Titlul proiectului: “Creșterea atractivității și performantei programelor de formare doctorală şi postdoctorală pentru cercetători în științe inginerești – ATRACTING; POSDRU/159/1.5/S/137070

**Universitatea Politehnica Timișoara**

**Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului**

**Ing. Anamaria TODEA**

**SINTEZA ENZIMATICĂ ȘI CARACTERIZAREA UNOR NOI BIOMATERIALE POLIESTERICE**

**Rezumatul tezei de doctorat**

**Conducător ştiinţific:**

Prof.dr.ing. **Francisc PÉTER**

**Timișoara**

**2015**

**Cuprins**

[**1. Studiu de literatură** 1](#_Toc414808630)

[1.1. Importanța temei 1](#_Toc414808631)

[1.2. Chimia verde a polimerilor 2](#_Toc414808632)

[1.3. Clasificarea biopolimerilor 4](#_Toc414808633)

[1.4. Sinteza poliesterilor catalizată de lipaze 9](#_Toc414808636)

[1.5. Hidroxi-acizi şi estolide 28](#_Toc414808642)

[1.6. Biomateriale pe bază de uleiuri vegetale şi aplicaţiile lor 36](#_Toc414808644)

[**2. Contribuții originale** 38](#_Toc414808645)

[**2.1. Obiectivele tezei de doctorat** 38](#_Toc414808646)

[**2.2. Imobilizarea oleat hidratazei din *Elizabethkingia meningoseptica*** 39](#_Toc414808647)

[**2.3. Biotransformări ale hidroxi-acizilor grași cu lipaze libere și imobilizate** 54](#_Toc414808653)

[**2.4. Sinteza și caracterizarea copolimerilor ε-caprolactonei cu hidroxi-acizi grași catalizată de lipaze** 71](#_Toc414808662)

[**2.5. Sinteza și caracterizarea copolimerilor ε-caprolactonei cu δ-gluconolactonă catalizată de lipaze**  77](#_Toc414808668)

[**2.6. Optimizare reacției de copolimerizare a β-butirolactonei cu GL și caracterizarea produșilor de reacție**  91](#_Toc414808676)

[**2.7. Biotransformarea trioleinei în oligomeri nesaturați prin metoda „one-pot” cu un sistem enzimatic combinat de oleat hidratază și lipază** 99](#_Toc414808680)

[**3. Partea experimentală** 105](#_Toc414808683)

[3.1. Materiale 105](#_Toc414808684)

[3.2. Purificarea oleat hidratazei 105](#_Toc414808685)

[3.3. Electroforeza proteinelor pe gel de poliacrilamidă 106](#_Toc414808688)

[3.4. Determinarea conținutului de proteine 107](#_Toc414808689)

[3.5. Determinarea activității oleat hidratazei 108](#_Toc414808692)

[3.6. Metode de imobilizare a oleat hidratazei 108](#_Toc414808693)

[3.7. Influența pH-ului asupra activității oleat hidratazei 111](#_Toc414808701)

[3.8. Efectul temperaturii asupra activității enzimei 111](#_Toc414808702)

[3.9. Studiul reutilizării biocatalizatorului 111](#_Toc414808703)

[3.10. Influența aditivului asupra stabilității de depozitare 111](#_Toc414808704)

[3.11. Caracterizarea morfologică a oleat hidratazei imobilizate 112](#_Toc414808705)

[3.12. Analiza acidului 10HSA și acidului oleic prin HPLC 112](#_Toc414808706)

[3.13. Sinteza acidului 10-hidroxistearic 113](#_Toc414808707)

[3.14. Analiza hidroxi-acizilor prin GC-MS 113](#_Toc414808708)

[3.15. Determinarea purității enantiomerice a 10HSA 113](#_Toc414808709)

[3.16. Analiza FT-IR 114](#_Toc414808710)

[3.17. Analiza RMN 114](#_Toc414808711)

[3.18. Determinarea activității hidrolitice a lipazelor utilizând *p*-nitro-fenil palmitat 114](#_Toc414808712)

[3.19. Sinteza biocatalitică a estolidelor 116](#_Toc414808715)

[3.20. Analiza MALDI-TOF MS 116](#_Toc414808716)

[3.21. Sinteza enzimatică a copolimerilor hidroxi-acizilor grași cu ε-caprolactonă 117](#_Toc414808719)

[3.22. Polimerizarea în solvenţi organici 117](#_Toc414808720)

[3.23. Polimerizarea fără solvent organic 117](#_Toc414808721)

[3.24. Pre-echilibrare la diferite valori ale activității apei 117](#_Toc414808722)

[3.25. Imobilizarea lipazei prin entrapare în matrici de sol-gel 118](#_Toc414808723)

[3.26. Pre-solubilizarea δ-gluconolactonei 118](#_Toc414808724)

[3.27. Elaborarea unui program experimental factorial şi evaluarea datelor 118](#_Toc414808725)

[3.28. Analiza termică 118](#_Toc414808726)

[3.29. Studiul reutilizării biocatalizatorului în reacțiile de copolimerizare a ε-caprolactonei cu δ-gluconolactonă 119](#_Toc414808729)

[3.30. Sinteza enzimatică a estolidelor utilizând o combinație de lipază și hidratază în sistem „one-pot” 119](#_Toc414808730)

[3.31. Studiul influenței pH-ului asupra formării estolidelor acidului 10HSA 119](#_Toc414808731)

[**4. Concluzii finale și contribuții originale** 120](#_Toc414808732)

[**5. Bibliografie** 127](#_Toc414808733)

[**ANEXE** 141](#_Toc414808734)

[**LISTA DE LUCRĂRI** 168](#_Toc414808735)

 Teza de doctorat este structurată în 5 capitole: capitolul 1 (Studiu de literatură), capitolul 2 (Contribuții originale), capitolul 3 (detalii parte experimentală), capitolul 4 (Concluzii finale) și capitolul 5 în care sunt încadrate sursele bibliografice. Capitolul 2 include 7 subcapitole, în primul fiind enunțate sursele principalele obiective ale tezei de doctorat și anume:

1. Creșterea stabilității oleat hidratazei prin diferite tehnici de imobilizare

2. Sinteza enzimatică și caracterizarea poliesterilor derivați de hidroxi-acizi grași (estolide)

3. Sinteza și caracterizarea copolimerilor caprolactonei cu hidroxi-acizi grași catalizată de lipaze (ECL-HFA)

4. Sinteza și caracterizarea copolimerilor ε-caprolactonei/β-butirolactonei cu δ-gluconolactonă catalizată de lipaze (ECL-GLC, BL-GLC)

5. Biotransformarea trioleinei în oligomeri nesaturați prin metoda „one-pot” utilizând utilizând un sistem enzimatic combinat de oleat hidratază și lipază.

În capitolul 2.2. sunt prezentate rezultatele obținute în urma studiilor de stabilizare a oleat hidratazei din *Elizabethkingia meningoseptica* utilizând aditivi de tipul poliolilor și zaharurilor (sorbitol, alcool polivinilic, polietilen glicol, trehaloză și maltodextrină) precum și rezultatele obținute prin imobilizare. Enzima a fost în prealabil exprimată, purificată și caracterizată în termeni de pH, temperatura, concentrație de NaCl în vederea determinării condțiilor optime de reacție. În studiile de imobilizare au fost testate 6 metode (adsorbție, afinitate, înrețelare, legare ionică, legare covalentă și entrapare) utilizând 13 suporturi funcționalizate sau nefuncționalizate, disponibile comercial sau obținute în laborator. Dintre metodele și suporturile testate cele mai importante s-au obținut prin legare covalentă aând ca suport macrocompozitele magnetice de chitosan. Biocatalizatorul cel mai eficient a fost caraterizat în detaliu, fiind determinate conțiile optime de reacție (pH, temperatură) dar și capacitatea de utilizare în mai multe cicluri de reacție. Pe baza rezultatelor experimentale s-a observat că activitatea recuperată după 5 cicluri de reacție a fost mai mare de 70%, o valoare bună dacă se ia în considerare stabilitatea redusă a OHazei native. Distribuția uniformă enzimei pe suportul magnetic de chitosan a fost pusă în evidență prin marcarea OHazei cu un derivat de fluoresceină urmată de colectarea imaginilor de fluorescență.

În capitolul 2.3. sunt prezentate rezultatele studiilor experimentale studiul sintezei unor poliesteri utilizând ca monomeri 4 hidroxi-acizi grași (acidul 10-hidroxistearic (acid 10HSA), acidul 12-hidroxistearic, acidul ricinoleic și acidul 16-hidroxistearic) și lipaze ca și biocatalizatori. În prima partea a fost sintetizat pe cale enzimatică acidul 10-hidroxi-stearic deoarece acest substrat nu este disponibil comercial. Caracterizarea produsului de reacție s-a realizat prin spectroscopie FT-IR, GC-MS, și RMN, tehnici care au confirmat structura compusului și puritatea ridicată. Puritatea enatiomerică a fost determinată prin reacție de derivatizare completată de analiza RMN care a confirmat prezența unui singur enantiomer. Acest compus dar și ceilalți trei hidroxiacizi au fost utilizați ca și substraturi pt 15 lipaze native. COnversiile au fost determinate pe baza analizelor GC-MS iar identificarea produșilor de reacție s-a realizat pe baza spectrelor MALDI-TOF. Dintre lipazele testate, lipazele cele mai eficiente pentru sinteza estolidelor s-au dovedit cele din surse microbiene precum *Pseudomonas fluorescens* și *Pseudomonas* *stutzeri*. Cercetările experimentale au fost continuate cu studiul influenței mediul de reacție, a temepraturii și a concentrației de substrat. Au de asemenea testate și 5 enzime imobilizate disponibile comercial iar dintrea acestea lipaze imobilizată prin înrețelare (CLEA) din *P. stutzeri* și-a dovedit superioritatea. Produșii de reacție au fost caracterizați și prin spectroscopie RMN și analiza termică TG, DSC în vederea evaluării stabilităţii termice a produsului pe diferite intervale de temperatură. Produșii de reacție sintetizați prezintă aplicații potențiale, în special datorită biodegradabilității lor, în industria cosmetică, alimentară şi în sinteza unor produse farmaceutice.

În capitolul 2.4 sunt prezentate rezultatele studiilor experimentale cu privire la sintezei unor copolimeri ai hidroxi-acizilor grași prezentați în capitolul 2.3. cu monomeri de tipul lactonelor, și anume, ε-caprolactona, în vederea îmbunătățirii proprietăţi fizice atât a estolidelor cât și a poli-(ε)-caprolactonei. Pentru începu s-a realizat o selecție a enzimei utilizând lipaze imobilizate comerciale care conduc la conversii, selectivitate şi grad de co-polimerizare mari. Produşii de reacţie au fost caracterizaţi prin tehnici MALDI-TOF MS, RMN, termogravimetrie și DSC. COnform rezultatelor stabilitatea termică a copolimerilor a fost superioară estolidelor fiind dovedită efeciența acestei reacții. Rezultatele studiului utilizării biocatalizatorilor în mai multe cicluri de reacție confirmă eficiența liupazelor în reacții de poliesterificare.

În cadrul capitolului 2.5. au fost incluse rezulatele studiilor experimentale obținute în sinteza de copolimeri ai ε-caprolactonei cu δ-gluconolactonă catalizată de lipaze. Studiile din acest capitol au vizat optimizarea reacției prin testarea a 8 solvenți organici sau combunații de solvent ca mediu de reacșie care să permită solubilizarea derizaturlui de zahar dar să nu afecteze activitatea lipazei. Un alt parametru studiat a fost conținutul de apă, în acest sens s-a realizat o pre-echilibrare a materiilor prime în soluții de săruri saturate cu valori ale activității apei diferite. Cele mai mari valori ale maselor moleculare medii s-au obținut în cazul în care pre-echilibrarea s-a realizat cu soluţie saturată de sulfat de sodiu, la valori ridicate ale activităţii apei (αw=0,95). Un alt studiu s-a axat pe selecția biocatalizatorului, fiind testate 5 lipaze iar cea mai eficientă s-a dovedit lipaza din *Candida antarctica* B imobilizată în matrici de sol gel și lipaza comercială LIpozyme TL. Produşii de reacție au fost analizați prin tehnici spectrale MALDI-TOF MS, RMN dar și prin analiză termică de tipul termogravimetriei și DSC. În finalul capitolului, s-a efectuat un program experimental factorial de tip Box-Behken pe 3 niveluri, folosind 3 variabile independente (temperatura, cantitatea de enzimă utilizată şi raportul molar al co-monomerilor) fiind urmărit efectul acestora asupra masei moleculare medii gravimetrice a copolimerului. Acest program experimental a permis elaborarea unui model de corelaţie de ordin 2, care a permis evidenţierea factorilor cu influenţa cea mai mare asupra procesului și a efectelor combinate ale variabilelor considerate.

Capitolul 2.7 include rezultatele experimentale asupra optimizării reacției de copolimerizare a β-butirolactonei cu δ-glucolactonă. Optimizarea s-a realizat pe baza unui program experimental factorial, Box-Behnken considerând 3 variabile independente, respectiv temperatura, cantitatea de enzimă utilizată, raportul molar al co-monomerilor, şi urmărind efectul acestora asupra masei moleculare medii gravimetrice a copolimerului. Utilizând un model de corelaţie de ordin doi s-au determinat parametrii optimi ai reacției. Caracterizarea produșilor de reacție s-a realizat prin spectroscopie FT-IR, MALDI-TOF MS, RMN care au confirmat prezența speciilor de tip copolimer în amestecurile de reacție.

În Capitolul 2.7. a fost propus un sistem de reacții de tip cascadă care vizează sinteza estolidelor pornind de la trigliceride utilizând două enzime, o lipază și oleat hidartaza. Enzimele considerate catalizează i) hidroliza trigliceridelor (lipaza) ii) transformarea acizilor grași în hidroxi-acizii corespunzători (oleat hidrataza) care iii) reacţia de poliesterificare, catalizată de lipază. Pentru a favoriza reacția din etapa iii) a fost studiată cinetica reacției ii) la două valori ale pH-ului, valorile optime ale oleat hidratazei (6.5 și 8). Tot în avcest capitol a fost studiat și efectul pH-ului și a temepraturii în reacția iii) asupra formării și a gradului de poliesterificare a estolidelor, formarea acestora fiind favorizată la pH acid și temepratură de 60ºC.

Capitolul 3 include materialele utilizate în cadrul experimentelor, metodele de lucru utilizate și echipamentele utilizate în fiecare etapă a studiilor.

În capitolul 4 sunt prezentate concluziile finale pentru fiecare subcapitol și rezulatele științifice noi. Dintre acestea cele mai importante sunt următoarele:

1. Demonstrarea creşterii stabilităţii oleat hidratazei pe un domeniu mai larg de pH și temperatură în urma imobilizării.

2. Realizarea unei stabilităţi operaţionale foarte bune, regăsindu-se 75% din activitatea enzimei imobilizate după 6 cicluri de reacție.

3. Demonstrarea posibilităţii de a utiliza acidul 10-hidroxistearic, acidul 12-hidroxistearic, acidul 16-hidroxihexadecanoic și acidul ricinoleic ca substraturi pentru lipaze pentru sinteza unor estolide noi şi confirmarea structurii acestora pe baza spectrelor MALDI-TOF, RMN și FT-IR.

4. Stabilirea influenţei poziției grupării OH, gradului de nesaturare a substratului și sursei enzimei asupra formării produșilor de reacție.

5. Stabilirea condiţiilor în care reacţia este orientată spre elongare vs. lactonizare în funcţie de temperatură, concentrația de substrat și valoarea log P a solventului.

6. Stabilirea selectivităţii superioare a lipazelor față de co-substratul C16: OH(16) comparativ cu ceilalţi hidroxi-acizi studiaţi, demonstrată de valorile maselor moleculare medii și de tipurile de produşi formați.

7. Utilizarea analizei termice pentru determinarea stabilităţii noilor copolimeri, care s-a situat la un nivel mai ridicat față de estolidele corespunzătoare şi mai redus față de homopolimerul (poli)ε-caprolactonă.

8. Realizarea în premieră a sintezei copolimerilor prin deschiderea de ciclu a lactonelor ε-caprolactonă și δ-gluconolactonă catalizată de lipaze şi optimizarea procesului folosind un model experimental factorial și evaluarea statistică.

9. Elaborarea unui proces multienzimatic în sistem „one-pot” pentru a sintetiza mono-estolida acidului oleic cu acid 10-hidroxistearic, utilizând trioleină ca substrat.

1. Lucrări ştiinţifice publicate tematica de cercetare a tezei

1. A. Todea, A. Hiseni, L.G. Otten, I. Arends., F. Peter, C.G. Boeriu, Increase of stability of oleate hydratase by appropriate immobilization technique and conditions, Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic- acceptată spre publicare, 2015, (FI 2.745)

2. A. Todea, L.G. Otten, A.E. Frissen, I. Arends, F. Peter, Carmen Boeriu,Selectivity of lipases for estolides synthesis, A. Todea, L.G. Otten, A.E. Frissen, I. Arends, F. Peter, Carmen Boeriu, Pure and Applied Chemistry, 2015, 87(1), pp. 51-58, (FI: 3.112);

3. A. Todea, E. Biro, V. Badea, C. Paul, A. Cimporescu, L. Nagy, S. Keki, G. Bandur, C. Boeriu, F. Peter, Optimization of enzymatic ring-opening copolymerizations involving δ-gluconolactone as monomer by experimental design, Pure and Applied Chemistry, 2014, 86(11), pp. 1781-1792, (FI: 3.112);

4. A. Todea, V. Badea, L. Nagy, S. Kéki, C. G. Boeriu, F. Péter, Biocatalytic synthesis of δ-gluconolactone and ε-caprolactone copolymers, Acta Biochimica Polonica, 2014, 61 (2), pp. 205–210, (FI: 1.389);

5. S. Kakasi-Zsurka, A. Todea, A. But, C. Paul, C. G. Boeriu, C. Davidescu, L. Nagy, A. Kuki, S. Keki, F. Péter, Biocatalytic synthesis of new copolymers from 3-hydroxybutyric acid and a carbohydrate lactone Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 71, pp. 22-28, 2011 (FI 2.745)

6. S. Kakasi-Zsurka, A. Todea, A. But, C. Paul, C. Boeriu, L. Nagy, F. Péter, Novel enzymatic synthesis of 3-hydroxybutyric acid oligomers with inserted lactobionic acid moieties, Revista de Chimie, 62(10), pp. 958-963, 2011 (FI 0.677)

2. Lucrări ştiinţifice publicate în volumele unor manifestări ştiinţifice

1. A. Todea, A. Hiseni, L.G. Otten, I.W.C.E. Arends, C.G. Boeriu Preparation and properties of immobilised oleate hydratase Gordon Conference on Biocatalysis, Smithfield, USA, 6-11 Iulie 2014

2. A. Todea, A. Hiseni, L.G. Otten, I.W.C.E. Arends, F. Peter, C.G. Boeriu, Increasing operational stability of oleate hydratase by immobilization, 10th International Conference on Protein Stabilisation 7-9 Mai 2014, Stresa (Lake Maggiore, Italia, Book of Abstracts Pagina 31.

3. A. Todea, L.G. Otten, G. Frissen, I. Arends, F. Peter, C. Boeriu, Optimization of the synthesis of estolides from hydroxy fatty acids using free and immobilized lipases, 7th International Congerss On Biocatalysis, 31 August-4 Septembrie 2014, Hamburg, Germania, ISBN: 978-3-941492-76-9, P3-102, pagina 260.

4. A. Todea, G. Frissen, L. Otten, I. Arends, F. Peter, C. Boeriu, Hydroxy fatty acids selectivity of lipases for estolides synthesis, 15th International Conference “Polymers and Organic Chemistry”, June 10-13, Timisoara, Romania, ISBN: 978-606-554-841-1, OP 16, pagina 40.

5. A. Todea, V. Badea, A. Cimporescu, L. Nagy, S. Keki, C. Paul, C. Boeriu, F. Peter, Synthesis of δ-gluconolactone-based biopolymers catalyzed by lipases, 15th International Conference “Polymers and Organic Chemistry”, 10-13 Iulie, Timisoara, Romania, ISBN: 978-606-554-841-1, OP 15, pagina 39.

6. A. Todea, L. Nagy, V. Badea, S. Kéki, F. Peter, Biocatalytic synthesis of gluconolactone and ε-caprolactone copolymers, 5th Central European Congress of Life Sciences, EUROBIOTECH 2013, 8th- 11th Octombrie 2013, Krakow, Poland, ISSN:0001-527X, P4.2, pagina 29.

7. A. Todea, A. Hiseni, L. G. Otten, I.W.C.E. Arends, C. G. Boeriu, Preparation and properties of immobilized oleate hydratase, BIOTRANS 2013, 21-25 Iulie 2013, Manchester, UK, rezumat 254, pagina 169.

8. A. Todea, L. Nagy, V. Badea, F. Peter, Enzymatic synthesis and characterization of new copolyesters based on ɛ-caprolactone and a carbohydrate lactone , 15th European Congress on Biotehnology, 23–26 Septembrie 2012 Istanbul-Turcia, New Biotechnology ISSN:1871-6784, 29S, pagina S53.