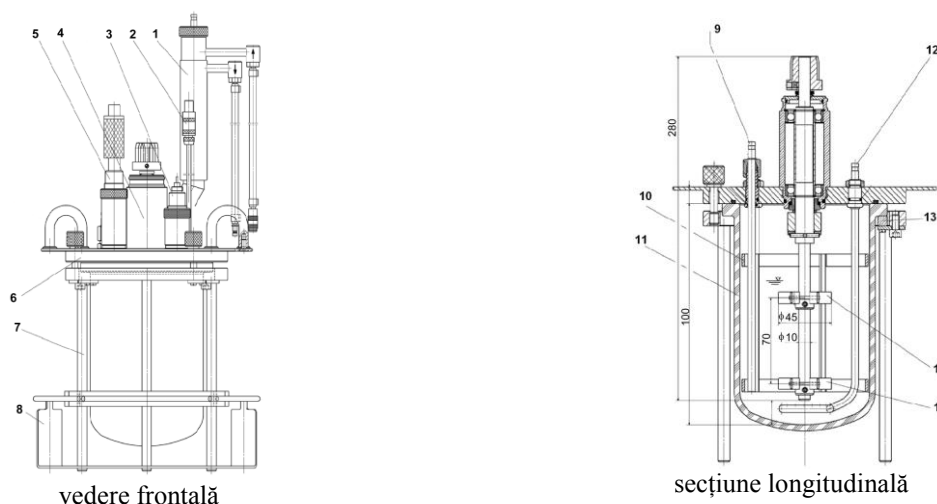


Figura III.3. - 1. Schema bioreactorului tip Batch. (1 - dispozitiv de evacuare; 2 - senzor de temperatură, 3 - electrod de pH; 4 - amestecător; 5 - electrod de oxigen; 6 - vasul de reacție; 7 - suport; 8 - suport pentru sticlele cu reactivi; 9 - tub de prelevare a probelor; 10 - deflectoare; 11 - vasul de reacție; 12 - barbotor; 13 - suport; 14 - agitator cu șase discuri tip impeller)

Același spectrofotometru UV/VIS Lambda 25 (Biotechnos s.a., Otopeni) a fost utilizat și în cadrul studiilor de evaluare a activității enzimatic reziduală a P2Ox (piranox-oxidaza), ALR (aldoz-reductaza), și CAT (catalaza) precum și în cele de dozare cantitativă a kDG (ceto-glucoza) și a fructozei. Înregistrarea semnalului fluorescent din reacția de dozare a glucozei rămasă netransformată în reacția cu P2Ox s-a realizat cu spectrofluorimetrul LS 50, Perkin-Elmer ce are în dotare ca sursă de lumină o lampă de xenon, cu posibilitatea de termostatare și agitare a probelor.

III.4. METODE ANALITICE - *Evaluarea conversiei glucozei (DG)* a fost realizată, aplicând metoda dezvoltată de De Luca et al. (2007), având la bază modificările spectrului emisiei de fluorescență a glucozoxidazei (oxigen-1-oxidoreductaza, GOD) în prezența substratului său specific.

Activitatea P2Ox a fost monitorizată pe baza vitezei de consum a oxigenului observată pe toată durata reacției de oxidare a glucozei (Maria et al. 2012).

Concentrația de *ceto-D-glucoză (kDG)* rămasă netransformată în reacția cu ALR s-a determinat printr-o metodă colorimetrică a cărui principiu se bazează pe diferența vitezei de reducere a clorurii de 2,3,5-trifeniltetrazolium (TTC) în prezența zaharurilor la trifenilformazan.

Concentrația H_2O_2 formată pe parcursul reacției de conversie a glucozei sub acțiunea catalitică a P2Ox a fost cuantificată prin spectrometrie de absorbție UV-Vis. Metoda a presupus monitorizarea absorbantei probelor prelevate din bioreactor la $\lambda = 240$ nm (coeficientul de extincție molară a apei oxigenate este $\epsilon_{240} = 0.00394 \pm 0.0002 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Activitatea reziduală a *catalazei* în probele prelevate din bioreactor la intervale diferite de timp a fost determinată conform protocolului descris de Bergmayer.

Evaluarea activității reziduale a *ALR* în probele prelevate pe parcursul reacției de reducere a kDG-ului s-a realizat respectând indicațiile producătorului preparatului enzimatic (ATGEN).

Datorită posibilității de plasare a vasului de reacție direct în spectrofotometru (de volum mili-litric, închis pentru evitarea evaporării solventului), *descompunerea NADPH-ului* a putut fi urmărită on-line prin scăderea absorbantei la lungimea de undă de 340 nm ($\epsilon_{340} = 6.2 \pm 0.3 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Ryle, 1985).

Principiul metodei de dozare a concentrației de *fructoză* rezultată din reacția de reducere a kDG-ului a avut la bază proprietatea carbohidraților de a forma în mediu acid furfural care, ulterior reacționează cu rezorcinolul pentru a forma un compus roșu.

CAPITOLUL IV

DETERMINAREA EXPERIMENTALĂ A COEFICIENTULUI TOTAL DE TRANSFER MASIC AL OXIGENULUI

Fiecare dintre etapele unei biotehnologii (pregătirea mediului de reacție, sterilizarea, biosinteza, separarea și purificarea produsului util) au o importanță majoră asupra performanței tehnologiei respective, însă rolul determinant revine bioreactorului, implicit condițiilor în care se realizează biosinteza. Datorită faptului că agitarea mecanică a mediului de reacție din bioreactor influențează în mod direct transportul oxigenului din faza gazoasă în cea lichidă, urmată de consumul oxigenului de către celula microbiană sau în reacția enzimatică de oxidare, una dintre preocupările majore pentru eficientizarea reacțiilor enzimaticice de oxidare sau a bioprocесelor este transferul de masă al oxigenului.

Evaluarea activității microorganismelor sau a enzimelor (oxidaze) pe parcursul procesului biotehnologic poate fi monitorizată pe baza consumului de oxigen dizolvat. O limitare în furnizarea cu oxigen datorită rezistenței la transferul de masă sau un consum cu o viteză mai mare decât cea de transport poate determina o scădere a vitezei reacției enzimaticice globale sau a creșterii celulare. În consecință, un control riguros al concentrației oxigenului dizolvat în faza lichidă este imperios necesar pentru orice tip de bioreactor ce funcționează în condiții de aerare, cantitatea de oxigen dizolvat (DO) fiind continuu măsurată cu ajutorul unui oxigenometru. Deoarece solubilitatea oxigenului în apă nu este foarte mare (cca. 9 mg / L la 20°C), viteza globală de consum biologic este dependentă de un număr mare de factori, cei mai importanți fiind coeficientul de difuzie, temperatura, coeficientul de transfer de masă gaz-lichid $K_L a$, și viteza reacției enzimaticice / de creștere microbiană.

Transferul de masă al oxigenului poate fi descris și analizat prin intermediul coeficientului volumetric de transfer de masă individual, $k_L a$, sau total, $K_L a$ (parametrul cel mai important care intervine în proiectarea și operarea sistemului de amestecare - aerare al unui bioreactor). Un număr mare de factori influențează valoarea coeficientului de transfer de masă $K_L a$, a cărui evaluare precisă este dificilă datorită dependenței puternice de proprietățile fazei lichide, agitare, solubilitatea gazului, condițiilor de operare (temperatura), vitezei de aerare, volumul și geometria vasului de reacție, defletoarele, tensiunea superficială a lichidului, etc (Gourich et al., 2006).

Obiectivul urmărit în cadrul acestui capitol este acela de evaluare experimentală a coeficientul $K_L a$ aplicând o procedură simplă și rapidă. În studiul prezent procedura aplicată este una neinvazivă, constând în îndepărtarea parțială a oxigenului din faza lichidă prin barbotare de azot până când se înregistrează o scădere semnificativă a concentrației de oxigen dizolvat. În următoarea etapă, lichidul este re-aerat până la saturație utilizând aer comprimat introdus prin barbotorul circular, monitorizându-se creșterea concentrației de oxigen dizolvat. Estimarea rapidă a coeficientului $K_L a$ poate fi realizată și fără îndepărtarea completă a oxigenului din lichid (adică 0% oxigen în apă), lipsa primei porțiuni din curba de aerare având o importanță minoră în astfel de determinări (Figura IV. - 2.).

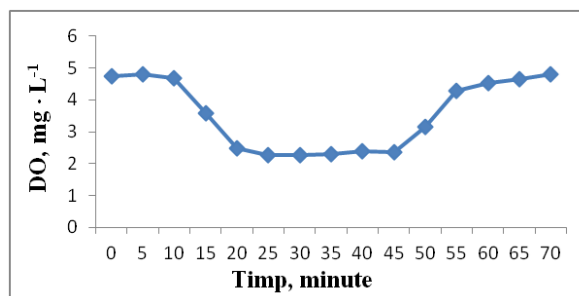


Figura IV. - 2. Curba de dezaerare și de re-aerare a apei distilate la 30°C, $N_a = 200$ rpm, 1.4 L min^{-1} (barbotare azot: 0 – 20 minute, barbotare aer: 45 – 70 minute)

Experimentele au fost realizate, în absența reacției, la 30°C, într-un volum total de 1 litru apă distilată, prin verificarea vitezelor de aerare în intervalul $0.4 - 1.4 \text{ L min}^{-1}$ (adică viteza superficială a gazului $0.5-1.7 \times 10^{-3} \text{ m s}^{-1}$) în condiții diferite de agitare obținute prin variația turației agitatorului în intervalul 200 - 400 rpm. După dezaerarea lichidului prin barbotarea azotului, fiecare curbă de re-aerare (a concentrației de oxigen) înregistrată în timp a fost folosită pentru evaluarea coeficientului volumetric de transfer masic (Figurile IV.3. - IV.4., curbele -O-). Repetarea experimentelor în diferite condiții de operare permite corelarea coeficientului de transfer masic cu debitul de aerare și cu viteza de agitare, permițând alegerea condițiilor optime de operare. O astfel de procedură este ușor de implementat, nu necesită echipamente speciale și, în plus, azotul nu modifică caracteristicile fazei lichide, experimentele putând fi efectuate înainte de începerea studiului sistematic al procesului biochimic/biologic.

Utilizând un distribuitor de gaze în bioreactor, concentrația de saturație c_L^* la 30°C depinde de calitatea apei distilate, fiind în jur de $7.40 - 7.95 \text{ mg L}^{-1}$ (pentru $H = 845.13 \text{ atm mol}^{-1} \text{ L}$) (Jorgensen, 1979; Wikipedia, 2013). Utilizând valorile înregistrate pentru $c_L(t)$ din figurile IV.3. - IV.4., coeficientul $K_L a$ a fost evaluat ca medie a valorilor estimate pentru întreaga curbă cinetică de aerare în condițiile specificate de aerare și agitare. Rezultatele obținute sunt în limitele $K_L a = 0.0006 - 0.0102 \text{ s}^{-1}$, fiind în concordanță cu datele din literatură: $K_L a = 0.020 \text{ s}^{-1}$ pentru un bioreactor mic (volum 10 mL, 25°C, barbotare de oxigen pur; Treitz et al., 2001; Maria, 2005, 2007); $K_L a = 0.001-0.040 \text{ s}^{-1}$ în prezența unor agregate micelare a biomasei fungice în fază lichidă (volum 4 L, 21°C, debit de aer, $N_a = 200-600$ rpm, viteza superficială a gazului $1 - 5 \times 10^{-3} \text{ m s}^{-1}$; Galaction et al., 2005); $K_L a = 0.007-0.044 \text{ s}^{-1}$ în prezența în faza lichidă a unor surfactanți (volum 1.7 L, două faze lichide de dispersie; Gomes et al., 2007); $K_L a = 0.001-0.004 \text{ s}^{-1}$ (volum 1 L; Najafpour, 2007).

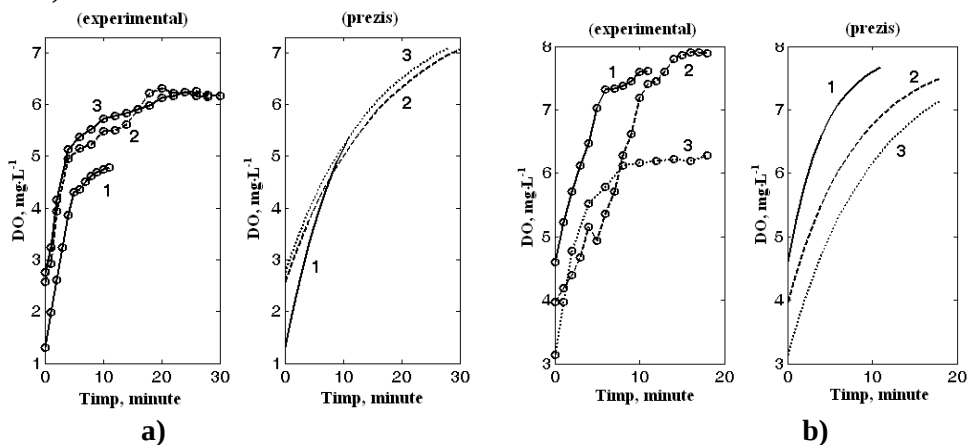


Figura. IV. - 3. Curbele cinetice de oxigenare a apei la 30°C în condiții experimentale (-O-) și calculate (linie). Curbele corespund: (a) $N_a = 200$ rpm, debit de aerare de (1)= 1.4 L min^{-1} , (2)= 0.6 L min^{-1} , (3)= 0.4 L min^{-1} și (b) $N_a = 300$ rpm, debit de aerare (1)= 1.0 L min^{-1} , (2)= 0.6 L min^{-1} , (3)= 0.4 L min^{-1} $N_a = 300$ rpm

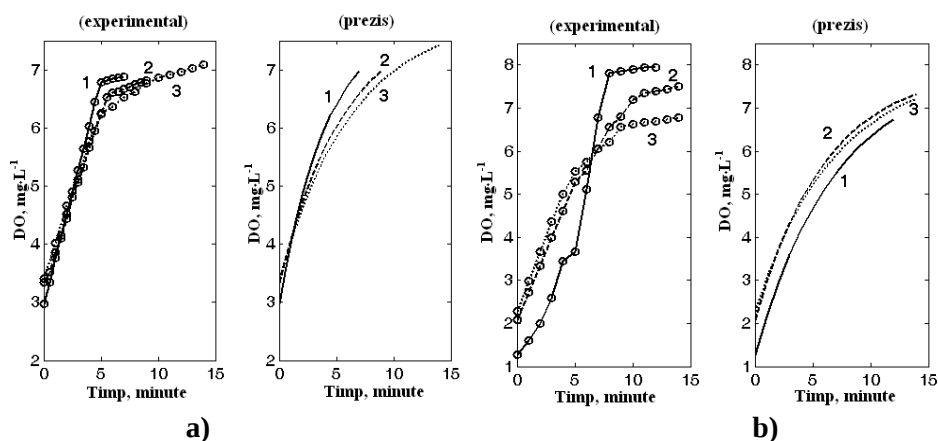


Figura IV. - 4. Curbele cinetice de oxigenare a apei la 30°C în condiții experimentale (-O-) și calculate (linie). Curbele corespund la $N_a = 400$ rpm (a) și $N_a = 500$ rpm (b) și unor debite de aerare de: (1)= 1.0 L min⁻¹, (2)= 0.6 L min⁻¹, (3)= 0.4 L min⁻¹.

Curbele de aerare $c_L(t)$ calculate utilizând $K_L a$ estimat sunt reprezentate în figurile IV. - 3 – IV. - 4 (linie continuă), fiind în concordanță satisfăcătoare cu curbele experimentale realizate în condiții diferite de aerare și agitare. Pentru a corela $K_L a$ calculat cu condițiile de operare, în literatură au fost propuse o multitudine de relații empirice, incluzând influența unui număr mare de factori: proprietățile fizice ale fazei lichide, condițiile de agitare, solubilitatea gazului, temperatura, înălțimea agitatorului, viteza de aerare, volumul bioreactorului (Moser, 1988; Najafpour, 2007; Jorgensen, 1979; Tchobanoglous & Burton, 1991; Galaction et al., 2005). Pe parcursul acestui experiment, marea majoritate a parametrilor constructivi/operationali sunt menținuți constanți (temperatură, volumul lichidului, adâncimea agitatorului și turația). Prin urmare, a fost propusă o corelație simplă, în forma: $K_L a = b_o N_a^{b_1} U_g^{b_2}$, unde N_a = turația agitatorului, în rpm; U_g = viteză superficială a gazului, în m s⁻¹; $k = [b_o, b_1, b_2]$ = coeficientul de corelație empirică. Aplicând procedura clasică a regresiei liniare cu estimatorul celor mai mici pătrate, se obține un estimat al parametrilor modelului prezentat în Tabelul IV. - 1. Abaterea standard a erorii („zgomot”) experimentale este $\sigma_y \approx 0.1$; unitatea $K_L a$ este s⁻¹; N_a este exprimat în rotații/minut (rpm); U_g se exprimă în m s⁻¹.

Tabel IV. - 1. Adecvanța modelului de corelație logaritmice:

$$y = \ln(K_L a) = \ln(b_o) + b_1 \ln(N_a) + b_2 \ln(U_g) \quad (\text{Ene et al., 2011}).$$

Testul de adecvanță		Valorile testului		Valori critice			Concluzii	
R (nota a)		0.89		ca. 0.90			Ok	
s (nota b)		0.35908		Medie $y_{exp} = \bar{y} = 6.17$			Ok (ca. 5% din $\bar{y}$)	
χ^2 (nota c)		15.593		$\chi^2(n - p;0.95) = 16.919$			adecvat	
Parametrul	Estimat	Interval de 95% încredere (nota d)	t-test (nota e)	Matricea corelației (nota f)			$\lambda_j / \tilde{\sigma}^2$ (nota g)	Concluzii
$\ln(b_o)$	-9.9712	± 1.5713	14.355	1			1.86×10^2	Semnificativ
b_1	1.8270	± 0.20112	20.550	-0.67	1		1.25×10^4	Semnificativ
b_2	0.95531	± 0.16430	13.153	0.67	0.10	1	8.45×10^6	Semnificativ

Rezultatele testelor prezentate în Tabelul IV. - 1. indică un model adecvat (în forma logaritmice), cu un coeficient de corelație multiplă de aproximativ 0.90, abaterea standard a predicției modelului în jur de 5% din valorile observate, și o valoare χ^2 satisfăcătoare a testului de adecvanță pentru un nivel de încredere de 95%.

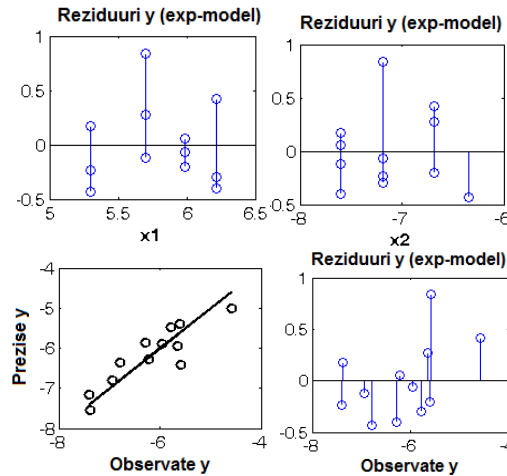


Figura IV. - 5. Diagrama reziduurilor (O) pentru modelul de corelație

$y = \ln(K_L a) = \ln(b_o) + b_1 \ln(N_a) + b_2 \ln(U_g)$. (stânga-sus): Reziduuri [$\ln(K_L a)(\text{exp.}) - \ln(K_L a)(\text{model})$] vs. $x_1 = \ln(N_a)$; (dreapta-sus): Reziduuri [$\ln(K_L a)(\text{exp.}) - \ln(K_L a)(\text{model})$] vs. $x_2 = \ln(U_g)$; (stânga-jos) $y = \ln(K_L a)$ calculat vs. y . observat; (dreapta-jos) Reziduuri [$\ln(K_L a)(\text{exp.}) - \ln(K_L a)(\text{model})$] vs. y . observat.

Diagrama reziduurilor prezentată în Figura IV. - 5. confirmă adecvanța satisfăcătoare a modelului de corelație propus. Astfel, reziduurile obținute (între model și experiment) sunt alternativ pozitive și negative, de valori mici, în timp ce reprezentarea grafică a valorilor prezise în funcție de cele observate indică o dispunere alternantă în vecinătatea diagonalei graficului, adică o eroare experimentală independentă și nesistematică.

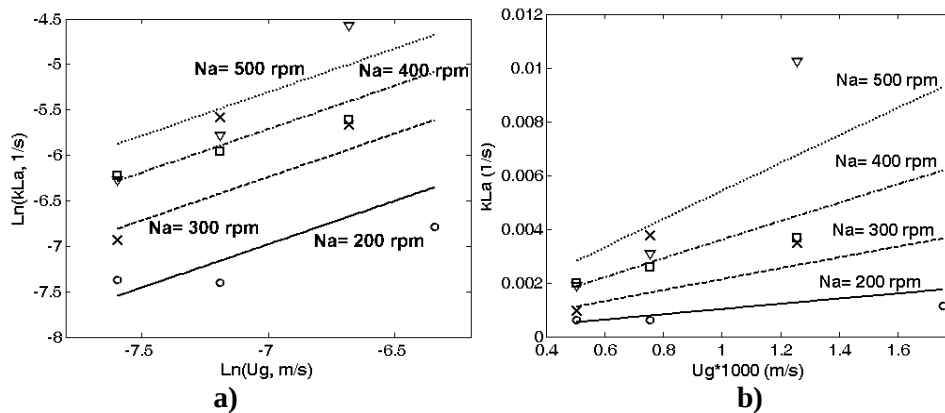


Figura IV. - 6. Valorile $K_L a$ evaluate experimental (puncte) comparativ cu cele prezise de modelul de corelație (linii) în variantele: a) variabilei logaritmice $y = \ln(K_L a)$; b) în variabile inițiale $K_L a$. Graficele corespund condițiilor: $N_a = 200$ rpm (O,—), $N_a = 300$ rpm (X,—), $N_a = 400$ rpm ($\square$,—•—•), și $N_a = 500$ rpm (∇ , •••).

Graficul modelului logaritmice $y = \ln(K_L a)$ în funcție de viteza superficială a gazului U_g din Figura IV. - 6. (stânga) evidențiază o concordanță satisfăcătoare cu datele experimentale. Așa cum era de așteptat, reziduurile în termeni absoluți sunt cu toate acestea mai mari decât cele în termeni de variabilă logaritmată (Figura IV. - 6. – dreapta).

CAPITOLUL V

CONTRIBUȚII PRIVIND STUDIUL CINETICII OXIDĂRII ENZIMATICE A D-GLUCOZEI FOLOSIND PIRANOZ OXIDAZA (P2Ox)

În cadrul acestui capitol, principalul *obiectiv* urmărit este acela de a studia experimental și teoretic cinetica procesului de oxidare enzimatică a D-glucozei (DG) la 2-ceto-D-glucoză (kDG), în absența / prezența catalazei. În acest scop s-a dezvoltat un plan experimental de studiu a procesului enzimatic în diverse condiții de reacție, ceea ce a permis obținerea curbelor cinetice experimentale ale dinamicii speciilor chimice implicate în proces (DG, P2Ox, kDG, oxigen dizolvat, H₂O₂) în condiții variate de reacție, respectiv la două temperaturi diferite 25°C și 30°C, pH optim 6.5, și cu variația raportului inițial Catalază / P2Ox. Pe baza acestor experimente, s-a propus un model cinetic al procesului bazat pe un mecanism de reacție ce consideră o reacție principală și două reacții secundare. Experimentele au utilizat P2Ox comercială de la Sigma-Aldrich, recombinată prin expresia genei codoare din *Coriolus sp.* în *E. coli*. Modelul cinetic propus include reacția principală (de tip Ping-Pong-Bi-Bi), inactivarea P2Ox de către H₂O₂ rezultată din reacție, precum și descompunerea *in-situ* a H₂O₂ de către catalază (cu o cinetică de tip Yano-Koya generalizată). Studiile de literatură privind activitatea P2Ox sugerează modificări minore ale constantelor vitezelor de reacție în condițiile enzimelor imobilizate (Huwig et al., 1994). Studiul de față a evidențiat faptul că prezența catalazei diminuează în mod drastic dezactivarea P2Ox dar conduce și la o descreștere considerabilă a vitezei reacției principale. Modelul cinetic astfel obținut poate fi utilizat în calcule ingineresti de proiectare și operare optimală a reactorului enzimatic industrial, fiind ușor adaptabil fiecărui tip de enzimă P2Ox utilizată.

Piranoz 2 oxidaza (P2Ox) este o oxidoreductază ce catalizează reacția de oxidare regioselectivă a glucozei precum și a altor zaharuri la carbonul C-2, în prezența oxigenului molecular, cu formare de apă oxigenată și 2-cetozaharuri. Deși preferința catalitică a P2Ox pentru oxidarea glucidelor la C-2 a fost dovedită, studii recente au evidențiat atacul enzimei pentru anumite zaharuri la carbonul C-3, conducând astfel la formarea de 3-ceto și 2,3 – diceto derivați. În natură această enzimă are o largă răspândire, putând fi purificată și izolată dintr-o serie de microorganisme incluzând *Phanerochaete chrysosporium* (Artolozaga et al., 1997), *Phlebiopsis (Peniophora) gigantea* (Danneel et al., 1993; Treitz et al., 2001); *Trametes versicolor*, *Coriolus hirsutus*, *Coriolus versicolor* (Machida & Nakanishi, 1984), *Tricholoma matsutake* (Takakura & Kuwata, 2003), etc.

Forma oxidată a enzimei EFAD preia 4 hidrogeni din D-glucoză pentru a forma enzima redusă EFADH₄ și 2-ceto-D-glucoză. În etapa următoare, enzima redusă este reoxidată cu oxigen molecular după schema din Figura V.1. - 1.

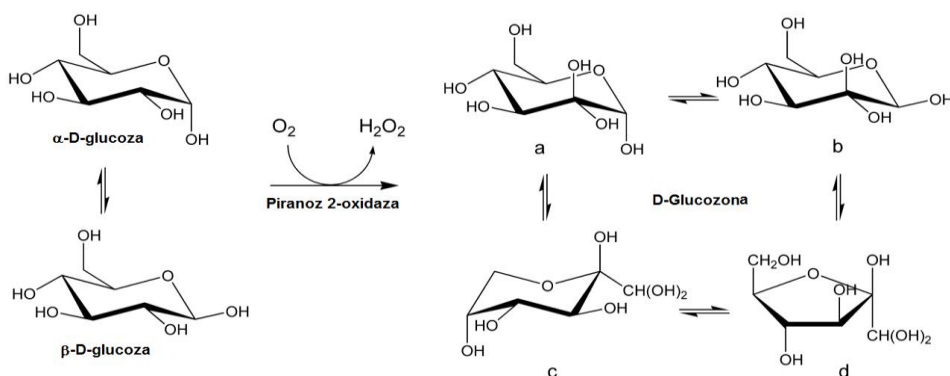


Figura V.1. - 1. Reacția de oxidare a glucozei catalizată de P2Ox. Atât α - cât și β-D-glucoza este oxidată de P2Ox în poziția C-2 cu obținere de D-glucozonă (care se găsește în soluție apoasă sub forma a patru izomeri a, b, c, și d în proporție de 46, 26, 18 și 10%)(adaptare după Artolozaga et al., 1997).

În ultimii ani au fost studiate un număr mare de substraturi pentru P2Ox, inclusiv oxidarea selectivă la C-2 a diferitelor zaharide (3-deoxi-D-glucoza, 6-deoxi-D-glucoza, L(-)-sorboza, D(+)-xiloza, D-

aloza, D-galactoză, maltoză, manoza, sucroza, lactoză, α - și β -D(+)-glucoză, etc), observându-se astfel că P2Ox manifestă activitate enzimatică diferită funcție de substratul oxidat (Treitz et al., 2001; Giffhorn, 2000).

Soluțiile apoase omogene de P2Ox prezintă o culoare gălbuie și un spectru de absorbție caracteristic flavoproteinelor, cu maxime de absorbție la lungimi de undă de 276, 373 și 456 nm. Considerând coeficientul molar de absorbție pentru molecula de flavin adenin dinucleotidă (FAD) liberă la $\lambda = 460$ nm fiind egal cu $\epsilon = 11,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Swoboda and Massey, 1965), prin calcul s-a determinat faptul că o moleculă de P2Ox leagă covalent 3,7 molecule de FAD (fiecare monomer având în structura câte o moleculă FAD) (Artolozaga et al., 1997).

Mecanismul reacției enzimaticice catalizată de P2Ox este de tip Ping-Pong-Bi-Bi, întâlnit în mod uzual la oxidoreductazele FAD dependente și constă dintr-o reacție ce are pe jumătate caracter reducător - substratul aldo-piranozic reduce co-factorul FAD cu formare de FADH_2 și 2-cetoaldoză (oxidarea zaharozei la poziția C-2) – și pe jumătate un caracter oxidativ în care are loc re-oxidarea FADH_2 de către un electron acceptor. Dacă se utilizează ca acceptor de electroni oxigenul dizolvat (DO), în timpul acestei reacții se formează un intermediar C-4a-hidroperoxiflavin (review Spadiut et al., 2009). Oxidarea glucozei catalizată de P2Ox se desfășoară în prezența unor acceptori de electroni cum ar fi: oxigenul molecular, 1,4-benzochinona, acid 1,2-naftochinon-4-sulfonic; complecși de ioni metalici și radicali (2,6-dicloroindofenol, radicalul cationic ABTS) (Spadiut et al., 2009, Wohlfahrt et al., 2004; Leitner et al., 2001, Leskovac et al., 2005). Dacă se notează cu “ox” compusul utilizat drept acceptor de electron, expresia vitezei de oxidare a DG cu P2Ox printr-un mecanism de tip Ping-Pong-Bi-Bi este (Segel, 1993; Wohlfahrt et al., 2004; Leskovac et al., 2005):

$$r = \frac{v_m c_{DG} c_{ox}}{K_{DG} K_{ox} + K_{DG} c_{ox} + K_{ox} c_{DG} + c_{DG} c_{ox}} \quad (\text{unde } c_j = \text{concentrația speciei } j).$$

Mecanismul intrinsec implică în fapt opt pași elementari, constantele vitezelor corespunzătoare fiind asociate cu constantele aparente v_m , K_{DG} , și K_{ox} (Wohlfahrt et al., 2004). Estimarea separată a acestor constante intrinseci este laborioasă, fiind necesară realizarea experimentelor în condiții departe de echilibru pentru determinarea dinamicii intermediarilor de reacție (Wohlfahrt et al., 2004, Leskovac et al., 2005).

Activitatea și stabilitatea enzimei este puternic influențată de condițiile de mediu, respectiv temperatură și pH (Tabel V.2. - 1.). De exemplu, P2Ox din *Phanerochaete chrysosporium* după o săptămână de depozitare la 4°C își păstrează mai mult de 85% din activitate la pH 4 - 11. De asemenea P2Ox rămâne 100% activă la 60°C , 65% la 70°C , și 35% la 75°C pentru aproximativ 2 h în soluție tampon 50 mM Tris-HCl pH = 8 (Artolozaga et al., 1997). Radicalii $\text{OH}^\bullet$ produși prin descompunerea peroxidului de hidrogen au de asemenea un rol extrem de important în procesul de inhibiție a enzimei, deoarece aceștia reacționează aproape instantaneu cu diferiți aminoacizi, dar în mod special cu tirozina și metionina. Studii recente au arătat faptul că procesul este accelerat de prezența unor impurități de fier (reacția Fenton; vezi Treitz et al., 2001) sau alți agenți ce accelerează formarea radicalilor $\text{OH}^\bullet$, proces ce pare a fi destul de selectiv având în vedere că oxidarea a fost observată doar la un singur fragment proteolitic măsurat prin MALDI-TOF-MS. Un alt factor critic în utilizarea eficientă a P2Ox ca și biocatalizator este cel al transferului masic de oxigen de la interfața gaz-lichid în lichid. Presupunând că enzima manifestă activitate catalitică maximă, atunci în condițiile experimentale aproximativ 0,5 mM/minut oxigen vor fi consumați, ceea ce indică necesitatea suplimentării cu oxigen a mediului de reacție în vederea evitării epuizării sale mult prea rapide.

V.3. EXPERIMENTE PRIVIND OXIDAREA D-GLUCOZEI ÎN ABSENȚA ȘI PREZENȚA CATALAZEI

Pentru studierea experimentală a cineticii reacției enzimactice de oxidare a D-glucozei sub acțiunea catalitică a P2Ox în soluție apoasă, s-a utilizat un reactor discontinuu, cu senzor de măsurare a oxigenului în mediul lichid (vezi schița reactorului, Figura III.3. – 1.) în condiții de oxigenare optime (utilizând aer comprimat introdus printr-un distribuitor de gaze circular, cu debitul de aerare 1 L min^{-1} , turația agitatorului 300 rpm; vezi capitolul IV). Determinarea experimentală a coeficientului total de transfer masic al oxigenului s-a realizat în absența catalazei sau utilizând diferite cantități de catalază în domeniul $0 - 80.4 \text{ U mL}^{-1}$ (adică $0-300 \text{ U U}^{-1}$ Catalază / P2Ox).

Experimentele cu enzimă liberă au fost realizate utilizând 100 mM glucoză, 10 mM tampon fosfat, pH=6.5, la 25 și 30°C. Pentru declanșarea reacției s-a injectat în reactor o cantitate de:

- 0.25 U mL^{-1} P2Ox.
- 0.25 U mL^{-1} P2Ox și între $0 - 80.4 \text{ U mL}^{-1}$ catalază.

Curba DO a fost înregistrată cu ajutorul unui electrod de oxigen. Pe durata reacției au fost prelevate cantități mici de probă (1 mL probă, alicotat în vialuri și imediat stocate la -70°C), fiind analizate separat în vederea determinării concentrației de glucoză, concentrației de H_2O_2 , activității reziduale a P2Ox și a concentrației de ceto-glucoză. Evoluția concentrației principalelor specii implicate în proces vor fi utilizate ulterior pentru estimarea constantelor cinetice de reacție. Experimentele cu un raport Catalaza/P2Ox mai mare de 300 nu prezintă interes atâta timp cât viteza reacției principale scade foarte mult cu concentrația catalazei în mediul de reacție, făcând procesul inoperant industrial.

V.4. MODELAREA CINETICII OXIDĂRII D-GLUCOZEI ÎN PREZENȚA CATALAZEI LA 30°C

Modelul cinetic propus pentru conversia D-glucozei la 2-ceto-D-glucoza se bazează pe trei reacții principale (Figura V.4. - 1.): oxidarea glucozei cu oxigen dizolvat în lichid în prezența P2Ox; reacția de inactivare a P2Ox cu H_2O_2 produsă în procesul de oxidare a DG; descompunerea peroxidului de hidrogen în prezența catalazei și a urmelor de Fe.

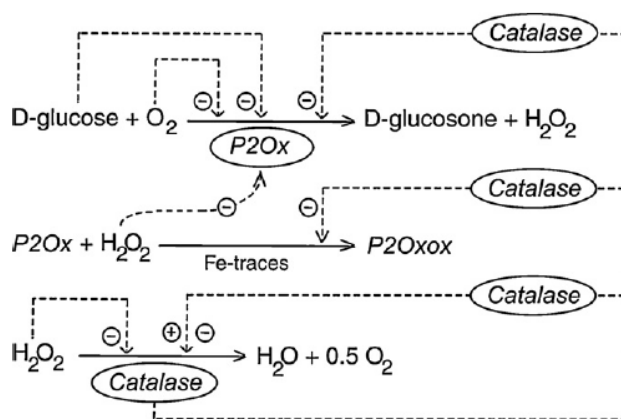
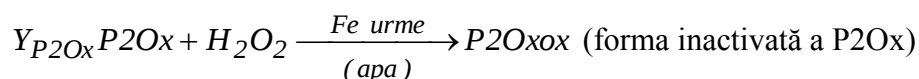
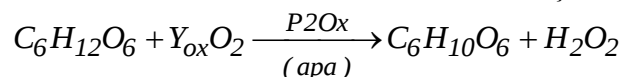
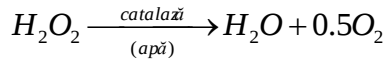


Figura V.4.-1. Etapele procesului de oxidare a glucozei utilizând P2Ox și catalaza. Săgețile întrerupte, perpendiculare pe calea de reacție indică acțiunea de activare, reprimare sau de inhibare a reacției; $\oplus/\ominus$ indică acțiunea pozitivă sau negativă asupra vitezei de reacție

Plecând de la stoichiometria celor trei reacții ale procesului enzimatic, respectiv:





modelul cinetic propus pentru cele trei reacții (oxidare, dezactivare P2Ox, și descompunere apă oxigenată) este următorul (Maria, Ene, Jipa, 2012)

$$r_{our} = \frac{\mu_m c_{P2Ox} c_{DG} c_{DO}}{K_{DG} c_{DO} + K_{DO} c_{DG} + c_{DG} c_{DO}}, \text{ (mecanism Ping-Pong-Bi-Bi; Wohlfahrt et al., 2004)}$$

$$r_d = k_d c_{P2Ox} c_{H_2O_2},$$

$$r_c = \frac{k_c c_{catal} c_{H_2O_2}}{1 + K_{OH} c_{H_2O_2}^n}, \text{ (inhibiție de substrat incompetitivă de tip Yano-Koya; Schügerl & Bellgardt, 1985)}$$

unde DG = D-glucoză; kDG = 2-ceto-D-glucoză, Catal. = catalază; DO = oxigenul dizolvat.

Pentru reactorul experimental izoterm operat discontinuu și cu amestecare foarte bună s-a adoptat un model matematic de reactor discontinuu ideal (cu amestecare perfectă, fără gradienti de masă sau termici). Ecuațiile diferențiale de bilanț a speciilor din reactor includ explicit și termenul diluției [$D = d \ln(V)/dt$] introdus de apa rezultată din descompunerea H_2O_2 , respectiv:

$$\frac{dc_{DO}}{dt} = k_{oxl} a (c_{DO}^* - c_{DO}) - Y_{ox} r_{our} + 0.5 r_c - D c_{DO}; \quad \frac{dc_{DG}}{dt} = -r_{our} - D c_{DG};$$

$$\frac{dc_{kDG}}{dt} = r_{our} - D c_{kDG}; \quad \frac{dc_{POx}}{dt} = -Y_{POx} r_d - D c_{POx}; \quad \frac{dc_{H_2O_2}}{dt} = r_{our} - r_d - r_c - D c_{H_2O_2}$$

$$\frac{dV}{dt} = DV; \text{ în care: } D = \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} = \frac{d[H_2O]_r}{dt} \frac{M_w}{\rho_w}; \quad M_w = 18 \text{ g mol}^{-1}; \quad \rho_w = 996 \text{ g L}^{-1}; \quad c_{DO}^* = 0.2484$$

mM (30°C); $k_{oxl} a = 0.01-0.02 \text{ s}^{-1}$ (Treitz et al., 2001; Ene et al., 2011).

Constantele cinetice ale expresiilor vitezelor de reacție au fost estimate pe baza a trei seturi experimentale incluzând profilul în timp al concentrațiilor de DG, DO, H_2O_2 , și P2Ox (i) în absența catalazei, sau (ii) cu adaos inițial într-un raport Catalază/P2Ox = 100 U U⁻¹, sau (iii) cu adaos inițial într-un raport Catalază/P2Ox = 300 U U⁻¹ (Figura V.4. – 2. ÷ V.4. - 4).

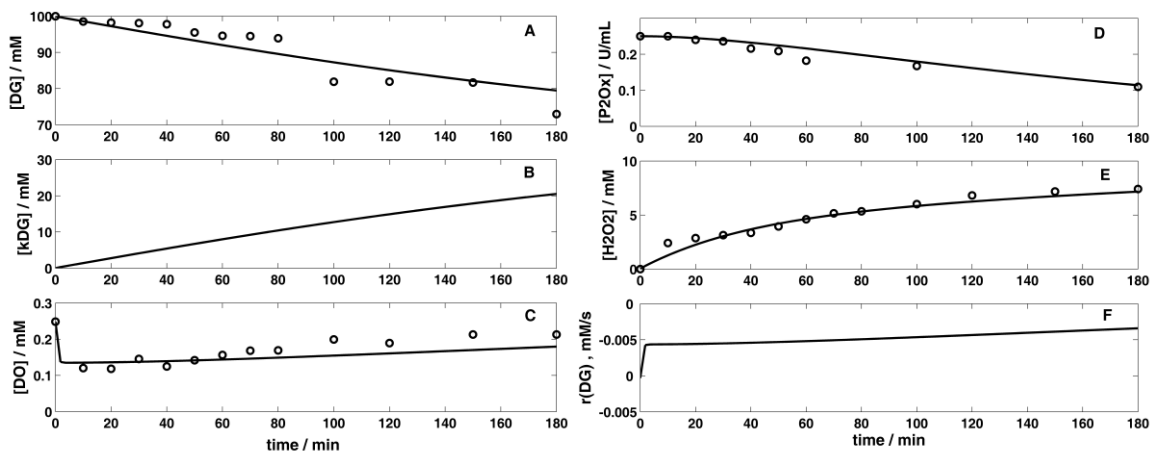


Figura V.4. - 2. Dinamica concentrațiilor speciilor și a vitezei de reacție a DG (r_{DG}) pentru oxidarea glucozei cu P2Ox în absența catalazei. Condiții de reacție: 100 mM glucoză, 0.25 U mL⁻¹ P2Ox, 10 mM tampon fosfat, pH = 6.5; temperatura 30 °C. Predicțiile modelului sunt reprezentate cu linie continuă iar datele experimentale cu puncte.

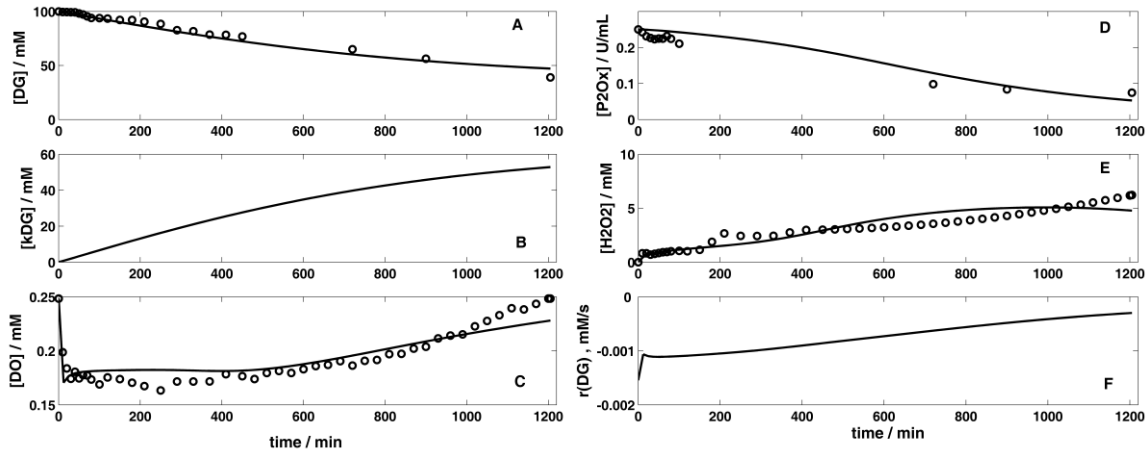


Figura V.4. - 3. Dinamica concentrațiilor speciilor și a vitezei de reacție a DG (r_{DG}) pentru oxidarea glucozei cu P2Ox în prezența a 25 U mL^{-1} catalază (raport Catalază / P2Ox = $100/1 \text{ U U}^{-1}$). Condiții de reacție: 100 mM glucoză, 0.25 U mL^{-1} P2Ox, 10 mM tampon fosfat, $\text{pH} = 6.5$; temperatura 30°C .

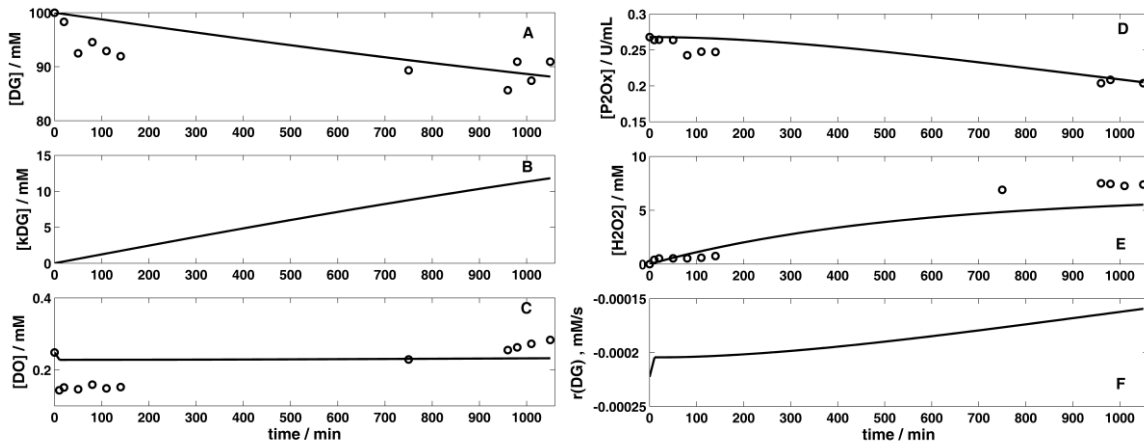


Figura V.4. - 4. Dinamica concentrațiilor speciilor și a vitezei de reacție a DG (r_{DG}) pentru oxidarea glucozei cu P2Ox în prezența a $80,4 \text{ U mL}^{-1}$ catalază (raport Catalază / P2Ox = $300/1 \text{ U U}^{-1}$). Condiții de reacție: 100 mM glucoză, 0.25 U mL^{-1} P2Ox, 10 mM tampon fosfat, $\text{pH} = 6.5$; temperatura 30°C .

Identificarea parametrilor modelului s-a făcut prin aplicarea unei proceduri de regresie neliniară folosind ca funcție obiectiv criteriul celor mai mici pătrate ponderate, datorită abaterii standard experimentale diferită de la o specie observată la alta (Maria, 2008).

$$s_y^2 = (\|c_{DG} - \hat{c}_{DG}\|_2^2 / \sigma_{DG}^2 + \|c_{DO} - \hat{c}_{DO}\|_2^2 / \sigma_{DO}^2 + \|c_{H_2O_2} - \hat{c}_{H_2O_2}\|_2^2 / \sigma_{H_2O_2}^2 + \|c_{P2Ox} - \hat{c}_{P2Ox}\|_2^2 / \sigma_{P2Ox}^2) / (N m - p),$$

Tabel V.4. - 1. Parametrii cinetici estimați pentru oxidarea D-glucozei utilizând P2Ox și catalază (la 30°C , $\text{pH}=6.5$; P2Ox din *Coriolus sp* recombinată.; $[DG]_0 = 100 \text{ mM}$; $[P2Ox]_0 = 0.25 \text{ U mL}^{-1}$)

Parametrul	Fără Catalază	Catal P2Ox =100	Catal P2Ox =300	Corelațiile propuse
μ_m , $[\text{mM s}^{-1} (\text{U mL}^{-1})^{-1}]$	0.98778	0.36966	0.04970	$\mu_m = \frac{\mu_{mo}}{1 + K_m c_{catal}^{\alpha_m}};$ $\mu_{mo} = 9.8778 \cdot 10^{-1}, \text{ mM s}^{-1} (\text{U mL}^{-1})^{-1}$ $K_m = 2.0973 \cdot 10^{-3}, \text{ mM}^{\alpha_m}; \alpha_m = 2.0756$
K_{DG} , (mM)		0.51905		
K_{DO} (mM)		14.545		

k_d , [s ⁻¹ (U mL ⁻¹) ⁻¹]	$1.4204 \cdot 10^{-3}$	$6.0781 \cdot 10^{-4}$	$1.1528 \cdot 10^{-4}$	$k_d = \frac{k_{do}}{1 + K_d c_{catal}^{\alpha_d}};$ $k_{do} = 1.4204 \cdot 10^{-3}$, s ⁻¹ (U mL ⁻¹) ⁻¹ $K_d = 3.7033 \cdot 10^{-3}$, mM ^{α_d} , $\alpha_d = 1.8295$
k_c , [s ⁻¹ (U mL ⁻¹) ⁻¹]	$8.3 \cdot 10^{-5}$ (a)	$5.5560 \cdot 10^{-5}$	$1.04 \cdot 10^{-7}$	$k_c = \frac{k_{co}}{1 + K_c c_{catal}^{\alpha_c}};$ $k_{co} = 8.3000 \cdot 10^{-5}$, s ⁻¹ (U mL ⁻¹) ⁻¹ $K_c = 7.0944 \cdot 10^{-10}$, mM ^{α_c} , $\alpha_c = 6.3255$
K_{OH} , (mM ⁻ⁿ)	0.58			
n	2.5765			
Y_{P2Ox} , (U mL ⁻¹ mM ⁻¹)	0.01019			
$k_{oxl} a$, (s ⁻¹)	0.02 (b)	0.01	Ene et al. (2011)	
s_y , (-)	1.76	2.01	2.22	

(a) calculate prin extrapolare

 (b) aproximat din teste *in-vitro* realizate separat (Ene et al., 2011).

Tabel V.4. - 2. Teste de semnificație a constantelor modelului cinetic de oxidare a D-glucosei, cu un rapor catalază / P2Ox = 100 (*t*-test calculat cu eroarea standard experimentală minimă de $\tilde{\sigma} = 0.1$ (mM, or U mL⁻¹); pentru detalii vezi Anexa lucrării lui Treitz et al. (2001)).

Parametru	Estimat	t -test ^(a)	$\lambda_j / \tilde{\sigma}^2$ ^(b)	Matricea de intercorelație ^(c)							Valoare literatură	
K_{DO} , (mM)	14.545	22.2	1.0	1							0.11-0.48	
K_{DG} , (mM)	0.519	0.004	3.2	0.10	1						0.4-5.0	
μ_m , [mM s ⁻¹ (U mL ⁻¹) ⁻¹]	0.369 (9.25 s ⁻¹)	19.4	8.1·10 ²	0.95	0.40	1					- (0.2-88)	
k_d , [s ⁻¹ (U mL ⁻¹) ⁻¹]	6.078·10 ⁻⁴	28.8	1.5·10 ⁴	0.26	0.25	0.34	1				-	
Y_{P2Ox} , (U mL ⁻¹ mM ⁻¹)	0.010	23.4	2.4·10 ⁶	-0.07	-0.65	-0.28	-0.84	1			-	
k_c , [s ⁻¹ (U mL ⁻¹) ⁻¹]	5.556·10 ⁻⁵	25.3	4.5·10 ⁷	-0.97	0.05	-0.88	-0.21	-0.03	1		-	
K_{OH} , (mM ⁻ⁿ)	0.58	11.1	1.0·10 ¹²	-0.97	0.04	-0.88	-0.17	-0.07	0.99	1	-	
n	2.576	42.0	3.1·10 ¹⁶	0.80	0.27	0.83	0.76	-0.53	-0.74	-0.73	1	-

V.5. MODELAREA CINETICII OXIDĂRII D-GLUCOZEI ÎN PREZENȚA CATALAZEI LA 25°C ȘI CONSIDERAȚII PRIVIND INGINERIA PROCESULUI

Având în vedere faptul că temperatura optimă de acțiune pentru catalaza liberă, izolată din ficatul de bou, este de 25°C (Brenda, 2011), iar cea a P2Ox recombinate din *Coriolus sp.* este de 35°C (la pH-uri optime), experimentele au fost extinse la temperatura de 25°C, luându-se în calcul și faptul că temperaturile proceselor industriale cât mai apropiate de cele ambientale sunt în general favorizate din punct de vedere economic. Determinările cinetice precum și re-identificarea constantelor vitezelor de reacție la această temperatură au permis localizarea regiunii de operare cele mai favorabile din punct de vedere al eficienței procesului (conversie și viteză de oxidare mare, respectiv o inactivare mai redusă a enzimei).

Studiul cinetic la două temperaturi diferite a fost motivat și de interferențele multiple și complexe dintre reacțiile enzimatic prin intermediul intermediarilor ce nu au fost incluși în model dar care fac ca cele două enzime să influențeze procesul uneori în direcții opuse.

Constantele vitezelor de reacție au fost estimate pe baza profilului curbei înregistrate pentru fiecare specie chimică existentă în mediul de reacție (DG, kDG, DO, H₂O₂, și P2Ox) în trei situații: în absența catalazei sau cu un adaos inițial Catalază / P2Ox de 100 U U⁻¹ sau 300 U U⁻¹. Concentrația de H₂O₂ nu a fost luată în calcul în etapele următoare deoarece prezența în mediul de reacție a catalazei (foarte activă la 25⁰C) a provocat reducerea rapidă a H₂O₂ atingându-se astfel concentrații foarte mici (sub 0.1mM) a căror dozare se realizează cu o acuratețe scăzută.

Parametrii modelului estimat la 25⁰C, sunt prezentați în Tabelul V.5. – 1. comparativ cu cei de la 30⁰C. Constanta de saturație a catalazei s-a menținut constantă, similară situației de la 30⁰C, ca urmare a lipsei determinărilor de H₂O₂ în estimare.

Tabelul V.5. – 1. Valorile constantelor cinetice pentru oxidarea D-glucozei utilizând P2Ox și catalază la 25⁰C și 30⁰C, pH=6.5, [DG]₀ = 100 mM; [P2Ox]₀ = 0.25 U mL⁻¹). (Maria et al., 2012).

Parameteri	Temperatura	Fără Catalază	Catalaza =100 P2Ox	Catalaza =300 P2Ox	Valori în literatură ^(c)
μ_m , [mM s ⁻¹ (U mL ⁻¹) ⁻¹]	25	0.661	0.541	0.618	0.06-349 (s ⁻¹)
	30	0.988	0.369	0.049	
K_{DG} , (mM)	25		0.987		0.4-7.6
	30		0.519		
K_{DO} (mM)	25		5.943		0.1-0.5
	30		14.545		
k_d , [s ⁻¹ (U mL ⁻¹) ⁻¹]	25	4.69·10 ⁻⁴	0.337	0.929	
	30	1.42·10 ⁻³	6.07·10 ⁻⁴	1.15·10 ⁻⁴	
k_c , [s ⁻¹ (U mL ⁻¹) ⁻¹]	25	-	7.37·10 ⁻⁴	6.37·10 ⁻⁴	10 ⁻³ (e1) – 100 (e2)
	30	-	5.55·10 ⁻⁵	(10 ⁻⁷) ^(d)	
K_{OH} , (mM ⁻ⁿ)	25-30	-		0.58	
n	25-30	-		2.58	
ν_{P2Ox} , (U mL ⁻¹ mM ⁻¹)	25-30		0.01019		
$k_{oxl} a$, (s ⁻¹)	25-30	0.02 (a)		0.01	
s_y (b), (-)	25	2.2	3.4	3.7 (pentru 4 specii)	
	30	1.8	2.0	2.2 (pentru 4 specii)	

Tabelul V.5. – 2. Considerații privind condițiile optime de reacție pentru conversia DG (x) și predicția activității reziduale a P2Ox pentru procesul de oxidare a D-glucozei la 25⁰C și 30⁰C, la pH=6.5, [DG]₀ = 100 mM; [P2Ox]₀ = 0.25 U mL⁻¹, și raportul inițial Catalază / P2Ox = 0 - 300.

Temperatură	Raport inițial catalază / P2Ox	Activitate reziduală P2Ox la 24 h / activitate inițială din <i>Trametes multicolor</i> (Leitner, 1998).		Timpul până la obținerea conversiei de 20% din DG (ore)	Timpul total pentru inactivarea P2Ox (ore) [P2Ox]/[P2Ox] ₀ ≈ 10 ⁻⁴
25 ⁰ C	0	0	0	1.96	20.7 (x = 0.54)
	100	0.02	0.20	3.45	2626 (x = 0.74)
	300	0.14	0.50	3.16	2171 (x = 0.76)
30 ⁰ C	0	0	-	3.00	21.2 (x = 0.34)
	100	0.15	-	5.26	91.6 (x = 1)
	300	0.64	-	35.0	142 (x = 0.33)

Predicțiile modelului sunt evidențiate în Figurile V.5. - 1. ÷ V.5. – 3. (linie continuă) comparativ cu datele experimentale și de predicțiile modelului la 30⁰C (linie întreruptă).

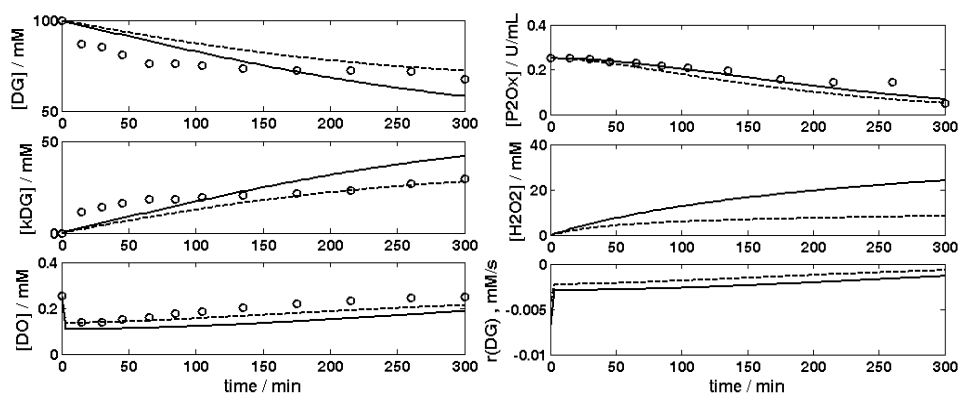


Figura V.5. - 1. Dinamica concentrațiilor speciilor și a vitezei de reacție a DG($r(\text{DG})$) pentru oxidarea glucozei cu aer și P2Ox în absența catalazei. Condiții de reacție: 100 mM glucoză, 0.25 U mL⁻¹ P2Ox, 10 mM tampon fosfat, pH = 6.5; temperatura 25°C. Predicțiile modelului sunt reprezentate cu linie continuă (—) pentru 25°C și întreruptă (-----) pentru 30°C; valorile experimentale înregistrate la 25°C sunt reprezentate cu „o”

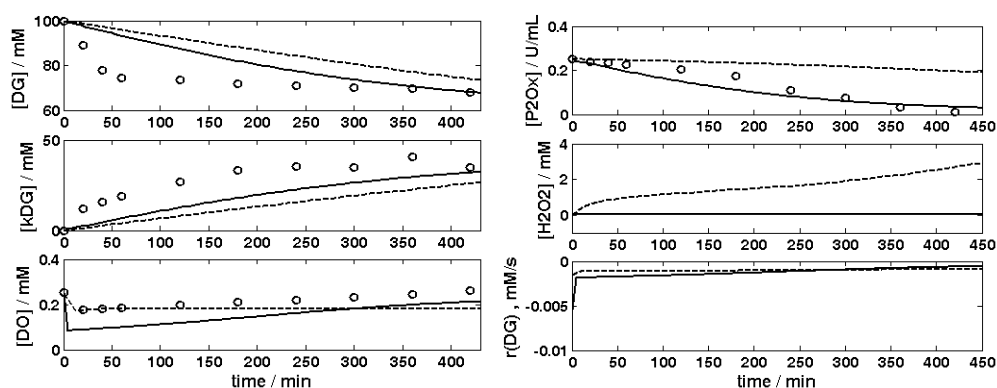


Figura V.5. - 2. Dinamica concentrațiilor speciilor și a vitezei de reacție a DG($r(\text{DG})$) pentru oxidarea glucozei cu aer și P2Ox în prezența catalazei (Catalază / P2Ox = 100 U U⁻¹). Condiții de reacție: 100 mM glucoză, 0.25 U mL⁻¹ P2Ox, 10 mM tampon fosfat, pH = 6.5; temperatura 25°C. Predicțiile modelului sunt reprezentate cu linie continuă (—) pentru 25°C și întreruptă (-----) pentru 30°C; valorile experimentale înregistrate la 25°C sunt reprezentate cu „o”

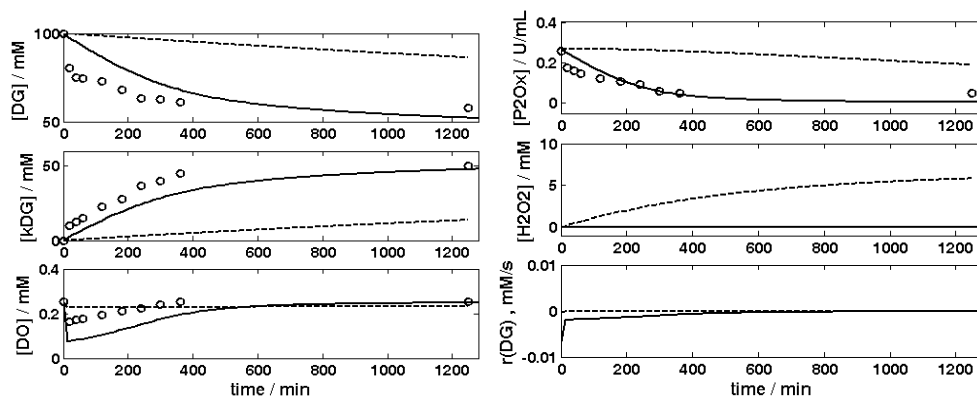


Figura V.5. - 3. Dinamica concentrațiilor speciilor și a vitezei de reacție a DG($r(\text{DG})$) pentru oxidarea glucozei cu aer și P2Ox în prezența catalazei (Catalază / P2Ox = 300 U U⁻¹). Condiții de reacție: 100 mM glucoză, 0.25 U mL⁻¹ P2Ox, 10 mM tampon fosfat, pH = 6.5; temperatura 25°C. Predicțiile modelului sunt reprezentate cu linie continuă (—) pentru 25°C și întreruptă (-----) pentru 30°C; valorile experimentale înregistrate la 25°C sunt reprezentate cu „o”

CAPITOLUL VI

CONTRIBUȚII PRIVIND STUDIUL CINETICII REDUCERII ENZIMATICE A CETO-D-GLUCOZEI FOLOSIND ALDOZREDUCTAZA (ALR)

A doua etapă enzimatică a procedurii Cetus studiat în cadrul tezei este reducerea ceto-glucozei, obținute anterior prin oxidarea D-glucozei, la fructoză în prezența aldozreductazei (ALR) și a unui donor de electroni respectiv co-factorul NADPH.

Obiectivul acestui capitol este acela de a studia experimental și teoretic mecanismul și cinetica reducerii 2-ceto-glucozei (kDG) la fructoză, în condiții optime de activitate a ALR și pentru condiții foarte variate de operare sub aspectul concentrației inițiale de substrat, cofactor, sau enzimă. În acest scop a fost elaborat un program experimental extins, în care au fost variate pe rând concentrațiile inițiale ale speciilor cheie (kDG, ALR, NADPH), domeniul de timp de reacție investigat fiind unul suficient de larg (peste 4600 min) pentru a putea fi obținute concluzii pertinente. Condițiile de lucru izoterme optime pentru ALR au fost cele recomandate de BRENDA (2013), respectiv temperatura de 25°C și $pH_{\text{optim}} = 7$. Prin măsurători spectro-fotometrice și de activitate enzimatică s-au măsurat curbele cinetice experimentale ale speciilor importante implicate în proces (kDG, NADPH, ALR, fructoză) pentru cantități diferite de enzimă și reactanți introduși în mediul de reacție. Experimentele au utilizat ALR comercializată de ATGEN, recombinată prin expresia genei codoare umane în *E. coli*. Pe baza măsurătorilor cinetice efectuate într-un domeniu de condiții de reacție suficient de larg, precum și pe baza informațiilor de literatură privind mecanismele de reacție pentru procese reductive enzimatiche similare, s-a procedat la elaborarea unei scheme plauzibile de reacție și a unui model cinetic atașat. Constantele vitezelor de reacție, estimate pe baza măsurătorilor cinetice au indicat o adecvanță bună a modelului cinetic și o calitate satisfăcătoare a parametrilor săi. Rezultatele obținute au fost confruntate cu date similare din literatura de specialitate, respectiv procese enzimatiche de reducere a monozaharidelor și derivaților acestora catalizate de ALR.

În ce privește enzima implicată, aldoz-reductaza (EC 1.1.1.21, aldehyd reductaza, ALR) este studiată atent de decenii datorită aplicațiilor sale medicale: implicarea ALR în metabolismul glucozei (conversia glucozei la sorbitol; reducerea galactozei la galactitol), dezvoltarea cataractei la diabetici (provoacă leziuni oculare datorită acumulării de sorbitol); producerea de leziuni miocardice ischemice. ALR (alditol:NADP⁺ oxidoreductază, EC 1.1.1.21.) membră a superfamiliei aldo/ceto reductazelor (AKR), este o proteină mică, cu masă moleculară de aproximativ 36 kDa, cei aproximativ 315 aminoacizi din structura sa fiind distribuiți de-a lungul celor trei domenii ce leagă cofactorul fără a respecta motivul Rossmann (Figura VI.1. - 1.). Prin analiza cristalografică a proteinei s-a constatat că, deși enzima prezintă multiple forme, molecula conține un motiv structural de tip lanțuri (β/α)₈, cofactorul legându-se în partea inferioară a situsului activ, hidrofob, ce se află poziționat în centrul moleculei. Ca membru a acestei superfamilii, ALR catalizează reducerea nespecifică (în prezență de NADPH) a unui număr mare de substraturi carbonilice (alifatici și aromatici) la alcoolii corespunzători acestora, prezentând un potențial ridicat pentru aplicațiile industriale, în special ca alternativă la producția de polioli utilizați drept îndulcitori sintetici (sorbitol, manitol, xilitol, eritriol, arabitol și ribitol).

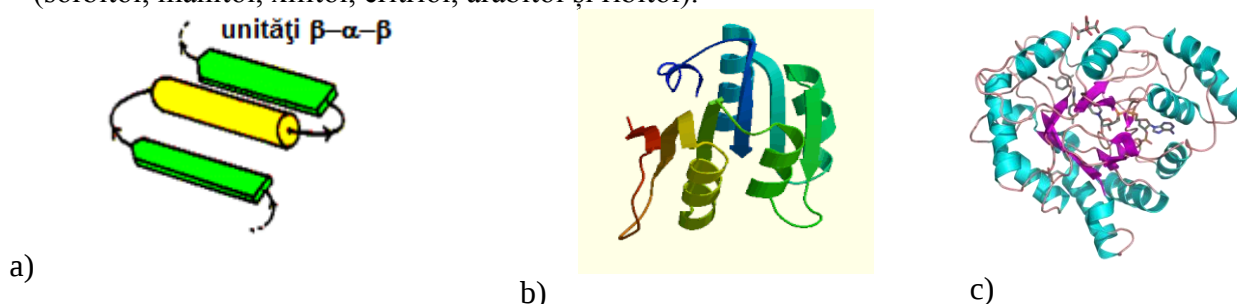


Figura VI.1. - 1. Structura secundară a proteinei - lanțuri $\beta\alpha\beta$ (a); Motivul Michael Rossman (b); Structura complexului ALR – NADP⁺ - inhibitor în tampon citrat (c) (adaptare după Wikipedia, 2013)

Această enzimă urmează un mecanism ordonat în care NADPH-ul este legat primul la situsul catalitic și eliberat ultimul. Hidrogenul din zona *pro-R* a NADPH-ului este transferat la carbonilul substratului cu protonarea concomitentă a oxigenului de către enzima ce acționează ca un acid. Pentru o bună funcționare a ALR, aldehyd reductazei și 3- α -hidroxisteroid dehidrogenazei, o serie de studii au evidențiat necesitatea conservării a patru aminoacizi (Asp-43, Tyr-48, Lys-77 și His-110) din structura protein-enzimei, implicați în formarea unei rețele de legături de hidrogen cu inelul nicotinamidic.

O serie de studii au sugerat faptul că ALR are o selectivitate și specificitate scăzută pentru glucoză (substrat endogen; constanta Michaelis-Menten $K_M = 70$ mM), zaharid ocazional biotransformat, enzima fiind specializată pentru reducerea catalitică a unui număr mare de aldehyde biogene, hidrofile sau hidrofobe, rezultate în urma procesului de peroxidare lipidică, din catabolismul catecolaminelor și serotonininei. Protein-enzima ALR izolată din drojdii a manifestat o variabilitate mare structurală și funcțională (Yokoyama et.al, 1995) astfel că, în timp ce multe tulpini produc un sigur tip de ALR care poate fi NADPH / NADH dependente, exista cateva organisme, cum ar fi *Pachysolen tannophilus*, ce produc două ALR cu specificitate diferită pentru coenzimă (Verduyn et. al, 1985). În mod particular, modelarea reacției de reducere a aldo-ceto derivaților zaharidici catalizată de ALR presupune atingerea rapidă a mai multor stări intermediare de cvasi echilibru, implicând un număr mare de specii intermediare dificil de măsurat (intermediari instabili, moleculele proteice mari care leagă substratul sau produșii de reacție). Doughty & Conrad (1982) au propus un mecanism mult mai elaborat de evaluare a comportamentului cinetic al ALR izolată din două surse diferite (cristalin de bou și cristalin de șobolan) ce implică o ordine aleatorie a legării substratului (gliceraldehidă) și eliberarea produsului (reacții Bi-Bi) cu formarea suplimentară a unui complex intermediar. Utilizarea glucozei ca și substrat a evidențiat faptul că înainte de a reacționa aldehida, NADPH-ul se cuplează la enzimă extrem de rapid, în mai puțin de câteva secunde, cu formarea unui complex stabil. Experimentele în care s-a utilizat drept substrat D-glucoză și NADPH, derulate cu scopul stabilirii mecanismului de reacție, au reliefat tipul de inhibiție produs de NADP^+ (inhibiție competitivă față de NADPH și necompetitivă față de D-glucoză) și sorbitol (inhibiție necompetitivă atât cu D-glucoza cât și cu NADP^+). Modele similare de inhibiție cu al sorbitolului au fost înregistrate și în condițiile experimentale de saturare cu D-glucoză (Halder et al., 1984). Leitner et al. (1998) a evidențiat că în cazul reducerii kDG la fructoză inhibiția cu substrat nu se manifestă la concentrații de sub 100 mM, iar cea cu produsul fructoză pentru concentrații de sub 500 mM.

Chiar dacă ALR este activă în raport cu ambele co-enzime NADPH și NADH, totuși ALR este de preferat a fi utilizată împreună cu NADPH, viteza de reacție fiind de ca. 2-ori mai mare față de cea utilizând NAD(H), datorită unei legături mai bune cu forma fosforilată de NADPH (Neuhauser et al., 1997; Ryle & Tipton, 1985). În ciuda instabilității lor și a costului foarte mare, NADPH rămâne principala co-enzima în reacțiile catalizate de ALR, cu multiple posibilități de regenerare prin reacții redox conduse *in-situ* sau în sisteme regenerative separate (Chenault & Whitesides, 1987).

VI.3. EXPERIMENTE PRIVIND REDUCEREA ENZIMATICĂ A CETO-GLUCOZEI LA FRUCTOZĂ

Experimentele cu enzimă liberă au fost efectuate într-un vas de reacție mic, respectiv o cuva spectrofotometrică (de ca. 5 mL; celule de precizie Hellma făcute din Quartz SUPRASIL, de 10 mm grosime), umplute cu un volum de lichid de reacție de 1.8-2.5 mL, și echipate cu un sistem on-line de înregistrare a temperaturii. Cuvele mili-reactorului au fost închise etanș pentru a preveni vaporizarea solventului, și au fost plasate într-un spectrofotometru UV/VIS Lambda 25 cu sistem de amestecare și termostatare automat, și cu o unitate de control PTP-6 a temperaturii având următoarele performanțe: domeniu de temperatură 0-100°C, cu rezoluție de citire de 0.1°C și o

stabilitate a citirii de $\pm 0.01^\circ\text{C}$, viteza de încălzire / răcire cu temperatura programată de $10^\circ\text{C min}^{-1}$; agitator cu viteza de 1800 rpm. Reacția a fost condusă la 25°C și $\text{pH} = 7$ în 10 mM tampon fosfat, cu modificarea condițiilor inițiale pentru:

- substrat (kDG) = 15-35 mM;
- cofactor (NADPH) = 6-35 mM;
- enzimă (ALR) = 0.0026-0.0060 U mL^{-1} .

Sistemul de agitare (un agitator magnetic introdus în cuva spectrofotometrică) asigură o omogenizare satisfăcătoare a conținutului bioreactorului, tamponul fosfat reușind să mențină pH-ul soluției cvasi-constant pe durata reacției. Însă, ca urmare a consumului H^+ din mediu de către reacția principală (Tabel VI.4.-1.) la sfârșitul reacției a fost măsurată o ușoară creștere a pH-ului la 7.4. Influența acestei ușoare creșteri de pH asupra activității enzimei se consideră a fi neglijabilă deoarece intervalul optim de activitate pentru ALR umană este cuprins între $\text{pH} = 7 - 8$ (Brenda, 2013; Grimshaw et al. 1995).

Cu scopul de a confirma pe de o parte formarea reversibilă a complexului $\text{ALR} \cdot \text{NADPH}$, ce favorizează menținerea unui nivel foarte scăzut al NADPH în reactor, și pe de altă parte pentru a caracteriza procesul de dezactivare a enzimei, evoluția reducerii kDG a fost monitorizată continuu pe o perioadă lungă de timp (peste 4600 min) chiar dacă concentrația NADPH-ului a scăzut rapid încă de la începutul reacției. Pe toată perioada derulării unui experiment, la intervale diferite de timp, au fost prelevate mici eșantioane din bioreactor și analizate pentru determinarea concentrației de kDG, fructoză și activitatea reziduală a ALR. Eșantioanele divizate în aliquote au fost imediat depozitate la -70°C până în momentul realizării testelor specifice (fiecare probă fiind analizată în duplicat). Abaterea standard a erorii experimentale determinate din experimente duplicate (uneori triplicate) a rezultat ca fiind: $\sigma_{\text{kDG}} = \sigma_P = \sigma_{\text{NADPH}} = 1.5 \text{ mM}$, și $\sigma_{\text{ALR}} = 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$. Experimentele la concentrații inițiale scăzute ale substratului și cofactorului nu au fost realizate, nefiind de interes din punct de vedere al ingineriei procesului datorită conversiilor mici înregistrate.

VI.4. MODELAREA CINETICII REDUCERII CETO-GLUCOZEI LA FRUCTOZĂ ȘI CONSIDERAȚII PRIVIND PERFORMANȚELE PROCESULUI

În capitolul de față se urmărește ca, pe baza datelor experimentale cinetice măsurate în condiții variate de reacție, să se elaboreze un model cinetic al procesului complex de reducere a kDG la fructoză în prezență de ALR și NADPH bazat pe un mecanism de reacție propus.

În ceea ce privește mecanismul reacției de reducere a aldo-ceto derivaților catalizate de ALR, acesta este unul complex, implicând un număr semnificativ de intermediari (până la 6; Grimshaw et al., 1995), și molecule mari ce leagă substratul, produșii, enzima și co-factorul său (NADPH), dificil de măsurat în regim dinamic de reacție. În literatură au fost studiate diferite aspecte ale acestei reacții complexe, și au fost propuse mai multe modele cinetice matematice, identitatea reziduului care donează protonul rămânând controversată (Blakeley et al., 2008). Rezultate recente de cercetare, sugerează că h-ALR umană se dovedește a fi un catalizator eficient și capabil să reacționeze în mod nespecific cu diferite substraturi (prin utilizarea unui proton distal donor din perechea Asp-43–Lys-77 ce declanșează lanțul de reacții și cedarea protonului final de la Tyr-48; Blakeley et al., 2008). Pe scurt (vezi Figura VI.4 – 1.), reacția debutează printr-o cuplare foarte rapidă, de câteva secunde (Grimshaw et al., 1995), a ALR de NADPH, conducând la un complex destul de stabil. Totuși, prezența substratului conduce la formarea unei succesiuni de intermediari pe baza unei succesiuni de reacții reversibile Bi-Bi (Kubiseski et al., 1992; Lindstad et al., 1995; Grimshaw et al., 1990; Petrash, 2004). Cele mai multe din modelele cinetice propuse presupun că lanțul de reacții

reversibile atinge rapid starea de cvasi-echilibru, schimbarea de conformație cerută de eliminarea NADP^+ din ultima reacție reprezentând etapa lentă pentru întregul proces. Pentru a estima numărul mare de constante de reacție, de estimabilitate redusă (conducând prin înlocuirea lor cu grupări de constante; Lindstad et al., 1995; Grimshaw et al., 1995), s-au formulat diferite ipoteze simplificatoare cum ar fi inhibiția non-competitivă a substratului și a NADPH (Halder & Crabbe, 1984), sau s-a omis complet formarea complexului instabil enzimă-cofactor-substrat (adică mecanismul cinetic Theorell-Chance în care disocierea coplexului enzimă-coenzimă-produs este etapa lentă a procesului; Petrash, 2004; Lindstad, 1995).

În studiul de față s-a adoptat prin similitudine același ‘nucleu’ al mecanismului de acțiune al ALR asupra NADPH și kDG, respectiv o succesiune de reacții reversibile de tip Bi-Bi ce ajung rapid la echilibru, conducând la o cvasi-staționaritate a complexurilor intermediare formate între h-ALR, NADPH și substrat (prezentată în Figura VI.4. – 1.).

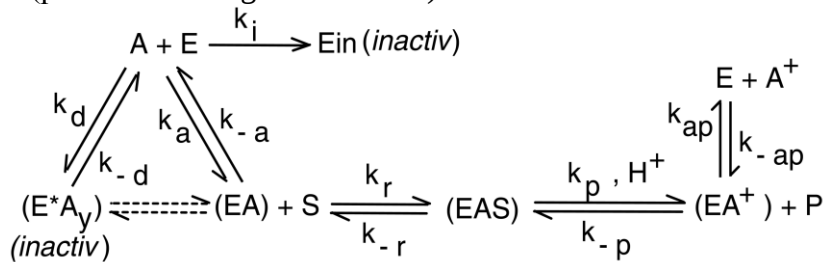


Figura VI.4. – 1. Mecanismul de reacție propus pentru reducerea enzimatică a kDG utilizând NADPH și ALR liberă. Notății: E = aldooz reductază (ALR); A = cofactor (NADPH); A^+ = NADP^+ ; S = substrat (kDG); P = produs (fructoză); Ein = forma inactivă a enzimei (Maria & Ene, 2013).

Studiul prezent va verifica validitatea schemei de reacții reversibile de tip Bi-Bi succesiv în cazul kDG, caracteristicile reacțiilor secundare, semnificația constantelor de viteză estimate și utilizarea predicțiilor modelului în obținerea unor concluzii de interes practic pentru îmbunătățirea ulterioară a procesului studiat. Plecând de la secvența de reacție propusă în Figura VI.4. - 1. și de la ipotezele de cvasi-staționaritate ale intermediarilor, s-a dedus o expresie cinetică de tip hiperbolic pentru reacția globală (Tabel VI.4. - 1.) prin asumarea echilibrelor rapide pentru toate etapele elementare ale lanțului principal și prin eliminarea din ecuația vitezei a speciilor intermediare neobservabile (Segel et al., 1993). Bilanțul masic al speciilor include secvența de reacții secundare de legare reversibilă a NADPH-ului la enzimă (constantele vitezelor k_d și k_{-d}) și de dezactivare ireversibilă a enzimei. Pentru a nu complica prea mult modelul cinetic, s-a adoptat un model de ordinul I pentru inactivarea ALR (k_i - constanta de dezactivare).

Pentru a simula experimentele efectuate, s-a adoptat un model ideal pentru reactorul discontinuu (izoterm, amestecare perfectă) incluzând ecuațiile de bilanț masic prezentate în Tabelul VI.4.-1. Constantele de viteză au fost estimate prin ajustarea predicțiilor modelului astfel încât să se potrivească cu profilul experimental al curbelor de concentrație funcție de timp pentru kDG, fructoză, NADPH liber și ALR activă (liberă). Seturile de date utilizate provin de la patru teste în care s-au variat condițiile inițiale de reacție astfel:

- $[\text{kDG}] / [\text{NADPH}] / [\text{ALR}] = 35 / 35 / 0.0057 \text{ (mM/mM/U mL}^{-1}\text{)}$
- $[\text{kDG}] / [\text{NADPH}] / [\text{ALR}] = 35 / 35 / 0.00257 \text{ (mM/mM/U mL}^{-1}\text{)}$,
- $[\text{kDG}] / [\text{NADPH}] / [\text{ALR}] = 35 / 6 / 0.0055 \text{ (mM/mM/U mL}^{-1}\text{)}$,
- $[\text{kDG}] / [\text{NADPH}] / [\text{ALR}] = 15 / 35 / 0.006 \text{ (mM/mM/U mL}^{-1}\text{)}$.

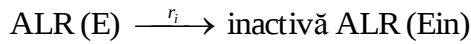
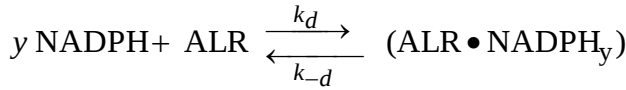
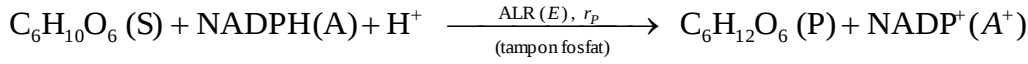
Drept estimator al constantelor cinetice s-a folosit criteriul celor mai mici pătrate ponderate, care se bazează pe minimizarea dispersiei erorii relative a modelului în raport cu experimentele:

$$\hat{k} = \arg \text{Min} (s_y^2); s_y^2 = \left(\sum_{j=1}^m \|c_j - \hat{c}_j\|_2^2 / \sigma_j^2 \right) / (N m - p),$$

unde: $j = \text{kDG, NADPH, fructoză, ALR}$; $N = \text{numărul punctelor experimentale (39 timpi de reacție)}$; $m = \text{numărul variabilelor observabile (4)}$; $p = \text{numărul parametrilor modelului (9)}$; ‘^’ = valori estimate.

Tabel VI.4. - 1. Cinetica și modelul reactorului discontinuu propuse pentru reducerea enzimatică a kDG utilizând NADPH și ALR suspendată. Notății: E = ALR (enzimă); A = NADPH; A⁺ = NADP⁺; S = kDG (substrat); P = fructoză (produs).

Reacții generale:



Ecuția vitezelor (vezi schema din figura VI.4. - 1.):

$$r_p = \frac{k_p [E_t] [S] \left(\frac{[A]}{K_R K_A} - \frac{1}{K_{eq} K_{AP}} \frac{[A^+][P]}{[S]} \right)}{1 + \frac{[A]}{K_A} + \frac{[A][S]}{K_R K_A} + \frac{[A^+]}{K_{AP}}}, \text{ (mecanism succesiv Bi-Bi)}$$

$$r_d = k_d [A][E]; r_{-d} = k_{-d} [E^* A]; r_i = k_i [E]; K_A = \frac{[E][A]}{[EA]} = \frac{k_{-d}}{k_d};$$

$$K_R = \frac{[EA][S]}{[EAS]} = \frac{k_{-r}}{k_r}; K_{eq} = \frac{[EA^+][P]}{[EAS]} = \frac{k_p}{k_{-p}}; K_{AP} = \frac{[E][A^+]}{[EA^+]} = \frac{k_{ap}}{k_{-ap}}$$

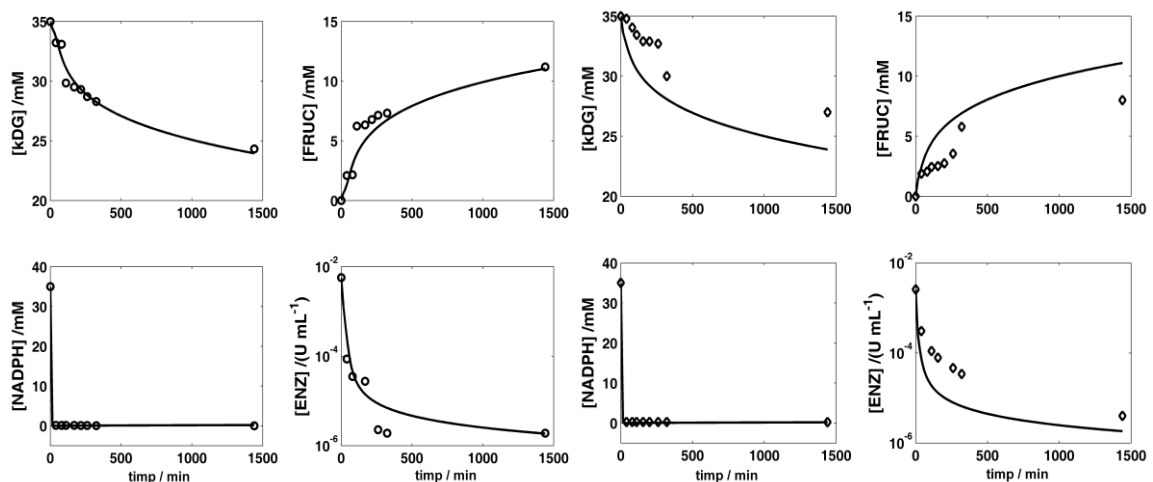
Bilanțul masic:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{dA^+}{dt} = r_p; \frac{dA}{dt} = -r_p - y r_d + y r_{-d}$$

$$\frac{dE}{dt} = -r_d + r_{-d} - r_i; \frac{d(E^* A)}{dt} = r_d - r_{-d}$$

Parametri de operare:

volumul total de reacție = 1.8-2.5 mL
10 mM tampon fosfat
pH = 7; t = 25°C
[kDG] = 0-35 mM; [NADPH] = 0-35 mM
inițial [ALR] = 0.0026-0.0060 U mL⁻¹



a)

b)

Figura VI.4. – 2. Dinamica concentrației speciilor observabile (kDG, Fructoză, NADPH liber, ALR reziduală) în reacția de reducere enzimatică a kDG utilizând ALR suspendată și NADPH. Predicția modelului este reprezentată prin linie continuă iar valorile experimentale prin ‘o’ respectiv ‘◇’. Condițiile inițiale de reacție: a) 35 mM kDG, 35 mM NADPH, 0.0057 U mL⁻¹ ALR, 10 mM tampon fosfat, pH = 7; 25°C; b) 35 mM kDG, 35 mM NADPH, 0.00257 U mL⁻¹ ALR, 10 mM tampon fosfat, pH = 7; 25°C.

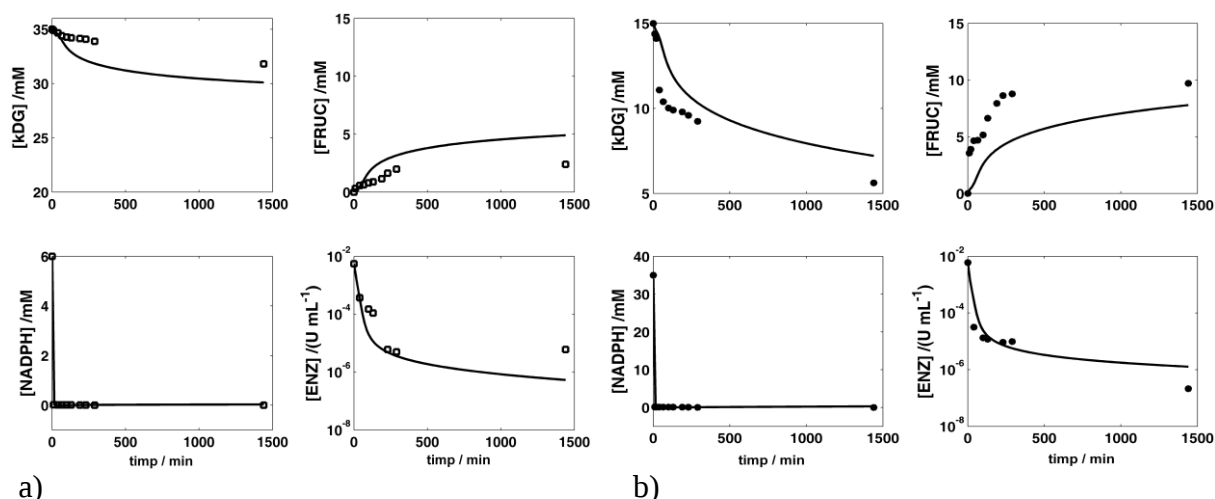


Figura VI.4. - 3. Dinamica concentrației speciilor observabile (kDG, Fructoză, NADPH liber, ALR reziduală) în reacția de reducere enzimatică a kDG utilizând ALR suspendată și NADPH. Predicția modelului este reprezentată prin linie continuă iar valorile experimentale prin $\square$ și $\bullet$. Condițiile inițiale de reacție: a) 35 mM kDG, 6 mM NADPH, 0.0055 U mL⁻¹ ALR, 10 mM tampon fosfat, pH = 7; 25°C; b) 15 mM kDG, 35 mM NADPH, 0.006 U mL⁻¹ ALR, 10 mM tampon fosfat, pH = 7; 25°C.

Table VI.4. - 2. Parametrii cinetici estimați, teste de adecvanță ale modelului cinetic, teste de semnificație a parametrilor estimați, și datele de literatură pentru procesul de reducere enzimatică a kDG utilizând NADPH și ALR suspendată (parametrii cinetici pentru 25°C, pH=7; ALR). *t*-test calculat cu eroarea standard experimentală minimă de $\tilde{\sigma} = 0.024$, vezi anexa lui Treitz et al. (2001)

Parametrul	Estimat ($\pm$ 95% CI) ^(a)	<i>t</i> -test ^(a)	$\lambda_j / \tilde{\sigma}^2$ (ordonate) ^(b)	Valori raportate
k_p , mM min ⁻¹ (U/mL) ⁻¹	$(3.90 \pm 1.20) \cdot 10^6$ (289-1560 min ⁻¹)	6.3 (✓)	1	11-36 (min ⁻¹) (substrat: glicolaldehidă Grimshaw et al, 1990 sau gliceraldehidă Kubiseski, 1992; ALR de origine animală) 9300 min ⁻¹ (pentru xiloz reductază) Mayr, P., 2003
K_A , mM	50.58 ± 23.85	4.1 (✓)	1	$10^{-4} - 2740$ (diferite substraturi și surse de ALR) Brenda, 2013; Grimshaw, 1995; Hayman, 1965
K_R , mM	1.15 ± 0.21	10.9 (✓)	1	0.2-150 (diferite substraturi) Halder, 1984 1.06 (substrat - xiloză; ALR de origine umană) Grimshaw, 1995
K_{eq} , mM	1637 ± 417	7.7 (✓)	1.6	446-528 (xiloz reductază) Mayr, 2003 200 (substrat - xiloză; ALR de origine umană) Grimshaw, 1995
K_{AP} , mM	0.99 ± 0.40	4.8 (✓)	4.8	$1.9 \cdot 10^{-3} - 8.3 \cdot 10^{-3}$ (gliceraldehidă) Kubiseski, 1992 $3 \cdot 10^{-3}$ (substrat - xiloză; ALR de origine umană) Grimshaw, 1995
k_d , mM ⁻¹ min ⁻¹	$(2.66 \pm 0.14) \cdot 10^6$	37.7 (✓)	9.7	$7.2 \cdot 10^6$ (ALR de origine umană) Grimshaw, 1995
k_{-d} , min ⁻¹	672 ± 35	37.7 (✓)	$1.6 \cdot 10^5$	10^4 (ALR de origine umană) Grimshaw, 1995
y , mM (U/mL) ⁻¹	$(1.78 \pm 0.01) \cdot 10^4$	2219 (✓)	$1.1 \cdot 10^9$	-
k_i , min ⁻¹	$(7.01 \pm 0.01) \cdot 10^{-2}$	8162 (✓)	$3.5 \cdot 10^{12}$	-
s_y ^(c) , (-)	1.04			remarcă: ^(d) adecvanța: χ^2 -test trecut

Pentru soluționare s-a utilizat algoritmul adaptativ aleatoriu de optimizare a lui Maria (2003) implementat în MatlabTM. Căutarea soluției a avut ca punct de plecare parametrii cinetici teoretici, generați aleatoriu în cadrul domeniului de variație prezentat în Tabelul VI.4. - 2. (ultima coloană) cu excepția constantei de dezactivare k_i a cărei aproximație s-a realizat pe baza graficului dinamicii concentrației ALR determinat experimental.

CONCLUZII GENERALE

Prezenta teză de doctorat prezintă rezultatele unor cercetări ample, experimentale și teoretice, privind mecanismul de reacție și cinetica procesului Cetus de obținere a fructozei prin două etape enzimaticice succesive (oxidarea glucozei urmată de reducerea ceto-glucozei). Procesul investigat se dorește a fi o alternativă valoroasă la tehnologiile existente de producere industrială a fructozei prin biosinteză, caracterizându-se prin conversii și selectivități foarte mari (peste 99%), și prin obținerea unui produs de puritate avansată, lipsit de aldoze alergene sau săruri folosite drept catalizatori.

Cercetarea fiind structurată pe mai multe paliere, atât sub aspect teoretic cât și experimental, și al relevanței din punct de vedere al eficienței procesului, fiecare etapă a studiului este însoțită de concluzii pertinente privind ingineria procesului, după cum urmează.

1) Cercetarea bibliografică efectuată în cadrul tezei (Cap. I, II) a evidențiat următoarele aspecte legate de folosirea unor enzime în industria monozaharidelor:

- Atât piranoz-oxidaza (P2Ox), cât și aldoz-reductaza (ALR) sunt din ce în ce mai mult folosite în industria zaharurilor pentru fabricarea unui număr însemnat de derivați (“zaharuri rare”), cum ar fi pentru cazul P2Ox: D-fructoza (și apoi D-manitol), acid 2-ceto-D-gluconic (și apoi acid ascorbic), acid 2-deoxi-3-ceto-gluconic (și apoi tiamina), D-sorbitol, diaminosorbitol, diaminomanitol, 2-ceto-D-galactoză (și apoi D-tagatoza), etc., sau pentru cazul ALR producția de polioli utilizați drept îndulcitori sintetici de tipul sorbitol, manitol, xilitol, eritriol, arabitol și ribitol.
- Consumul de îndulcitori de biosinteză este în creștere la nivel mondial, necesitând îmbunătățirea tehnologiilor existente de fabricare în vederea reducerii produselor secundare și impurităților, scăderii prețului enzimelor și creșterii stabilității acestora, obținerii de îndulcitori cât mai bine tolerați de organism și cu minim de efecte secundare.
- Consumul de fructoză este și el în creștere, tehnologiile existente având avantaje și dezavantaje, respectiv: I) izomerizarea glucozei provenită de la hidroliza amidonului este limitată termodinamic (conversia de echilibru este de ca. 50%), reacția decurge la temperatură ridicată (50-60°C), necesită o puritate ridicată a glucozei pentru a preveni dezactivarea izomerazei, necesită costuri mari de operare și de investiție datorită necesității separării fructozei de glucoză în coloane cromatografice mari, iar procentul de produși secundari și alergeni nu este neglijabil (ca. 2%); ii) hidroliza inulinei necesită temperaturi semnificative (50-60°C), randamentul este de ca. 95% rezultând un procent important de impurități, procedeul este costisitor și încă necompetitiv din cauza instabilității hidrolazei; iii) hidroliza enzimatică a zaharozei necesită temperaturi medii (55-65°C), conduce la multe produse secundare, iar invertaza este foarte sensibilă fiind puternic inhibată de prezența în mediul de reacție a ionilor metalelor grele.
- Procedeul enzimatic Cetus în două trepte, studiat în detaliu în cadrul tezei, se dovedește a fi unul promițător, prin folosirea unor temperaturi mici de reacție (25-30°C), prin obținerea unor conversii și selectivități foarte mari (peste 99.5%), prin obținerea de produși secundari în cantitate foarte mică, prin lipsa de aldoze alergene, și prin posibilitatea de diminuare a dezactivării P2Ox prin folosirea de catalază.
- Lipsa datelor cinetice și a unui model cinetic consistent pentru cele două procese enzimaticice Cetus în literatura de specialitate justifică pe deplin oportunitatea studiului de față, acesta constituindu-se într-o etapă esențială pentru studiile ingineresti ulterioare de ridicare la scară a procesului, de optimizare a condițiilor de operare, și de direcționare a cercetărilor în vederea găsirii modalității celei mai bune de stabilizare a enzimei prin imobilizare.

2) În prezenta lucrare au fost studiate experimental și teoretic cele două etape enzimaticice ale procedeului Cetus, respectiv oxidarea D-glucozei la ceto-D-glucoză în prezență de P2Ox și catalază, și reducerea ulterioară a ceto-D-glucozei la fructoză în prezență de ALR și co-factorul NADPH.

Studiul a permis elaborarea de modele cinetice consistente pe baza cărora s-au putut efectua simulări și calcule predictive ce au pus în evidență condițiile optime de operare și posibilitățile de îmbunătățire a performanțelor celor două procese.

3) În vederea separării contribuției transportului oxigenului la evaluarea vitezei aparente a procesului de oxidare a glucozei, s-a procedat la efectuarea de experimente separate, în absența reacției, pentru determinarea coeficientului total de transfer masic gaz-lichid al oxigenului KLA (Capitolul IV). Rezultatele au permis nu numai identificarea regimului optim hidrodinamic (turație agitator, debit de aerare) necesar realizării unui transfer bun al oxigenului și evitarea controlului difuzional al procesului, dar și obținerea unei corelații a coeficientului de transfer KLA cu principalii parametri de operare ai bioreactorului.

4) Una dintre principalele contribuții ale tezei se referă la studiul experimental și teoretic al *cineticii oxidării enzimaticice a D-glucozei folosind piranoz-oxidaza (P2Ox)* (Capitolul V). Rezultatele au condus la următoarele concluzii:

- i. Mecanismul de reacție propus, deși simplificat, este unul satisfăcător, fiind confirmat prin verificarea modelului cinetic atașat în raport cu date experimentale culese în condiții variate de operare. Schema de reacții include reacția principală de oxidare de tip Ping-Pong-Bi-Bi, o reacție de dezactivare a P2Ox de ordinul unu în raport cu apa oxigenată, și o reacție de descompunere a apei oxigenate rezultate după o cinetică de tip Yano-Koya.
- ii. Modelul cinetic este unul adecvat, robust, și cu o capacitate predictivă satisfăcătoare conform testelor statistice. Modelul a fost validat pentru două temperaturi diferite (25°C și 30°C) și la rapoarte catalază / P2Ox de 0 - 300 U/U.
- iii. Experimentele și modelul cinetic confirmă efectul favorabil al prezenței catalazei în mediul de reacție, ceea ce conduce la scăderea inactivării P2Ox. Astfel, s-a identificat că un raport de catalază / P2Ox = 100 U U⁻¹ scade viteza de inactivare de 4.5 ori comparativ cu sistemul fără catalază, și de 34 de ori pentru un raport catalază / P2Ox = 300 U U⁻¹ (la 30°C).
- iv. Experimentele și modelul cinetic au arătat însă că viteza de oxidare a glucozei este drastic diminuată de prezența catalazei (de la 1,8 ori pentru un raport catalază/P2Ox = 100 U U⁻¹ până la 12,2 ori pentru raportul catalază/P2Ox = 300 U U⁻¹). În plus, timpul de reacție necesar pentru obținerea unei conversii impuse crește aproximativ cu același ordin de mărime cu care viteza de reacție scade.
- v. Scăderea temperaturii de reacție la 25°C, deși favorabilă energetic, nu este la fel de favorabilă în ce privește inactivarea P2Ox, deși reacția principală de oxidare este mai puțin inhibată. Activitatea mult mai intensă a catalazei la această temperatură conduce la o concentrație mai mare a intermediarilor oxidativi formați în procesul de descompunere a H₂O₂ (concentrația H₂O₂ fiind una scăzută, în jurul valorii de 0.1 mM comparativ cu 5 mM de la 30°C) ceea ce conduce la o inactivare mai accentuată a P2Ox.
- vi. Modelul cinetic a permis identificarea condițiilor optime de operare pentru procesul de oxidare a D-glucozei ca fiind cel la 30°C, pH = 6.5, și un raport Catalază / P2Ox = 100 U/U, ce oferă o conversie totală în ca. 91 h. Utilizarea unei cantități mari de catalază nu este recomandată datorită reducerii prea mari a vitezei reacției principale.
- vii. O concluzie importantă a studiului este aceea că în sistemele de reacție multi-enzimaticice, evaluarea separată a caracteristicilor și activității fiecărei enzime în parte nu este suficientă pentru emiterea de concluzii pertinente privind condițiile optime de operare atâta timp cât între reacții au loc interferențe multiple. Modelul cinetic astfel elaborat poate fi util pentru evaluarea globală a procesului enzimatic în condiții variate de operare.
- viii. Modelul cinetic este util și în cazul utilizării de enzimă stabilizată/imobilizată, structura sa rămânând neschimbată, fiind însă necesară re-estimarea constantelor cinetice și introducerea unor termeni suplimentari în ecuațiile de bilanț masic ale reactorului eterogen.

5) O altă contribuție majoră a tezei se referă la studiul experimental și teoretic al celei de a doua etapă a procesului Cetus, respectiv studiul *cineticii reducerii enzimaticice a ceto-D-glucozei folosind aldoz reductaza (ALR)* și nicotin adenin dinucleotid fosfatul (NADPH) ca și donor de electroni (Capitolul VI). Rezultatele au condus la următoarele concluzii:

- i. Mecanismul de reacție propus, deși unul complex, este confirmat atât prin comparație cu studii similare din literatură privind modele cinetice de acțiune a aldo-ceto-reductazelor, cât și prin verificarea modelului cinetic în raport cu datele experimentale culese în condiții variate de operare. Schema de reacții include o etapă reversibilă de formare a unui complex stabil $ALR \cdot NADPH$, urmată de reacții succesive reversibile Bi-Bi de legare a substratului, de re-aranjare conformațională, de reducere a cetoglucozei, și de eliberare a produsului și co-factorului epuizat $NADP^+$. Schema este completată și cu o reacție de inactivare ireversibilă a ALR, pusă în evidență experimental.
- ii. Modelul cinetic este unul adecvat, robust, și cu o capacitate predictivă foarte bună conform testelor statistice. Modelul a fost validat pentru temperatura de $25^\circ C$ și $pH=7$ pentru rapoarte variate de alimentare cu substrat, ALR, și NADPH, într-o plajă largă de valori ($k_{DG} = 0 - 35 \text{ mM}$; $NADPH = 0 - 35 \text{ mM}$; $ALR = 0.002 - 0.006 \text{ U/mL}$).
- iii. Experimentele și modelul cinetic confirmă afinitatea ridicată a ALR pentru NADPH ce conduce la formarea rapidă și reversibilă a complexului $ALR \cdot NADPH$ în diferite forme (observație susținută și de datele de literatură). O mică parte din acest complex participă la cuplarea substratului în vederea reducerii acestuia la fructoză prin transferul intern a unui electron în cadrul complexului $ALR \cdot NADPH \cdot k_{DG}$.
- iv. Pe parcursul etapelor succesive ale reacției Bi-Bi, enzima suferă o serie de rearanjări conformaționale, pasul cel mai lent fiind confirmat pentru etapa $ALR' \cdot NADP^+ \leftrightarrow ALR \cdot NADP^+$, izomerizarea enzimei realizându-se cu scopul de a elibera $NADP^+$. Totodată, pe domeniul experimental analizat nu au fost observate efecte inhibitorii semnificative induse de către substrat sau produșii de reacție.
- v. În ciuda dezactivării rapide a enzimei, experimentele indică prezența unei cantități mici de ALR activă pe parcursul reacției în pofida descompunerii lente a complexului cvasi-staționar ($ALR' \cdot NADPH$). În consecință dezvoltarea ulterioară a procesului pare să fie condiționată de creșterea stabilității enzimei prin imobilizare. Pe de altă parte, concentrația mică în mediul de reacție a NADPH-ului (forma activă) datorită afinității sale foarte mari față de ALR, indică în mod cert necesitatea unei continue regenerări *in-situ* a $NADP^+$ prin utilizarea unei reacții redox paralele.
- vi. Modelul cinetic poate fi utilizat și în situația folosirii de enzimă și NADPH co-imobilizate, necesitând însă re-estimarea parametrilor cinetici și includerea de termeni suplimentari de transfer de masă inter-fazic în ecuațiile de bilanț masic ale reactorului eterogen. În acest fel, modelul poate fi folosit și în etapa ulterioară de proiectare și operare optimă a procesului. Sub această formă, modelul poate fi util și studiului altor procese enzimactice de reducere catalizate de reductaze din aceeași familie a aldo-ceto-reductazelor.

Concluziile și contribuțiile personale ce rezultă din întreaga activitate de cercetare doctorală și prezentate în teza de doctorat demonstrează că obiectivul general al activității doctorale - studiul detaliat, experimental și teoretic, al caracteristicilor cinetice și performanțelor unui *proces alternativ de fabricare a fructozei* prin două reacții enzimactice succesive, de oxidare și de reducere, respectiv procedeul Cetus, a fost atins, rezultatele fiind deja publicate în reviste de specialitate de largă circulație internațională (*Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly*; *Revista de Chimie*), precum și în volumele unor conferințe internaționale de prestigiu publicate în numere speciale ale revistelor *New Biotechnology*, și *Romanian Journal of Biochemistry*.

CONTRIBUȚII ORIGINALE

În literatura de specialitate există puține studii cinetice sistematice privind procesul enzimatic Cetus de obținere a fructozei din glucoză, și practic nici o evaluare la nivel ingineresc a influenței condițiilor de reacție asupra eficienței procesului. În acest context, studiul de față se remarcă printr-un grad foarte mare de originalitate, pe mai multe planuri, abordând și soluționând în detaliu la nivel experimental și teoretic, o serie de aspecte esențiale legate de dinamica și performanța procesului.

În acest sens, contribuțiile originale aduse în cadrul acestei teze constau în următoarele:

- 1) Studiul experimental al oxidării enzimaticice a D-glucozei la ceto-glucoză, prin abordarea unor aspecte ne-investigate în literatura de specialitate, respectiv studiul experimental al influenței temperaturii (25 - 30°C) combinate cu influența raportului de enzime catalază / P2Ox (0 – 300 U U⁻¹) asupra vitezei reacției principale și a dezactivării piranoz-oxidazei.
- 2) Studiul experimental al celei de a doua etape a procesului Cetus, respectiv reducerea enzimatică a ceto-glucozei la fructoză în prezență de aldoz-reductază (ALR) și nicotin adenin dinucleotid fosfat (NADPH) ca și donor de electroni. Sunt abordate aspecte încă neinvestigate în literatură privind influența concentrației inițiale de substrat (15 - 35 mM kDG), enzimă (0.002 - 0.006 U mL⁻¹) și co-factor (6 - 35 mM) asupra vitezei reacției principale, a dezactivării ALR, și a formării complexului enzimă-NADPH.
- 3) Contribuțiile originale includ și unele aspecte legate de adaptarea metodelor analitice specifice, cu un grad mare de repetabilitate și reproductibilitate pentru dozarea glucozei rămase neoxidată, și a cetoglucozei în amestec cu glucoza sau cu fructoza, având în vedere faptul că acești trei compuși au comportamente chimice destul de asemănătoare. În acest sens, alegerea metodelor de dozare a acestor compuși a fost făcută prin încercări repetate astfel încât rezultatele analizelor să nu fie eronate (fals pozitive / fals negative). Pentru dozarea glucozei rămase neoxidată în amestecul de reacție ce conține și cetoglucoză a fost preferată o reacție enzimatică specifică cu glucozoxidaza (glucoza fiind substratul specific pentru această enzimă), iar pentru cetoglucoză s-a optat să se adapteze o reacție de reducere cu clorura de 2,3,5-trifeniltetrazolium (cele două zaharuri având viteze de reacție diferite).
- 4) Propunerea unei scheme de reacție pentru procesul de oxidare a D-glucozei în prezență de P2Ox și catalază, și a unui model cinetic original, identificat în raport cu datele experimentale. Modelul teoretic consideră o cinetică de tip Ping-Pong-Bi-Bi pentru reacția principală de oxidare, o dezactivare a P2Ox de ordin unu în raport cu apa oxigenată, și o cinetică de tip Yano-Koya pentru descompunerea apei oxigenate de către catalază.
- 5) Pe baza modelului cinetic al oxidării D-glucozei se fac primele evaluări globale de eficiență a procesului, necesare în calcule ingineresti ulterioare de ridicare la scară și proiectare a instalației industriale. Astfel, se pune în evidență efectul multiplu al prezenței catalazei în mediul de reacție, cât și al variației temperaturii, asupra reacțiilor din proces, respectiv:
 - Pe de o parte prezența catalazei contribuie la încetinirea procesului de dezactivare a P2Ox și la prelungirea duratei de activitate a oxidazei;
 - Pe de altă parte, catalaza conduce la o inhibiție a reacției principale de oxidare, într-un grad cu atât mai pronunțat cu cât este în cantitate mai mare;
 - Temperatura are un efect complex în ce privește activitatea celor două enzime care se influențează prin intermediarii de reacție; combinația acestora duce la o dezactivare mai lentă a P2Ox la temperatura de 30°C față de 25°C când, paradoxal, catalaza este mai activă.

- Deși conversia și selectivitatea procesului sunt foarte mari (peste 99.5%), din punct de vedere al aspectului ingineresc eficiența procesului este aici dictată de modularea vitezei de dezactivare a oxidazei prin intermediul adăției de catalază și al temperaturii, ceea ce face ca durata de reacție și consumul de enzimă să fie principalii indicatori de eficiență.
- Prin simulări repetate cu ajutorul modelului cinetic elaborat s-au putut prezice condițiile optime de operare ale reacției de oxidare, respectiv temperatura de 30°C, pH = 6.5, și un raport inițial Catalază / P2Ox de ca. 100 U U⁻¹.
- Determinări experimentale proprii, în absența reacției, a coeficientului total de transfer masic gaz-lichid al oxigenului în bioreactor, precum și corelarea acestuia cu gradul de amestecare și de aerare a pus în evidență necesitatea intensificării oxigenării masei de reacție în scopul evitării ca aceasta să devină etapa limitativă a întregului proces.

6) Propunerea unei scheme complexe de reacție a procesului de reducere a ceto-D-glucozei la fructoză în prezență de ALR și nicotin adenin dinucleotid fosfat (NADPH), la 25°C și pH = 7, precum și a unui model cinetic original, identificat în raport cu datele experimentale. Modelul teoretic consideră o schemă de reacții succesive reversibile de tip Bi-Bi, similare cu cele propuse în literatură pentru cazul altor reacții de reducere catalizate de aldo-ceto-reductaze, schema completată și cu reacții de cuplare reversibilă a enzimei de co-factor și de dezactivare a ALR.

7) Pe baza modelului cinetic propus pentru reducerea ceto-glucozei la fructoză se fac primele evaluări ale etapei lente a procesului, a vitezei de dezactivare a enzimei și a tăriei afinității NADPH de ALR, elemente esențiale de eficiență globală a procesului necesare în calcule de proiectare ingineresti ulterioare. Astfel, se pun în evidență mai multe caracteristici cinetice ale lanțului de reacții după cum urmează:

- Se confirmă prin calcul informațiile de literatură care indică faptul că eliberarea NADP⁺ printr-o rearanjare conformațională secundară din complexul ALR•NADP⁺ reprezintă etapa limitativă de viteză.
- Se demonstrează afinitatea foarte mare a NADPH de enzima ALR, ceea ce duce la formarea reversibilă a unui complex inițial (ALR*HADPH), cvasi-stabil, care include cea mai mare parte a NADPH. Prezența însă a substratului în mediul de reacție tinde continuu să descompună complexul și să pună în libertate în mod continuu enzima liberă și NADPH pe durate lungi de reacție (peste 1500 minute).
- Se dovedește experimental și prin simulare că inactivarea ireversibilă a ALR are loc foarte rapid (timpul de înjumătățire de ca. 10 min), compensată parțial de eliberarea continuă a ALR în forma activă din complexul format inițial cu cofactorul NADPH.
- Analiza cinetică sugerează că principalele modalități de eficientizare a procesului reductiv ce trebuie abordate în studiile viitoare trebuie să urmărească pe de o parte stabilizarea enzimei prin imobilizare, iar pe de altă parte creșterea nivelului de NADPH activ în mediu printr-o regenerare continuă *in-situ* a NADP⁺ epuizat folosind o reacție redox paralelă.

În final, trebuie subliniat că toate contribuțiile originale ale tezei au constituit deja obiectul a patru publicații în reviste cu factor de impact mediu și mare, contribuind astfel la demersul științific de clarificare a mecanismului și dinamicii procesului de transformare enzimatică a glucozei la fructoză, cu implicații majore în ce privește analizele preliminare și ulterioare de evaluare a eficienței procedurii Cetus de obținere a fructozei.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Artolozaga, M.J., Kubatovi, E., Volc, J. and Kalisz, H.M., Pyranose 2-oxidase from *Phanerochaete chrysosporii* - further biochemical characterisation, (1997) *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 508-514.
2. Attwood, M.A., Doughty, C.C., Purification and properties of calf liver aldose reductase. (1974) *Biochim Biophys Acta*, 370, 358-368.
3. Bastian, S., Rekowski, M.J., Witte, K., Heckmann-Pohl, D.M., Giffhorn, F., Engineering of pyranose 2-oxidase from *Peniophora gigantea* towards improved thermostability and catalytic efficiency, (2005), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 654-663.
4. Bergmeyer, H.U. (Ed.), Methods of enzymatic analysis (3rd Edition), Vol. 3, Enzymes 1: Oxidoreductases, transferases (1983) VCH Publ., Weinheim, pp. 274-277.
5. Blakeley, M.P., Ruiz, F., Cachau, R., Hazemann, I., Meilleur, F., Mitschler, A., Ginell, S., Afonine, P., Ventura, O.N., Cousido-Siah, A., Haertlein, M., Joachimiak, A., Myles, D., Podjarny, A., Quantum model of catalysis based on a mobile proton revealed by subatomic x-ray and neutron diffraction studies of h-aldose reductases, (2008), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105, 1844-1848.
6. BRENDA Enzyme database, TU Braunschweig (Germany), January 2013 release, <http://www.brenda-enzymes.info/>
7. Cameron, N.E., Cotter, M.A., Dines, K.C. and Maxfield, E.K., Pharmacological manipulation of vascular endothelium function in non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats: effects on nerve conduction, hypoxic resistance and endoneurial capillarization, (1993), *Diabetologia*, 36, 516-522.
8. Cascaval, D., Oniscu, C., Galaction, A.I., Inginerie biochimică și biotehnologie, (2004), *InterGlobal*, Iași, vol. 3.
9. Chihiro Yabe-Nishimura, Aldose reductase in glucose toxicity: A potential target for the prevention of diabetic complications, (1998), *Pharmacological Reviews*, 50 (1):21 – 33
10. Danneel, H.J., Rossner, E., Zeeck, A., Giffhorn, F., Purification and characterization of a pyranose oxidase from the basidiomycete *Peniophora gigantea* and chemical analyses of its reaction products, (1993) *Eur. J. Biochem.*, 214, 795 – 802.
11. Daş-Evcimen, N., Yildirim, Ö., and Suzen S., Relationship between aldose reductase and superoxide dismutase inhibition capacities of indole-based analogs of melatonin derivatives, (2009), *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 61 (4), 675-681
12. De Luca, P., Lepore, M., Portaccio, M., Esposito, R., Rossi, S., Bencivenga, U., Mita, D.G., Glucose determination by means of steady-state and time-course UV fluorescence in free or immobilized Glucose Oxidase, (2007), *Sensors*, 7, pp. 2612-2625
13. Diaz, E.G., Catana, R., Ferreira, B.S., Luque, S., Fernandes, P. & Cabral, J.M.S., Towards the development of a membrane reactor for enzymatic inulin hydrolysis, (2006), *Journal of Membrane Science*, 273, 152-158.
14. Dumitru, I.F., Iordachescu, D., Introducere în enzimologie, (1983) Ed. Medicală.
15. Ene, M.D., Jipa, I., Maria, G., Stoica-Guzun, A., Stroescu, M., Quick procedure to evaluate the oxygen mass transfer resistance in aerated laboratory-scale bioreactors, (2011), *Revista de Chimie* 62(2), 227-232.
16. Ene, M.D., Maria, G., Temperature decrease (30-25°C) influence on bi-enzymatic kinetics of D-glucose oxidation, (2012), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 81, 19-24
17. Fernandes, S., Geueke, B., Delgado, O., Coleman, J., Hatti-Kaul, R., β -galactosidase from a cold-adapted bacterium: purification, characterisation, and application for lactose hydrolysis., (2002), *Appl. Microbiol. Biotechnolog.*, 58, 313-321.
18. Freimund, S., Huwig, A., Giffhorn, F., Köpper, S., Rare keto-aldoses from enzymatic oxidation: substrates and oxidation products of pyranose 2-oxidase, (1998), *Chem. Eur. J.*, 4, 2442-2455.
19. Galaction, A.I., Cascaval, D., Turnea, M., Folescu, E., (2005), Enhancement of oxygen mass transfer in stirred bioreactors using oxygen-vectors 2, *Propionibacterium shermanii* broths, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 27, 263-271.

20. Giffhorn, F., Fungal pyranose oxidases: occurrence, properties and biotechnical applications in carbohydrate chemistry, (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 727–740.
21. Ghose, T.K., Fiechter, A. and Blakebrough, N., (Eds.) (1972). *Advances in biochemical engineering*. Berlin: Springer-Verlag, vol. 2.
22. Ghose, T.K., Fiechter, A. & Blakebrough, N. (Eds.) (1978). *Advances in biochemical engineering*. Berlin: Springer-Verlag, vol. 10.
23. Hallberg, B.M., Leitner C., Haltrich, D., Divne, C.: Crystal structure of the 270 kDa homotetrameric lignin-degrading enzyme pyranose 2-oxidase. (2004), *J Mol Biol*, 341:781-796.
24. Hassler, B.L., Dennis, M., Laivenieks, M., Zeikus, J.G., Worden, R.M., Mutation of Tyr-218 to Phe in *Thermoanaerobacter ethanolicus* secondary alcohol dehydrogenase: Effects on bioelectronic interface performance, (2007), *Appl Biochem Biotechnol* 143, 1–15.
25. Hernandez, K., Fernandez-Lafuente, R., Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance, (2011), *Enzyme and Microbial Technology*, 48:107-122.
26. Illanes, A., Zúñiga, M. E., Contreras, S., and Guerrero, A., Reactor design 994 for the enzymatic isomerization of glucose to fructose, (1992), *Bioprocess and 995 Biosystems Engineering*, 7, 996 199–204
27. Illanes, A., Enzyme biocatalysis, (2008), *Springer Verlag*, New York.
28. Iordăchescu D., Analize biochimice speciale, (1991), *Ed. Universitatea București*.
29. Karmali, A., Coelho, J., Bioconversion of d-glucose into d-glucosone by immobilized glucose 2-oxidase from *Coriolus versicolor* at moderate pressures, (2011), *Process Biochemistry*, 46, 168–173.
30. Kern, M., Haltrich, D., Nidetzky, B., and Kulbe, K.D., Induction of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Candida reidii* CBS 4435., (1997), *FEMS Microbiology Letters*. 149:31-37.
31. Leitner, C., Neuhauser, W., Volc, J., Kulbe, K.D., Nidetzky, B., Haltrich, D., The cetus process revisited: a novel enzymatic alternative for the production of aldose-free D-fructose, (1998), *Biocatalysis and Biotransformation*, 16, 365-382.
32. Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. (Eds.), Industrial biotransformations, (2006), *Weinheim: Wiley-VCH*.
33. Liu, T.-N., Wolf, E. B., Geigert, J., Neideman, S. L., Chin, J. D. and Hirano, D. S., Convenient laboratory procedure for producing solid D-arabinose-2-ulose (D-glucosone), (1983), *Carbohydr. Res.*, 113:151–157.
34. Maria, G., Ene, M.D., Kinetics studies on enzymatic oxidation of D-glucose with pyranose 2-oxidase in the presence of catalase, *15th European Congress on Biotechnology*, Istanbul (Turkey), 23-26 September, 2012. <http://www.ecb15.org/>
35. Maria, G., Ene, M.D., Modelling enzymatic reduction of 2-keto-D-glucose by suspended aldose reductase, (2013) *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly*, 27(3), (in press).
36. Maria, G., Enzymatic reactor selection and derivation of the optimal operation policy by using a model-based modular simulation platform, (2012), *Computers & Chemical Engineering* 36(1), 325–341.
37. Maria, G., Ene, M.D., Jipa, I., Modelling enzymatic oxidation of D-glucose with pyranose 2-oxidase in the presence of catalase, (2012), *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 74(3-4), 209-218 DOI: 10.1016/j.molcatb.2011.10.007.
38. Maria, G., Model-based heuristic optimised operating policies for D-glucose oxidation in a batch reactor with pulsate addition of enzyme, (2007), *Computers & Chemical Engineering*, 31, 1231-1241.
39. Neelakantan S., Mohanty A. K., Kaushik J. K., SPECIAL SECTION: FERMENTATION - SCIENCE & TECHNOLOGY - Production and use of microbial enzymes for dairy processing: A review, (1999), *Current science*. 77(1): 143.
40. Neuhauser, W., Haltrich, D., Kulbe, K.D. and Nidetzky, B., NAD(P)H-dependent aldose reductase from the xylose-assimilating yeast *Candida tenuis*., (1997), *Biochemical Journal*, 326, 683-692.
41. Negm, F.B., Purification and Properties of an NADPH-Aldose Reductase (Aldehyde Reductase) from *Euonymus japonica* Leaves, (1986), *Plant Physiol.*, 80, 972-977

Anexe

Articole publicate în tematica de cercetare:

1. Ene, M.D., Jipa, I., Maria, G., Stoica-Guzun, A., Stroescu, M., Quick procedure to evaluate the oxygen mass transfer resistance in aerated laboratory-scale bioreactors, *Revista de Chimie* 62(2), 227-232 (2011). SRI=0.1257; FI= 0.693
2. Maria, G., Ene, M.D., Jipa, I., Modelling enzymatic oxidation of D-glucose with pyranose 2-oxidase in the presence of catalase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 74(3-4), 209-218 (2012). DOI: 10.1016/j.molcatb.2011.10.007. SRI = 0.92, IF = 2.735
3. Ene, M.D., Maria, G., Temperature decrease (30-25°C) influence on bi-enzymatic kinetics of D-glucose oxidation, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 81(9), 19-24 (2012). DOI: 10.1016/j.molcatb.2012.05.001. SRI = 0.92, IF = 2.735
4. Maria, G., Ene, M.D., Modelling enzymatic reduction of 2-keto-D-glucose by suspended aldose reductase, *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly*, 27(3), 2013 (in press). SRI=0.44, IF = 0.689
5. Ene, M.D., Maria, G., The influence of temperature on bioconversion of D-glucose into 2-keto-D-glucose by Pyranose oxidase, *U.P.B. Sci. Bull., Series B - Chemie*, 75, accepted (2013). <http://www.scientificbulletin.upb.ro/>. IF=0(Scopus), ISSN= 1454-2331

Total SRI = 2.41

Total IF = 6.852

Conferințe susținute public în tematica de cercetare:

1. Maria, G., Ene, M.D., Kinetics studies on enzymatic oxidation of D-glucose with pyranose 2-oxidase in the presence of catalase, *15th European Congress on Biotechnology*, Istanbul (Turkey), 23-26 September, 2012. <http://www.ecb15.org/>. Poster 1.5.16. Published in: Maria, G., Ene, M.D., Kinetics studies on enzymatic oxidation of D-glucose with pyranose 2-oxidase in the presence of catalase, *New Biotechnology*, 29S, 586 (2012). DOI:10.1016/j.nbt.2012.08.239 (doar Abstract in Conferinta), SRI = 0.70, IF = 2.756
2. Ene, M.D., Maria, G., Catalase addition and temperature influence on the enzymatic oxidation of D-glucose, *International Conference "Centenary of Education in Chemical Engineering"*, November 28-30, 2012, Iasi, Romania. <http://www.ch.tuiasi.ro/CNIC2012/index.html>
3. Ene, M.D., Maria, G., Bioconversion of 2-keto-D-glucose into D-fructose by aldose reductase, *The Annual International Conference of the Romanian Society of Biochemistry & Molecular Biology (RSBMB)*, Bucharest, September 13-14th, 2012. Published in: *Romanian Journal of Biochemistry*, 49 (Suppl.), 60-61 (2012). (Revista B+)