

SINTEZA ENZIMATICĂ ȘI CARACTERIZAREA UNOR NOI BIOMATERIALE POLIESTERICE

Teză destinată obținerii
titlului științific de doctor inginer
la
Universitatea Politehnica Timișoara
în domeniul INGINERIE CHIMICĂ
de către

Ing. Anamaria Todea

Conducător științific: prof.univ.dr.ing Francisc Peter
Referenți științifici: prof.univ.dr. Carmen Gabriela Boeriu
prof.univ.dr.ing. Gheorghe Maria
prof.univ.dr.ing. Lucian Mircea Rusnac

Ziua susținerii tezei: 27.03.2015

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt

- | | |
|---|--|
| 1. Automatică | 9. Inginerie Mecanică |
| 2. Chimie | 10. Știința Calculatoarelor |
| 3. Energetică | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 4. Ingineria Chimică | 12. Ingineria sistemelor |
| 5. Inginerie Civilă | 13. Inginerie energetică |
| 6. Inginerie Electrică | 14. Calculatoare și tehnologia informației |
| 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații | 15. Ingineria materialelor |
| 8. Inginerie Industrială | 16. Inginerie și Management |

Universitatea Politehnica Timișoara a inițiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoștințelor și rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul Școlii doctorale a universității. Seriile conțin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2015

Această publicație este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicații, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustrațiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare și permisiunea pentru utilizare obținută în scris din partea Universității Politehnica Timișoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300159 Timișoara, Bd. Republicii 9,
Tel./fax 0256 403823
e-mail: editura@edipol.upt.ro

Cuvânt înainte

Teza de doctorat a fost elaborată în cadrul departamentului CAICON al Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului a Universității Politehnica Timișoara sub conducerea domnului Prof. Dr. Ing. Francisc Peter căruia îi sunt profund recunoscătoare și îi adresez mulțumiri deosebite pentru îndrumarea științifică, sprijinul necondiționat, răbdare, pentru încrederea acordată și pentru gândurile bune și sincere care mi le-a transmis în perioada studiilor de doctorat atât pe plan profesional cât și personal.

Adresez mulțumiri deosebite doamnei Prof. dr. ing. Carmen Boeriu pentru oportunitatea de a efectua o parte din activitatea de cercetare din cadrul tezei la Universitatea Wageningen FBR, pentru coordonarea științifică și pentru toate feedback-urile pozitive și optimiste pe care mi le-a oferit pe perioada stagiului la Universitatea din Wageningen și până la finalizarea acestei teze.

Doresc să le transmit mulțumiri membrilor comisiei de doctorat, domnului Prof. Dr. Ing. Nicolae Vaszilcsin de la Universitatea Politehnica Timișoara, Prof. Dr. Ing. Carmen Boeriu de la Universitatea Wageningen, Olanda, Prof. Dr. Ing. Gheorhe Maria de la Universitatea Politehnica București și Prof. Dr. Ing. Lucian Mircea Rusnac de la Universitatea Politehnica Timișoara pentru amabilitatea de a analiza teza și pentru sugestiile științifice importante în scopul îmbunătățirii acestei lucrări.

Doresc să mulțumesc membrilor comisiei de îndrumare, doamnei Prof. Dr. Ing. Cornelia Păcurariu, și domnilor Conf. Dr. Ing. Geza Bandur și Conf. Dr. Ing. Mihai Medeleanu pentru observațiile valoroase privind structura tezei și prezentarea cât mai clară a rezultatelor. Îi mulțumesc în mod special domnului Conf. Dr. Ing. Geza Bandur pentru tot sprijinul acordat în analiza termică a produșilor de reacție.

I would like to express special thanks to my colleagues and friends from Wageningen University and Research Center for all the support and nice moments that I leaved during my internship, especially to Dr. Arie van der Bent, Dr. Guus Frissen, Marinella van Leeuwen, Malgorzata Krolicka and Dr. Ben van der Broek. I would also aknowledge to Prof. Dr. Isabel Arends and Dr. Linda Otten from Delft University of Technology, Biocatalysis group for the oleat hidratase and helpful discussions. A gratefully thanks is going to one of my best friends Eng. Andrada But and to Eng. Jurjen Spekreijse for their amability, suport, constructive discussions and all the wonderfull moments spent toghether in Wageningen. I would like to thank Dr. Lajos Nagy and Prof. Sandor Keki from University of Debrecen, Hungary for all their support for the MALDI-TOF MS analysis.

Mulțumesc cadrelor didactice din cadrul Departamentului CAICON pentru că m-au susținut și m-au încurajat în special domnului Ș.I. Dr. Ing. Vasile Bercean și domnului Ș.I. Dr. Ing. Valentin Badea căruia îi sunt recunoscătoare și pentru sfaturile competente, răbdarea și timpul acordat pentru înregistrarea și interpretarea spectrelor RMN.

Adresez mulțumiri colegelor din grupul de biocataliză în special doamnelor Ing. Adinela Cimporescu, Dr. Ing. Mihaela Aldea-Ungurean, Dr. Ing. Emese Biro, Dr. Ing. Ramona Buzatu, Dr. Ing. Livia Corîci-Deveseleanu, Dr. Ing. Firuța Fițigău, pentru că m-au primit cu căldură și mi-au fost mereu alături. Îi mulțumesc doamnei Asist. Dr. Ing. Cristina Paul pentru susținere și pentru sprijinul acordat mai ales în etapa de finalizare a tezei.

Mulțumesc conducerii Institutului de Chimie Timișoara al Academiei Române, doamnei director Dr. Otilia Costișor pentru înțelegere și suport și doamnei Dr. Ing. Simona Gabriela Muntean pentru tot sprijinul acordat necondiționat atât pe plan profesional cât și personal.

Cele mai calde mulțumiri le adresez celor mai importanți oameni din viața mea, părinților mei Dorel și Maria Todea, fratelui meu Dorin Todea, bunicii mele Silvia Vlad și prietenului meu Flaviu Feier pentru că m-au susținut, m-au încurajat necondiționat, m-au iubit și au avut încredere în mine în orice moment.

Timișoara, martie 2015

Anamaria Todea

Părinților și fratelui meu

Todea, Anamaria

SINTEZA ENZIMATICĂ ȘI CARACTERIZAREA UNOR NOI BIOMATERIALE POLIESTERICE

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 84, Editura Politehnica, 2015, 180 pagini, 126 figuri, 64 tabele.

ISSN:1842-8223

ISBN: 978-606-554-936-4

Cuvinte cheie: biomateriale, lipaze, hidroxi-acizi grași, ϵ -caprolactonă, poliesteri

Rezumat:

Sinteza enzimatică a biomaterialelor, în special a poliesterilor, reprezintă la ora actuală o tehnică importantă datorită potențialului ridicat de utilizare al acestor materiale în diferite domenii precum alimentar, vopselelor, aditivilor, dar mai ales farmaceutic și medical. Principalul obiectiv al tezei de doctorat a fost sinteza unor biomateriale noi utilizând materii prime reînnoibile în diferite combinații și lipaze din diferite surse microbiene ca și biocatalizatori. Substraturile testate au fost de tipul hidroxiacizilor grași, derivaților de zaharuri și lactone în diferite combinații. Hidroxiacizii selectați au fost saturați și nesaturați cu grupare OH primar și secundar iar pe baza rezultatelor obținute a fost stabilită selectivitatea lipazelor native și imobilizate pentru substraturile selectate. În reacțiile de sinteză a co-poliesterilor au fost utilizate lactone nesubstituite sau polisubstituite cu ciclu de 4, 6 sau 7 atomi. Reacțiile au fost optimizate prin studiul influenței diferiților parametri precum solventul, temperatura, cantitatea de apă, tipul de enzimă iar pe baza rezultatelor a fost selecționată combinația care favorizează formarea co-poliesterilor. Lipazele imobilizate cele mai eficiente au fost utilizate în mai multe cicluri de reacție iar rezultatele obținute indică o stabilitate operațională excelentă a preparatelor în reacțiile de sinteză a poliesterilor. Caracterizarea produșilor de reacție s-a realizat prin metode spectroscopice de tipul GC/GC-MS, MALDI-TOF MS, RMN (1D, 2D), FT-IR dar și analiză termică DSC și TG.

Această lucrare a fost finanțată parțial din proiectul strategic POSDRU/159/1.5/S/137070 (2014) al Ministerul Educației Naționale, România, co-finanțat din Fondul Social European-Investește în oameni, în cadrul Programului Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013.

Adresez mulțumiri deosebite Universității din Wageningen pentru posibilitatea de a efectua o parte din experimentele din cadrul tezei în cadrul grupului Food and Biobased Research.

Cuprins

1. Studiu de literatură	1
1.1. Importanța temei	1
1.2. Chimia verde a polimerilor.....	2
1.3. Clasificarea biopolimerilor.....	4
1.3.1. Polihidroxicanoații (PHA)	6
1.3.2. Poli-ε-caprolactona	7
1.4. Sinteza poliesterilor catalizată de lipaze	9
1.4.1. Utilizarea enzimelor în sinteza polimerilor	10
1.4.2. Lipazele.....	11
1.4.3. Metode de stabilizare a lipazelor.....	15
1.4.4. Reacțiile de policondensare.....	23
1.4.5. Sinteza polimerilor prin deschiderea de ciclu a lactonelor.....	24
1.5. Hidroxi-acizi și estolide	28
1.5.1. Estolidele.....	35
1.6. Biomateriale pe bază de uleiuri vegetale și aplicațiile lor.....	36
2. Contribuții originale	38
2.1. Obiectivele tezei de doctorat	38
2.2. Imobilizarea oleat hidratizei din <i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	39
2.2.1. Purificarea și caracterizarea oleat hidratizei.....	40
2.2.2. Efectul aditivilor asupra activității și stabilității la 4°C.....	44
2.2.3. Imobilizarea OHazei prin diferite metode	45
2.2.4. Caracterizarea OHazei imobilizate.....	49
2.2.5. Concluzii parțiale	54
2.3. Biotransformări ale hidroxi-acizilor grași cu lipaze libere și imobilizate	54
2.3.1. Sinteza enzimatică a acidului 10-hidroxistearic utilizând oleat-hidratază	54
2.3.3. Selecția biocatalizatorului pentru sinteza estolidelor.....	58
2.3.4. Influența mediului de reacție.....	61
2.3.5. Efectul temperaturii și al concentrației de substrat.....	61
2.3.6. Studiul reacției de poliesterificare a 10HSA în timp	63
2.3.7. Selecția biocatalizatorilor imobilizați.....	64

VI Cuprins

2.3.7. Caracterizarea estolidelor	67
2.3.8. Concluzii parțiale	70
2.4. Sinteza și caracterizarea copolimerilor ϵ-caprolactonei cu hidroxi-acizi grași catalizată de lipaze	71
2.4.1. Selecția biocatalizatorului	72
2.4.2. Caracterizarea produșilor de reacție prin RMN, TG și DSC	73
2.4.3. Influența temperaturii	76
2.4.4. Studiul utilizării biocatalizatorului în mai multe cicluri de reacție	76
2.4.5. Concluzii parțiale	77
2.5. Sinteza și caracterizarea copolimerilor ϵ-caprolactonei cu δ-gluconolactonă catalizată de lipaze	77
2.5.1. Influența mediului de reacție.....	79
2.5.2. Influența conținutului de apă	80
2.5.3. Selecția biocatalizatorului	81
2.5.4. Caracterizarea produșilor de reacție.....	83
2.5.5. Reutilizarea biocatalizatorului.....	86
2.5.6. Optimizarea reacției prin elaborarea unui program experimental factorial ...	86
2.5.7. Concluzii parțiale	90
2.6. Optimizare reacției de copolimerizare a β-butirolactonei cu GL și caracterizarea produșilor de reacție	91
2.6.1. Optimizarea reacției prin dezvoltarea unui programul experimental factorial	91
2.6.2. Caracterizarea produșilor de reacție.....	96
2.6.3. Concluzii parțiale	99
2.7. Biotransformarea trioleinei în oligomeri nesaturați prin metoda „one-pot” cu un sistem enzimatic combinat de oleat hidratază și lipază	99
2.7.1. Influența pH-ului și a temperaturii asupra sintezei estolidelor în mediu apos.....	103
2.7.2. Influența raportului concentrațiilor de enzime în sistemul „one-pot”	103
3. Partea experimentală.....	105
3.1. Materiale.....	105
3.2. Purificarea oleat hidratazei	105
3.2.1. Obținerea extractului celular	105
3.2.2. Purificarea OHazei prin cromatografie de afinitate.....	106

3.3. Electroforeza proteinelor pe gel de poli(acrilamidă)	106
3.4. Determinarea conținutului de proteine	107
3.4.1. Determinarea conținutului de proteine în microplăci	107
3.4.2. Determinarea conținutului de proteine prin metoda Bradford.....	107
3.5. Determinarea activității oleat hidratazei	108
3.6. Metode de imobilizare a oleat hidratazei.....	108
3.6.1. Imobilizarea prin adsorbție	108
3.6.2. Imobilizarea prin afinitate.....	108
3.6.3. Imobilizarea prin interacțiuni ionice pe chitosan.....	109
3.6.4. Imobilizarea prin legare covalentă pe diferite suporturi	109
3.6.5. Legarea covalentă pe macroparticule magnetice de chitosan (AMP-CHT) ..	110
3.6.6. Imobilizarea OHazei prin înrețelare (CLEA)	110
3.6.7. Imobilizarea prin entrapare în matrici de sol-gel	111
3.7. Influența pH-ului asupra activității oleat hidratazei	111
3.8. Efectul temperaturii asupra activității enzimei	111
3.9. Studiul reutilizării biocatalizatorului	111
3.10. Influența aditivului asupra stabilității de depozitare.....	111
3.11. Caracterizarea morfologică a oleat hidratazei imobilizate	112
3.12. Analiza acidului 10HSA și acidului oleic prin HPLC	112
3.13. Sinteza acidului 10-hidroxistearic	113
3.14. Analiza hidroxi-acizilor prin GC-MS	113
3.15. Determinarea purității enantiomerice a 10HSA	113
3.16. Analiza FT-IR	114
3.17. Analiza RMN.....	114
3.18. Determinarea activității hidrolitice a lipazelor utilizând <i>p</i> -nitro-fenil palmitat	114
3.18.1. Determinarea activității hidrolitice a lipazelor native	114
3.18.2. Determinarea activității hidrolitice a lipazelor imobilizate	115
3.19. Sinteza biocatalitică a estolidelor	116
3.20. Analiza MALDI-TOF MS	116
3.20.1. Analiza MALDI-TOF MS a estolidelor	116
3.20.1. Analiza MALDI-TOF MS a copolimerilor cu GL.....	117
3.21. Sinteza enzimatică a copolimerilor hidroxi-acizilor grași cu ϵ -caprolactonă	117

VIII Cuprins

3.22. Polimerizarea în solvenți organici	117
3.23. Polimerizarea fără solvent organic	117
3.24. Pre-echilibrare la diferite valori ale activității apei	117
3.25. Imobilizarea lipazei prin entrapare în matrici de sol-gel	118
3.26. Pre-solubilizarea δ -gluconolactonei	118
3.27. Elaborarea unui program experimental factorial și evaluarea datelor	118
3.28. Analiza termică	118
3.28.1. Analiza termogravimetrică (TG)	118
3.28.2. Analiza de calorimetrie diferențială de baleiaj (DSC).....	119
3.29. Studiul reutilizării biocatalizatorului în reacțiile de copolimerizare a ϵ -caprolactonei cu δ -gluconolactonă.....	119
3.30. Sinteza enzimatică a estolidelor utilizând o combinație de lipază și hidratază în sistem „one-pot”	119
3.31. Studiul influenței pH-ului asupra formării estolidelor acidului 10HSA	119
4. Concluzii finale și contribuții originale	120
5. Bibliografie	127
ANEXE.....	141
LISTA DE LUCRĂRI.....	168

1. Studiu de literatură

1.1. Importanța temei

Polimerii biodegradabili au fost tot mai intens studiați fiind încadrați ca și produși ai biotehnologiei albe. Obținerea unor astfel de compuși se poate realiza fie prin izolarea biopolimerilor naturali din plante sau microorganisme fie prin sinteză chimică/ enzimatică *in vitro* utilizând monomeri corespunzători [1].

Având la bază contextul economic, de mediu și politic actual se preconizează o creștere exponențială a producției de materii prime de bază din resurse reînnoibile [2] și derivați ai acestora în următorii 30 la 50 de ani. Deși există încă multe probleme care trebuie rezolvate în următorii 20 de ani s-ar putea dezvolta 3 segmente după cum urmează:

- un segment care să includă obținerea unor intermediari relativ ieftini (etilenă și propilenă), și care vor continua să fie produși în principal din derivații de naftalen, sau s-ar putea, în mod alternativ, să fie produși direct din zaharuri sau alcooli de zaharuri.

- în al doilea segment, se vor încadra produsele chimice a căror producție va fi cuprinsă în intervalul 25.000-50.000 tone/an, cu prețuri care depășesc 2 €/kg. Produsele din acest segment se preconizează ca vor fi obținute prin bio-cataliză și fermentație.

- al treilea segment cuprinde produse chimice de valoare medie funcționalizate cu N- și O- a căror preț se va încadra între 1-2 €/kg cu o producție variind de la 50.000 (pentru un singur compus) la un milion de tone pe an (pentru o serie de compuși).

Deoarece costurile de producție pe cale chimică a acestor monomeri (materii prime) sunt ridicate datorită necesarului de energie din timpul proceselor chimice, și depășesc practic costurile derivaților de tipul nafta-olefinici, în ultimii ani s-a încurajat tot mai mult dezvoltarea unor proiecte comune între domeniile agro-industriale, ingineria chimică și biochimică pentru a genera și a satisface cererea de aproape 100 de milioane de tone pentru materii prime (bulk) funcționalizate [3].

Funcționalitatea și utilitatea polimerilor naturali prin introducerea unor segmente polimerice adiționale în catena principală sau în catena laterală reprezintă o metodă promițătoare pentru îmbunătățirea proprietăților acestora datorită noilor funcțiuni cu care aceștia sunt îmbogățiți, rezultând astfel materiale noi care pot prezenta numeroase avantaje atât în ceea ce privește protecția mediului cât și pentru domeniul medical [4].

Carbohidrații sunt molecule organice a căror disponibilitate ridicată este datorată prezenței în cantități relativ mari în resurse naturale sau regenerabile. Aceste molecule prezintă un rol important în multe procese biologice [5]. Datorită acestor proprietăți precum și a funcțiilor prezente în structura lor, aceste molecule precum și derivații acestora pot fi utilizate ca materii prime în procesele de copolimerizare. Principalul dezavantaj prezentat de carbohidrați este acela că sunt instabili în condițiile reacțiilor de polimerizare clasice (temperaturi ridicate, dificultatea separării catalizatorilor din amestecul de reacție), iar una dintre soluții

poate fi reprezentată de utilizarea lipazelor ca și catalizator rezultând astfel poliesteri pe bază de carbohidrați [6].

1.2. Chimia verde a polimerilor

Termenul de *Chimie verde* (Green Chemistry) a fost introdus de Agenția de Protecție a Mediului SUA (US Environmental Protection Agency) și se definește/implică proiectarea, dezvoltarea și aplicarea proceselor și produselor chimice pentru a reduce sau elimina folosirea și generarea de substanțe care pot fi periculoase pentru sănătatea umană și a mediului înconjurător [7]. Scopul chimiei verzi este de a reuni instrumentele, tehnicile și tehnologiile care pot fi utile pentru dezvoltarea și producția unor produse eco-friendly și procese cu beneficii financiare semnificative.

Anastas ș.a. au conceput un set de 12 principii ale chimiei verzi care sunt prezentate în Figura 1.1.



Figura 1.1 Principiile chimiei verzi.

Acest set de principii include: Proiectarea de sinteze chimice pentru prevenirea deșeurilor; Proiectarea de produse chimice pentru a fi pe deplin eficiente, dar puțin sau deloc toxice; Proiectarea sintezelor chimice astfel încât eliminarea substanțelor toxice să fie redusă pentru om și mediul înconjurător; Utilizarea de materii prime regenerabile; Minimizarea deșeurilor prin utilizarea catalizatorilor; Evitarea reacțiilor de blocare sau de protejare sau orice modificări temporare deoarece reactivii suplimentari generează practic deșeuri; Evitarea utilizării solvenților, agenților de separare, sau alte substanțe chimice auxiliare care pot distruge stratul de ozon; Efectuarea reacțiilor chimice la temperatură și presiunea ambiantă ori de câte ori este posibil; Proiectarea sintezelor astfel încât produsul final să conțină procentaj maxim din materiile prime și Proiectarea de produse chimice biodegradabile [8].

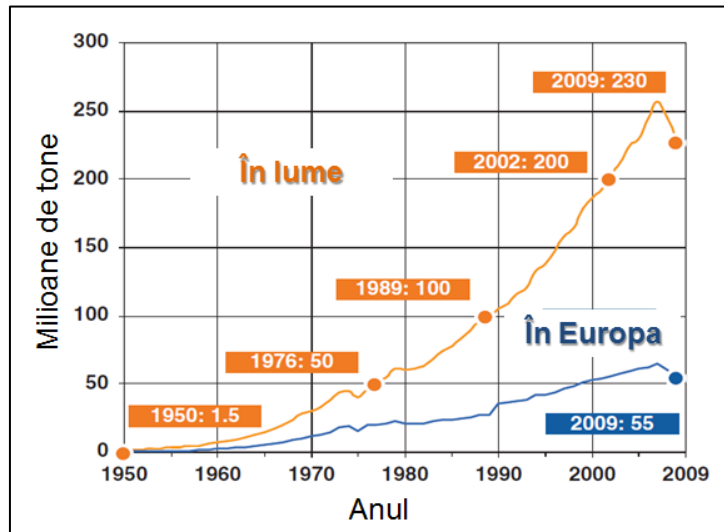


Figura 1.2 Evoluția utilizării materialelor plastice în lume după al doilea război mondial [7]

Chimie verde a polimerilor este un domeniu crucial de cercetare și dezvoltare a unor produși noi și care este în continuă creștere, influențând tot mai mult industria.

„Era plasticului” a început după al doilea război mondial și conform Figurii 1.2. se poate observa că în mai puțin de 60 de ani producția globală și consumul plasticilor a crescut de la 1.5 milioane de tone pe an în 1950 la 230 milioane de tone în 2009.

Deși utilizările materialelor plastice variază la nivel global, o treime din producția mondială (în UE 40,1%) este folosită pentru ambalaje, în timp ce în produsele de construcții reprezintă aproape un sfert (în UE 21%). În Europa, echipamentele auto (7,6%) și cele electrice și electronice (E & E, 5,6%), reprezintă următoarele segmente de pe piață. Alte aplicații includ diferite segmente mai mici, cum ar fi sportul, timp liber, agricultura, etc. (Figura 1.3)

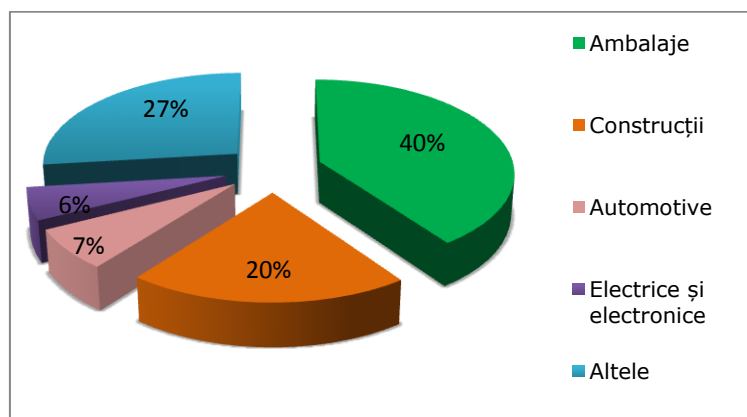


Figura 1.3 Domeniile de utilizare a materialelor plastice [7]

1.3. Clasificarea biopolimerilor

Materialele plastice biodegradabile au fost inițial încadrate ca materiale care contribuie la conservarea mediului, iar definiția acestora a fost standardizată prin ISO/TC61/SC5/ WG22 (ISO 472/DAM3, Amendamentul 3). Astfel materialele plastice biodegradabile sunt definite ca materiale care sunt complet degradate la CO₂ și H₂O în urma acțiunii microorganismelor din natură precum bacterii, fungi sau alge [9].

În ceea ce privește termenii de biomateriale, masele plastice biodegradabile, biopolimerii, polimeri biodegradabili, biocompozite, și în general compușii cu prefixul de "bio", sau "natural" sunt incluși într-un concept comun care încadrează aspecte precum: originea polimerului, compoziția și structura, catalizatorul, degradabilitatea și compatibilitatea [7]

Termenii de „bio-based” (de origine biologică) și biodegradabil sunt adesea utilizați în literatura de specialitate, dar există diferențe esențiale între acești polimeri.

Polimerii biodegradabili reprezintă materiale a căror proprietăți fizice și chimice pot fi afectate datorită deteriorării și degradării complete în urma expunerii la acțiunea microorganismelor atât în mediu aerob cât și anaerob. Polimerii pot fi biodegradabili (ex. acidul polilactic) sau nedegradabili (biopolietilena) (Tabel 1.1). De asemenea, în timp ce mulți polimeri de origine biologică sunt biodegradabili (polihidroxiacanoații și amidonul) nu toți polimerii biodegradabili sunt de origine biologică (de ex. poli-ε-caprolactona).

Tabel 1.1. Clasificarea materialelor plastice

	Materiale plastice (din materii prime biologice)	Materiale plastice (din materii prime fosile)
Materiale plastice biodegradabile	Acid polilactic Polihidroxiacanoații Derivații de polizaharide (DS 1) Proteinele	Poli-ε-caprolactona (PCL) Poli(butilen succinat/adipat) Poli(butilen adipat co-tereftalat)
Materiale plastice ne-biodegradabile	Polioli-poliuretanii Bio-polietilena Bio-polietilen-tereftalat (bio-PET)	Polietilena Polipropilena Polistiren Polietilen-tereftalat

Interesul la nivel mondial pentru obținerea biopolimerilor din resurse regenerabile a fost accelerat în ultimii ani, ca urmare a dorinței de înlocuire a polimerilor clasici cu polimeri pe bază de materii prime non-fosile. Principalele avantaje ale acestor polimeri sunt reprezentate de reducerea dependenței față de resursele fosile și impactul pozitiv asupra mediului prin reducerea emisiilor de dioxid de carbon [10].

Prima generație de polimeri din resurse regenerabile s-a axat pe polimeri pe bază de materii prime agricole, cum ar fi porumb, cartofi, precum și din alte surse de carbohidrați. În ultimii ani tendința s-a schimbat datorită progreselor în domeniul biotehnologiei. Polimerii din resurse regenerabile cu proprietăți similare polimerilor convenționali sunt la ora actuală produși de bacterii în procese fermentative, prin

utilizarea unor monomeri din resurse regenerabile, incluzând biomasa lignocelulozică (amidon și celuloza), acizi grași și deșeuri organice.

În funcție de proveniența lor, biopolimerii se clasifică în două mari categorii: biopolimeri naturali și biopolimeri sintetici.

Din categoria biopolimerilor naturali (Figura 1.4) fac parte polizaharide ca celuloza, amidonul, sau polimerii glucidici produși de bacterii și fungi, precum și biopolimeri de natură proteică proveniți de la animale cum ar fi lâna, mătasea, gelatina și colagenul, a căror aplicabilitate s-a dovedit încă de la începuturile civilizației.

Biopolimeri sintetici se pot obține fie din resurse naturale, cum sunt polimerii pe bază de zaharuri care pot fi prelucrați prin suflare, injectare, formare cu vid și extrudare, fie pe bază de materiale sintetice [11].

Compușii sintetici obținuți din țigței pot fi de asemenea utilizați pentru producerea polimerilor biodegradabili, cum ar fi copoliesteri alifatici-aromatici. Deși acești polimeri sunt fabricați din componente sintetice, ei sunt în întregime compostabili și biodegradabili [12].

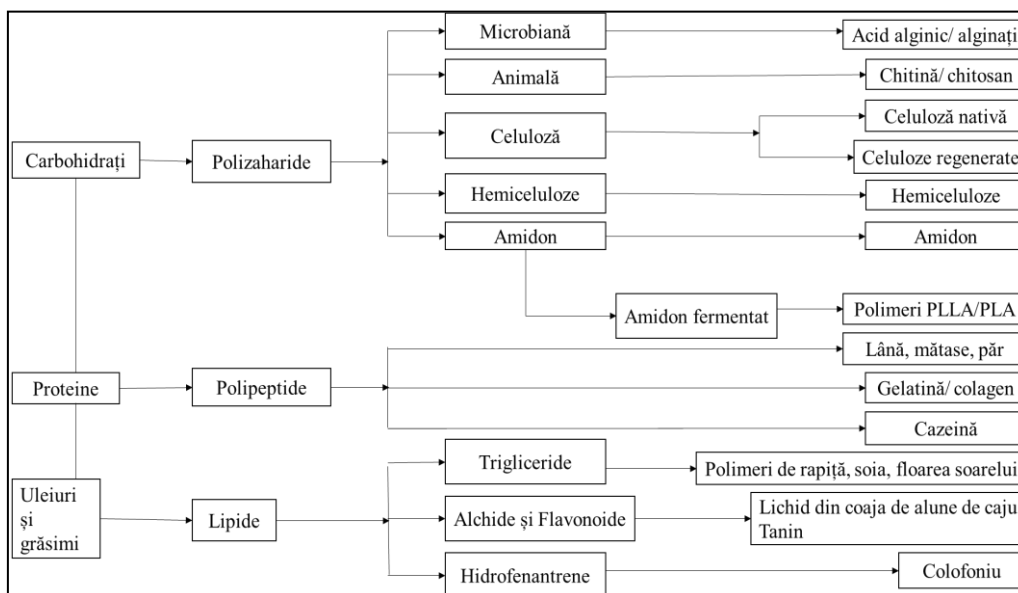


Figura 1.4. Clasificarea biopolimerilor naturali

În prezent există trei căi principale pentru obținerea polimerilor din resurse regenerabile:

- (1) Obținerea pe cale bacteriană (de ex. polihidroxiclcanoati)
- (2) Prin utilizarea polimerilor naturali de origine biotehnologică, parțial modificați pentru obținerea proprietăților dorite (de ex. amidon)
- (3) Prin sinteza monomerilor prin fermentație, urmată de polymerizare (de ex. acid polilactic, polietilenă)

1.3.1. Polihidroxicanoații (PHA)

Polihidroxicanoații sunt polieșteri ai hidroxicanoaților cu un potențial ridicat pentru înlocuirea polimerilor convenționali [13], [14]. PHA sunt sintetizați prin fermentație de o varietate de microorganisme [15], aproximativ 75 de tipuri de bacterii gram-pozitive și gram-negative putând fi adaptate pentru producția intracelulară a PHA [16] utilizând ca materii prime deșeuri regenerabile. PHA se acumulează intracelular, în citoplasmă, iar în condiții de stres metabolic, cum ar fi conținut insuficient dintr-un nutrient esențial (azot sau fosfor), pot să reprezinte până la 90% din masa uscată a celulei [17]. Un proces tipic pentru producerea PHA implică fermentația, izolarea și purificarea produsului. Materiile prime, în funcție de tipul de PHA dorit, pot fi deșeuri, ca cele de natură celulozică, uleiuri vegetale și acizi grași. Izolarea și purificarea PHA implică o etapă de extracție cu solvent organic, acetonă sau cloroform, urmată de precipitare folosind în general alcoolii. [18]. Până în prezent au fost identificați peste 150 de monomeri constituenți ai PHA [19], care permit astfel obținerea unor biopolimeri cu o varietate largă de proprietăți pentru aplicații specifice. Polihidroxicanoații sunt înmagazinați sub formă de granule în interiorul celulelor, 98% din granulă fiind polimer, iar restul proteine și fosfolipide [19].

Rolul polihidroxicanoaților este acela de sursă de carbon al organismului în care sunt înmagazinați, fiind produși pe seama unei mari varietăți de substraturi, cum ar fi resurse regenerabile, produse secundare și chimicale [13].

Polihidroxicanoații se pot clasifica în funcție de lungimea catenei laterale, astfel:

1. cu catenă laterală scurtă - produși de microorganisme precum *Rastonia Eutropha* și alte clase. Ex: poli(3-hidroxi-butiratul) și poli(3-hidroxi-valeratul);
2. cu catenă laterală medie - produși de *Pseudomonas oleovorans*. Printre reprezentanții acestei clase se numără poli(3-hidroxi-octanoatul) și poli(3-hidroxi-nonanoatul).

Structura generală a polihidroxicanoaților este prezentată în Figura 1.5.

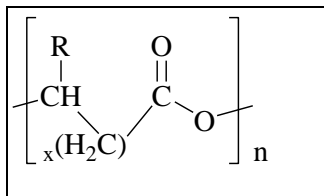


Figura 1.5 Structura generală a polihidroxicanoaților

1.3.1.1. Aplicații ale polihidroxicanoaților

De-a lungul anilor, PHA au fost disponibili ca și produse comerciale de la mai mulți producători precum Biopol, Biomer, Tianan Biologic, Telles Nodax, Biogreen, și Mirel. Principalele aplicații vizează în principal industria alimentară, iar acestea includ pungă biodegradabilă din plastic, pahare, tacâmuri din plastic, fibre pentru textile, ambalaje pentru produse lactate și legume, etc.

O altă aplicație importantă o constituie domeniul farmaceutic, în principal datorită faptului că polimerii derivați ai acizilor alcanoici sunt sintetizați numai sub forma izomerilor *R*, fiind practic precursori enantiomerici puri pentru sinteze [17].

Monomerii corespunzători polihidroxicanoaților au fost produși *in vitro* prin hidroliză chimică sau *in vivo* utilizând enzime de tipul depolimerazelor.

Interesul pentru aplicabilitatea PHA s-a axat și pe aplicații medicale precum plasturi, implanturi ortopedice, schelete pentru țesut, sisteme de eliberare treptată a medicamentelor și este datorat biocompatibilității și biodegradabilității lor [20].

În ultimii ani, granulele de PHA au atras atenția datorită mono-stratului fosfolipidic cu care sunt înconjurate în timpul producerii de către celule. În acest strat s-a demonstrat că există încorporate proteine precum PHA sintetază și PHA depolimerază.

Polihidroxibutiratul, cel mai simplu PHA a fost produs ca și homopolimer în 1992 de bacteria *Arabidopsis thalia*. Acest biopolimer prezintă proprietăți termice și mecanice apropiate de cele ale polistirenului și polipropilenei.

Câteva din proprietățile fizice ale PHB, comparativ cu cele ale polipropilenei, sunt prezentate în Tabel 1.2.

Tabel 1.2. Proprietățile fizice ale PHB și ale polipropilenei, [21]

Parametrii	Polipropilenă (PP)	PHB
Punct de topire [°C]	171-186	171-182
Cristalizare [%]	-15	5-10
Densitate [g/cm ³]	0,905-0,94	1,23-1,25
Încovoierea [GPa]	1,7	3,5-4
Rezistența la rupere [MPa]	39	40
Rezistență la UV	mică	mare
Rezistență la solvenți	mare	mică
Permeabilitate cu oxigen [cm ³ ·m ⁻² ·atm ⁻¹ ·d ⁻¹]	1700	45

Totuși, datorită cristalizării lente, rigidității ridicate, PHB-ul nu este atractiv pentru multe aplicații deoarece implică etape suplimentare de modificare pentru reducerea acestor deficiențe. Există numeroase companii care au sintetizat copolimeri ai PHA în combinație cu un alt monomer pentru a îmbunătăți proprietățile polihidroxicanoaților, cu un conținut de acid 3-hidroxi-butiric ce variază între 80 și 95% [14].

1.3.2. Poli-ε-caprolactona

Poli-ε-caprolactona este unul dintre cei mai studiați și cunoscuți poliesteri biodegradabili și biocompatibili, utilizat foarte mult în aplicații biomedicale [22].

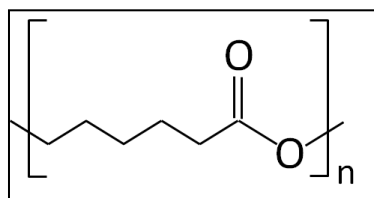


Figura 1.6 Structura generală a poli-(ε-caprolactonei)

De exemplu, biomaterialele pe bază de PCL au aplicații pentru ambalajele utilizate în industria alimentară, deoarece acestea pot fi descompuse de către microorganisme, care prezintă capacitate de descompunere chiar și asupra PCL sintetizat pe cale chimică. Etapele de degradare a polimerului implică depunerea,

8 Studiu de literatură-1

aderarea și colonizarea microorganismelor pe suprafața polimerului, urmată de formarea unui biofilm [23].

Sinteza PCL se poate realiza prin două metode:

- 1) prin policondensarea acidului 6-hidroxihexadecanoic
- 2) prin polimerizarea cu deschidere de ciclu a ECL

Ambele metode au fost investigate și raportate pe cale enzimatică [24].

PCL este un polimer hemicristalin, cu T_g -60°C și temperatura de topire între 59-64°C. PCL cu masa moleculară mare este un polimer ductil cu proprietăți mecanice excelente, în timp ce la mase moleculare mici se prezintă ca un lichid vâscos sau frecvent sub formă de ceară.

Unitățile repetitive din PCL sunt reprezentate de 5 grupări metilen nepolare și o singură legătură polară esterică, structură ce îi conferă PCL proprietăți unice. Conținutul olefinic ridicat îi oferă PCL proprietăți mecanice similare poliolefinelor și compatibilitate ridicată cu alți polimeri. Grupările metilenice încadrează PCL ca unul dintre cei mai hidrofobi polimeri disponibili comercial. Proprietățile PCL, în special biodegradabilitatea și proprietățile mecanice, pot fi adaptate prin controlul cristalinității [25].

Până în prezent, au fost raportați în literatură copolimeri biodegradabili formați prin grefarea PCL pe polizaharide precum celuloza, hidroxietilceluloza, dextran și amidon au fost raportați în literatură [26]–[28].

Copolimerii formați prin grefarea polizaharidelor cu poliesteri sunt des utilizați în domeniul biomedical ca și sisteme de eliberare treptată a medicamentelor, datorită biocompatibilității ridicate și abilității lor de a se asambla în soluție, în diferite structuri supramoleculare [29]. În Tabel 1.3. sunt prezentate câteva exemple de copolimeri ai ECL sintetizați pe cale chimică.

Tabel 1.3 Monomeri utilizați în reacții de copolimerizare cu ϵ -caprolactonă

Co-monomer	Catalizator	Referințe
2,5-dion-morfolina-3-/6-alchil-substituită	Sn(Oct) ₂	[30]
Polietilenglicol	Sn(Oct) ₂	[31]
Oxid de etilenă		[32]
Anhidroglucoză acetilată		[28]
Polilactidă-PEG	Sn(Oct) ₂	[33]
Grupări propargilice	catalizator de Cu	[34]
l-lactidă	lactat de zinc	[35]
l-lactidă	lactat de zinc	[36]
lactidă	puvră de zinc	[37]
5-alliloxi-1,3-dioxan-2-onă (ATMC)	Sn(Oct) ₂	[38]
Polietilenglicol	Sn(Oct) ₂	[39]
β -Butirolactonă	complecși organometalici, Cu, Zn, Al	[40]
Segmente trietilenice		[41]

Chitosan	Sn(Oct) ₂	[42]
Acid adipic acid, 1,6-hexandiol	Sn(Oct) ₂	[43]
ε-Caprolactamă	150°C	
Poli (2-hidroxietil metacrilat)	derivați lantanidici	[44]
Poli(lactidă) și poli(etilenglicol)	lactat de zinc, 160°C	[45]
Dextran	Sn(Oct) ₂	[46]
Lactida-PEG	Sn(Oct) ₂	[33]

La ora actuală există numeroase studii de eliberare treptată a compușilor activi utilizând sisteme pe bază de PCL sau ECL, formulate în diferite moduri (Tabel 1.4).

Tabel 1.4 Exemple de compuși bioactivi pe bază de caprolactonă, testați în sisteme de eliberare treptată.

Compus bioactiv		Referințe
Diclofenac, tetraciclină	Fibre PCL	[47]
Insulină	Nanoparticule PCL și Eudragit® RS	[48]
Paclitaxel	Film PCL-g-Dextran	[46]
Tibolon	Nanoparticule de succinate propilenă PCL	[49]
Doxicilină	Amestec PCL-chitosan	[50]
Vitamina B12	Microparticule PCL	[51]
Vancomicină	Microcapsule PCL	[52]
Papaverină, Ibuprofen	Microsfere PCL	[53]
Tetraciclină	Compozite Hidroxiapatită-PCL	[54]
Tamoxifen	Nanoparticule polietilen oxid-PCL	[55]
Heparină	Fibre PCL	[56]
Gentamicină	Fibre PCL	[57]
Progesteron	Fibre PCL	[58]

1.4. Sinteza poliesterilor catalizată de lipaze

Catalizatorii clasici, utilizați în reacțiile de polimerizare încă din 1920, includ acizi (acizi Bronsted, acizi Lewis și diverși cationi), baze (baze Lewis și diferiți anioni) și compuși care generează radicali [7], [59].

În anii 1950, catalizatorii folosiți au fost metale tranziționale de tip Ziegler-Natta dar și metale de pământuri rare. Acești catalizatori au încă un rol major în sinteza polimerilor.

În ultimii ani, a fost dezvoltată o nouă abordare de sinteză a polimerilor, folosind enzime drept catalizatori. Mai mult decât atât, o tehnică avansată de cataliză în sinteza organică a permis un control al chiralității pentru obținerea selectivă de molecule dorite, prin reacții asimetrice.

1.4.1. Utilizarea enzimelor în sinteza polimerilor

Datorită progreselor din ultimii ani din ramuri precum biotehnologia, ingineria enzimelor și izolarea de noi enzime, enzimele au fost tot mai des utilizate în aplicații *in vitro*, de exemplu ca și catalizator în reacții de polimerizare și poliesterificare.

În ultimii 20 de ani polimerizarea pe cale enzimatică, în special sinteza poliesterilor alifatici catalizată de lipaze, a devenit o tehnică sintetică importantă pentru materialele polimerice.

În comparație cu polimerizarea pe cale chimică, polimerizarea enzimatică prezintă numeroase avantaje precum:

- (1) Condiții de reacții blânde;
- (2) Control enatio-, regio- chemo- selectivitate ridicată;
- (3) Număr/cantitate de produși secundari de reacție redus/ă;
- (4) Activitate catalitică ridicată față de macrolactone.

În plus, polimerizarea pe cale enzimatică poate ajuta la evitarea problemelor legate de prezența urmelor de catalizatori metalici, în particular a efectelor negative ale acestora asupra mediului și a toxicității lor în aplicațiile biomedicale. Astfel, polimerizarea enzimatică reprezintă o alternativă utilă și promițătoare pentru polimerizarea chimică [60].

Polimerizare enzimatică este definită ca "polimerizarea *in vitro* a substraturilor (monomerilor) artificiale catalizată de enzime izolate, pe căi non metabolice" [59]. Polimerizarea enzimatică a devenit populară deoarece nu este nocivă asupra mediului, dar permite fabricarea de diferiți polimeri naturali și sintetici cu structuri bine definite, cu stereochimie controlată, regioselectivitate și chemoselectivitate.

Cele mai importante exemple sunt policondensarea, polimerizarea oxidativă, și reacțiile de polimerizare cu deschidere de ciclu a lactonelor [7]. Enzimele care prezintă activitate pentru diferite substraturi din câte se pot forma macromolecule sunt prezentate în Tabel 1.5.

Tabel 1.5 Sinteza polimerilor pe cale enzimatică

Clasa	Exemple de enzime	Polimerii sintetizați
Oxidoreductaze	Peroxidază, lacază, glucozoxidază,	Polifenoli, polianiline, vinilpolimeri, polizaharide, oligozaharide ciclice,
Transferaze	glicoziltransferază,	poliesteri de polizaharide,
Hidrolaze	aciltransferază, glicozidază (celulază, amilază, chitinază, hialuronidază), lipază, protează	poliesteri, policarbonați poliamide, polifosfați, politioesteri

Dintre enzimele prezentate în Tabel 1.5 lipazele vor fi detaliate în subcapitolul următor, deoarece ele au fost utilizate ca biocatalizatori pentru sinteza poliesterilor prezentați în partea de contribuții originale a tezei de doctorat.

1.4.2. Lipazele

Lipazele fac parte din clasa hidrolazelor (EC 3.1.1.3), iar principala lor funcție este de a hidroliza esterii acizilor grași (grăsimi și uleiuri) în soluții/medii apoase, cu eliberare de acizi grași, digliceride, monogliceride și glicerină. Aceste enzime sunt regăsite în plante, animale și microorganisme și sunt capabile să catalizeze și reacțiile inverse de esterificare sau transesterificare, în general în mediu organic. Din acest motiv, lipazele sunt o clasă de enzime versatile pentru sinteza compușilor organici, în special pentru sinteza poliesterilor [61].

Izolarea lipazelor se poate realiza prin extracție din țesuturi animale sau vegetale, sau prin cultivarea microorganismelor.

La nivel industrial lipazele sunt tot mai mult utilizate, iar principalele reacții, ramura industrială în care sunt aplicate, cât și producții care rezultă și utilizarea lor sunt prezentate în Tabelul 1.6.

Tabel 1.6. Aplicații industriale ale lipazelor [62]

Reacția	Domeniul de aplicație	Produs/utilizare
Hidroliză de grăsimi	Detergenți	Îndepărtarea petelor de ulei țesături
Hidroliza grăsimii laptelui, maturare de brânzeturi	Produse lactate	Dezvoltare de agenți de arome în lapte, brânză și unt
Hidroliză	Panificație, industria berii	Îmbunătățire de aromă și calitate în băuturi, produse de carne și de pește
Transesterificare de uleiuri/ grăsimi	Uleiuri naturale	Unt de cacao
Esterificare și transesterificare	Arome și parfumuri	Sinteza esterilor cu arome naturale
Gliceroliza grăsimilor/ uleiurilor	Surfactanți	Monogliceride pentru surfactanți
Rezoluția alcoolilor/esterilor racemici	Medicamente și industria farmaceutică	Monomeri pentru medicamente chirale și insecticide
Transesterificare	Carburanți	Biodiesel
Acilarea alcoolilor zaharurilor	Surfactanți	Monoacil esterii ai zaharurilor pentru surfactanți
	Cosmetică	[63]

Structurile tridimensionale (Figura 1.7) ale multor lipaze au fost determinate prin cristalografie cu raze X. Pe baza acestor studii, au fost identificate următoarele trăsături structurale comune ale lipazelor:

- (1) Toate lipazelor fac parte din clasa hidrolazelor, având o structură compusă dintr-un miez de catene β -pliate, predominant înconjurate de α -helixuri.
- (2) Restul nucleofil activ de Serină este înconjurat de α -helix și de o pentapeptidă bine conservată de tipul Gly-X-Ser-X-Gly, formând un motiv caracteristic numit *cot nucleofil*.

(3) Situsul catalitic al lipazelor este o triadă catalitică formată din amino acizii: serină, histidină și acid aspartic sau glutamic. Serina este orientată diferit față de serina din structura proteazelor.

(4) Prezența unui capac constituit dintr-o secvență de peptidă elicoidală amfifilă, care include situsul activ. Secvența peptidică diferă de la o lipază la alta. Lipaza din *C. antarctica* are un capac foarte mic, ce nu izolează total situsul catalitic de restul enzimei când este în formă închisă, în timp ce lipaza din pancreas de porc prezintă un capac de doar 4 aminoacizi.

(5) Lipazele au patru situsuri/ buzunare pentru trigliceride: un situs al oxianionilor și trei buzunare care acomodează acizii grași legați la pozițiile sn-1, sn-2 și sn-3.

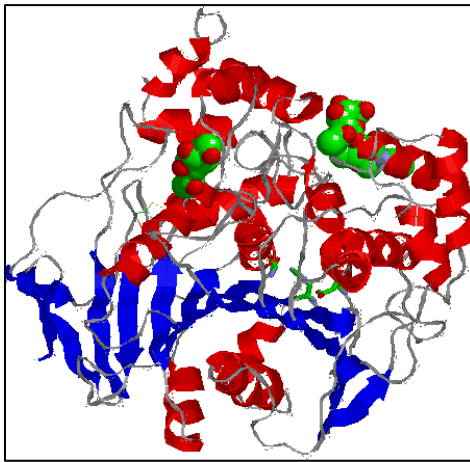


Figura 1.7 Structura 3D a lipazei din *Candida rugosa*.

1.4.2.1. Mecanismul de reacție al lipazelor

Mecanismul reacției de esterificare catalizate de lipaze (Figura 1.8) este similar cu mecanismului de esterificare al serin proteazelor și implică două etape principale.

În prima etapă, în urma atacului nucleofil al restului de serină (-OH) din triada catalitică asupra acidului rezultă compusul tetraedric intermediar I. Prin deshidratarea compusului I se formează un complex acil-enzimă. Formarea intermediarului acil-enzimă are loc printr-o stare de tranziție încărcată negativ la atomul de oxigen atașat la C1. Formarea acestei stări de tranziție este facilitată de rolul de bază generală al histidinei. Restul de acid aspartic stabilizează sarcina parțială pozitivă, care apare la nucleul imidazolic al histidinei. Oxigenul serinei devine puternic nucleofil, astfel încât poate genera o stare de tranziție tetraedrică la C1. Stabilizarea acestei stări se realizează prin legături de hidrogen (realizate în buzunarul oxianionic) care fixează oxianionul de la C1.

În cea de-a doua etapă, sub influența aceleiași baze are loc un atac nucleofil al unei molecule de alcool la același C1, formându-se un al doilea complex II, ionul oxoanionic fiind stabilizat prin legături de hidrogen în același buzunar oxianionic. Prin ruperea legăturii dintre serină și esterul nou sintetizat se regenerează enzima.

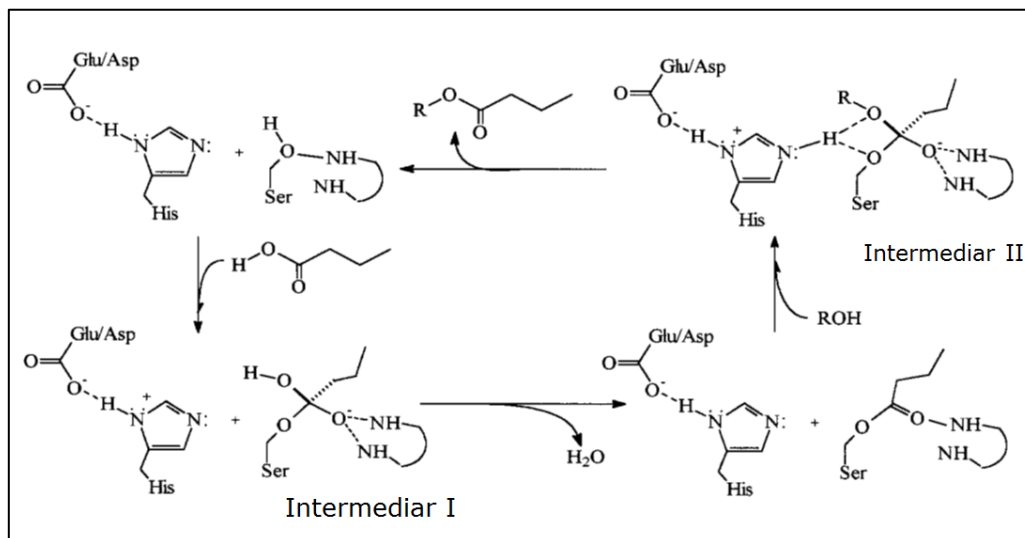


Figura 1.8 Mecanismul de reacție al lipazelor

Pe baza capacității lor de a hidroliza gliceridele lipazele pot fi clasificate în trei grupe principale. Matori ș.a. au determinat indicele de specificitate de poziție (PSI), iar pe baza valorilor obținute preparatele microbiene au fost împărțite în 3 grupe. Valorile PSI din primul grup a fost de 100, adică lipaze complet 1,3 specifice, în cel de-al doilea grup au fost între 70 și 80, iar cele din al treilea grup au fost între -20 și +30, constituind grupul lipazelor relativ nespecifice. S-a studiat efectul condițiilor de reacție: temperatura, pH-ul, solventul organic și agentul tensioactiv neionic asupra valorilor PSI ale unor lipaze nespecifice, care catalizează eliminarea acizilor grași din orice poziție a trigliceridelor. Ca intermediari se formează digliceride și monogliceride, dar aceștia sunt rapid hidrolizați și nu se acumulează în reacție [64].

O altă clasificare a fost raportată de Pleiss și colab. [65], care au împărțit lipazele în trei subgrupe pe baza geometriei și a situsului de legare:

- (i) lipaze cu un situs hidrofob, -spații înguste de legare situate aproape de suprafața proteinei (lipaze din *Rhizomucor* și *Rhizopus*);
- (ii) lipaze cu un situs de legare-pâlnie (lipaze din *Candida antarctica*, *Pseudomonas* și pancreas de mamifere);
- (iii) lipaze cu un situs de legare-tunel (lipaza din *Candida rugosa*).

1.4.2.2. Specificitatea de substrat

Lipazele prezintă specificitate nu numai pentru acizii grași dar și pentru alte substraturi cu grupări OH [66]. Selectivitatea lipazelor comerciale față de acizii grași a fost evaluată de diferite colective de cercetare [67]. Unele lipaze au preferință pentru anumiți acizi grași sau grupuri de acizi grași. De exemplu, lipaza din *Aspergillus flavus* prezintă specificitate mai ridicată pentru acidul tridecanoic decât pentru trioleină. Lipazele din *C. rugosa* și *R. miehei* au preferință pentru acidul oleic

comparativ cu acidul elaidic, în timp ce lipaza A din *C. antarctica* preferă acidul elaidic față de acidul oleic.

Specificitatea lipazelor față de alcooli respectă următoarea ordine: alcooli primari > secundari > terțiari. Alcooli terțiari și esterii lor sunt substraturi pentru care lipazele nu prezintă activitate.

Lee și Parkin [68] au studiat specificitatea de substrat utilizând acizi a căror lungime a catenei a fost diferită față de glicerină, 1,2-propandiol sau 1,3-propandiol folosind ca biocatalizatori lipazele din *P. cepacia*, *R. miehei*, *C. antarctica* B. Pe baza rezultatelor obținute s-a constatat că pentru fiecare substrat (cu excepția glicerinei) lipaza din *P. cepacia* prezintă reactivitatea maximă față de acizii cu catenă C8 și C16, în timp ce lipazele din *R. miehei* și *C. antarctica* B prezintă reactivitatea maximă pentru acizii C8.

1.4.2.3. Stabilitatea lipazelor în solvenți organici

La ora actuală există numeroase enzime disponibile pentru o varietate largă de biotransformări. O etapă importantă în utilizarea enzimelor în sinteza organică a reprezentat-o descoperirea că numeroase enzime pot fi utilizate și în medii de reacție neapoase, fiind astfel posibile transformări care în medii apoase nu s-ar putea realiza.

Dintre enzimele studiate drept catalizatori în solvenți organici, în acest subcapitol se va face referire doar la utilizarea lipazelor. În mediu de solvenți organici nepolari lipazele sunt capabile să utilizeze și alți agenți nucleofili în afară de alcooli, de exemplu amine, amide și acizi peroxi carboxilici [69], [70].

Deși structura enzimei nu este afectată în solvenți organici, flexibilitatea acesteia este dependentă de solvent. Uppenberg ș.a. au raportat regiuni flexibile și rigide observate în structura cristalină a lipazei Ca/B [71].

De asemenea, prin tehnici experimentale precum anizotropia de fluorescență, rezonanța electronică de spin și spectroscopia electronică de relaxare s-a demonstrat că flexibilitatea proteinelor este scăzută în solvenți organici. În plus, s-a observat și o corelație între mărimea moleculelor solventului și flexibilitatea proteinei. Astfel, s-a observat că flexibilitatea lipazei Ca/B scade în solvenți organici în ordinea: metanol, izopentan, cloroform, toluen și ciclohexan.

S-a stabilit că regiunile din structura enzimei afectate de prezența solventului sunt aceleași, diferind practic gradul de flexibilitate în fiecare solvent. Există doar 5 zone la suprafața enzimei care sunt afectate: (aminoacizii 139–150) care reprezintă α -helixul scurt, (aminoacizii 266–289) care reprezintă α -helixul lung care formează intrarea în situsul activ, (aminoacizii 26–30, și 92–97, 215–222) care reprezintă 3 suprafețe corespunzătoare buclelor și (aminoacizii 39, 42, 47, 104, 225) care formează buzunarul mediu de legare a alcoolilor secundari.

În reacțiile de polimerizare catalizate de enzime s-au sintetizat legături esterice, amilice etc. [24] iar solvenți organici precum toluenul, tetrahidrofuranul, benzenul, hexanul dar și amestecuri de solvenți au fost utilizați cu succes [72].

Pe lângă solvenții organici sau sistemele fără solvent, în care practic unul dintre reactanți are și rol de mediu de reacție, multe lipaze au fost folosite cu succes pentru sinteza poliesterilor și în lichide ionice, în solvenți hidrofluorocarbonați (HFCs), sau în dioxid de carbon supercritic (scCO₂). Lichidele ionice precum [CnMIm][PF6] și lichidul ionic dicationic [C4(C6Im)2][PF6]2 s-au dovedit foarte eficiente pentru sinteza enzimatică a PCL, rezultând mase moleculare medii de 26200 g/mol și conversii de până la 62%. Mediul de reacție de scCO₂ este încadrat

în categoria solvenților verzi și prezintă numeroase avantaje precum: toxicitate scăzută, hidrofobicitate relativă, posibilitatea realizării reacțiilor în reactoare cu volum variabil, reutilizarea ușoară a enzimei. Dintre HFCs, 1,1,1,2-tetrafluoroetanul a fost utilizat cu succes pentru sinteza enzimatică a poli-lactidei, conversia fiind de aproximativ 50%, iar masa moleculară medie M_n de 14000 g/mol.

Sistemele de solvent bifazice apă/organic au fost folosite cu succes pentru a transforma substraturi foarte lipofile cum ar fi steroizi, grăsimi și derivați de alchene.

Selectivitatea lipazelor poate fi influențată de prezența solvenților organici în două modalități:

(a) Solvenții pot afecta regioselectivitatea lipazei. Rubio ș.a. au studiat reacția de transesterificare a 1,4-dibutiriloxi-2-octil-benzenului cu butanol, catalizată de lipaza din *P. cepacia* în diferiți solvenți organici, arătând că solvenții hidrofobi au favorizat formarea 4-butiriloxi-2-octil fenolului, iar solvenții hidrofilii au favorizat formarea de 4-butiriloxi-3-octil fenolului [73].

(b) Solvenții pot afecta, de asemenea, selectivitate prochirală a lipazelor. Terradas ș.a. au studiat hidroliza esterului prochiral 2-(1 naftoil amino)-trimetilen-dibutirat la monoester, catalizată de lipaza din *Pseudomonas* în diferiți solvenți și au constatat că selectivitatea pro-S a enzimei a variat de la aproximativ 3 în unii solvenți la mai mare de 30 în alții [74].

Alte condiții de reacție în care au fost testate lipazele au fost temperatura ridicată, valori extreme ale pH-ului, concentrații ridicate de sare (enzime din halofile), sisteme în fază gazoasă, fără solvent, lichide ionice, sisteme în fază solidă [62].

1.4.3. Metode de stabilizare a lipazelor

Stabilizarea enzimelor este o condiție necesară pentru procesele biocatalitice viabile din punct de vedere economic. Obiectivele principale ale stabilizării proteinelor includ creșterea stabilității operaționale la valori extreme ale pH-ului, la temperaturi ridicate și la concentrații mari de solvenți organici [75].

În general, există numeroase tehnici pentru stabilizarea proteinelor. O primă abordare implică ingineria genetică, iar creșterea stabilității se realizează prin mutageneză aleatoare sau prin design rațional, de exemplu prin introducerea de prolină, punți disulfurice sau prin extensii polipeptidice [76].

O a doua metodă de stabilizare implică modificări fizico-chimice ale proteinelor. Această metodă include mono-funcționalizarea prin acilare și alchilare sau bi-funcționalizarea cu agenți de reticulare, cum ar fi glutaraldehida sau diimide.

A treia tehnică de stabilizare aplicată pe scară largă este imobilizarea enzimelor. Aceasta este una dintre metodele de stabilizare cele mai utilizate, deoarece are și alte efecte pozitive în afară de cel stabilizator. Astfel, facilitează reutilizarea catalizatorului sau o schemă de purificare mai simplificată [75].

La ora actuală există peste 10000 de publicații cu privire la stabilizarea lipazelor prin imobilizare, iar în perioada 2011-2015 în baza de date Thomson Reuters s-au publicat 1258 de studii.

Dintre metodele de imobilizare existente cele mai importante sunt prezentate schematic în Figura 1.9: adsorbția pe un suport solid, legarea electrostatică, legarea covalentă pe diferite suporturi solide, entraparea în matrici poroase și înrețelarea.

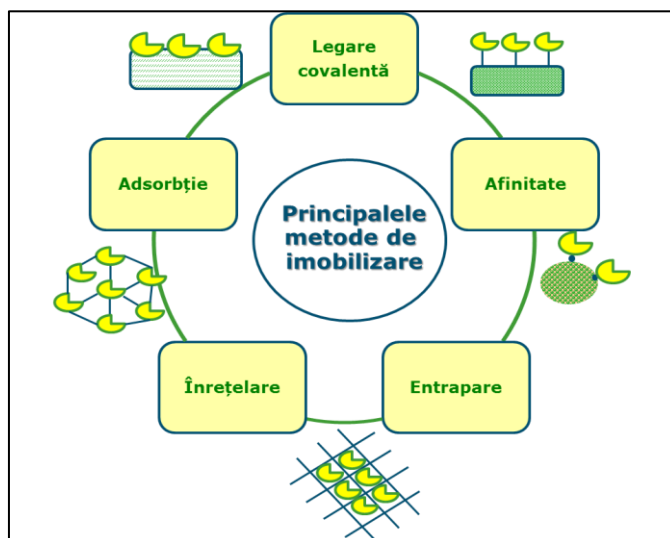


Figura 1.9. Tehnicile de imobilizare a enzimelor

1.4.3.1. Adsorbția

Imobilizarea enzimelor prin adsorbție se realizează prin intermediul interacțiunilor de tip Van der Waals, legături de hidrogen, interacțiuni hidrofobe, dintre molecula enzimei și un suport solid.

Cele mai utilizate suporturi solide folosite în cadrul acestui procedeu de imobilizare sunt materialele anorganice (porțelan poros, Celita, sticlă poroasă) și materialele celulozice (DEAE-celuloză, lemn, rumeguș) [77]

Câteva exemple de lipaze imobilizate în ultimii ani prin adsorbție sunt prezentate în Tabel 1.7.

Tabel 1.7 Exemple de lipaze din diferite surse microbiene imobilizate prin adsorbție pe diferite suporturi

Sursa	Suport	Referințe
<i>Candida rugosa</i>	Silice mezoporoasă MSU-H	[78]
<i>Mucor miehei</i>	Silice mezoporoasă	[79]
<i>Rhizopus oryzae</i>		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Silice mezoporoasă	[80]
<i>Candida antarctica B</i>	Lewatit	[81]
<i>Bulkholderia cepacia</i>	Particule magnetice	[82]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Celită	[83]

1.4.3.2. Legarea covalentă

Imobilizarea prin legare covalentă este una dintre metodele de imobilizare cele mai utilizate și implică formarea unor legături covalente între aminoacizii aflați pe suprafața enzimei și grupările funcționale ale suportului insolubil. În general, aminoacizii implicați în formarea legăturilor covalente sunt lizinele (cu grupările amino), cisteina (gruparea tiol) și acidul aspartic sau glutamic (gruparea carboxil). Lizina este un amino acid comun al proteinelor și pentru o varietate de enzime un număr relativ ridicat de lizine au fost regăsite la suprafață, iar legăturile cu acest aminoacid sunt foarte stabile.

A fost raportată o largă varietate de suporturi utilizate, iar în Tabel 1.8 s-a realizat o selecție de suporturi care s-au utilizat cu succes pentru lipaze.

Tabel 1.8 Lipaze imobilizate prin legare covalentă

Suport	Sursa lipază	Referințe
Nanoparticule de silice cu grupări epoxi	<i>Rhizopus oryzae</i>	[84]
Nanoparticule Fe ₃ O ₄ -chitosan	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	[85]
Nanopolistiren	<i>Candida antarctica</i> B	[86]
Nanoparticule magnetice cu grupări -COOH	Pancreas de porc	[87]
Nanoparticule magnetice ZnO	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	[88]
Chitosan și agaroză	<i>Candida antarctica</i> B	[89]
Compozite polisiloxan-polivinilalcool	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	[90]
Polimer poros cu grupări epoxi	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	[91]
Acid poli(γ -glutamic)	<i>Candida rugosa</i>	[92]
Compozit magnetită-grafen-chitosan	<i>Candida rugosa</i>	[93]

Unul dintre polimerii naturali utilizat tot mai mult în ultima perioadă ca și suport sau ca agent de acoperire pentru diferite suporturi solide, cum sunt particulele magnetice, este chitosanul (Figura 1.10). Dintre avantajele pe care chitosanul le oferă se remarcă prețul scăzut, biodegradabilitatea și biocompatibilitatea ridicată și citotoxicitatea scăzută [94].

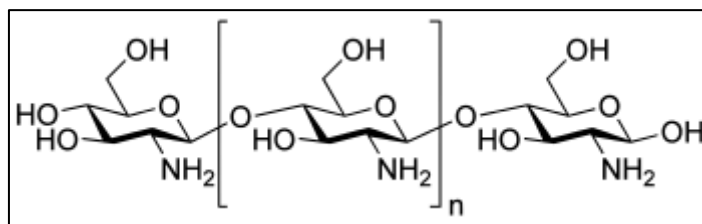


Figura 1.10. Structura chimică a chitosanului

Chitosanul este forma deacetilată a chitinei, un polimer natural prezent în exoscheletul artropodelor (homari, creveți, crabi și insecte). Gradul de deacetilare poate varia între 40 și 98% [95]. Grupările amino îi oferă chitosanului proprietăți speciale și singulare: este solubil în soluții apoase acide ($\text{pH} < 6.5$); aderă la suprafețe încărcate negativ, formează agregate cu compuși polianionici și chelați cu ionii metalelor grele [96].

1.4.3.3. Imobilizarea prin afinitate (legături ionice)

Imobilizarea enzimelor prin afinitate este o metodă simplă care are la bază formarea unor legături ionice între enzimă și suport. De cele mai multe ori interacțiunile care apar în cazul legăturilor ionice sunt mai puternice decât legăturile care se formează în cazul adsorbției. În ultimii ani, datorită progreselor în ingineria genetică, tot mai multe structuri ale enzimelor au fost modificate prin introducerea unor secvențe noi de aminoacizi (histidine în general) pentru a simplifica protocolul de purificare a proteinelor, în acest caz fiind necesară doar o singură etapă de purificare prin cromatografie de afinitate. S-a demonstrat ulterior că prin această metodă se realizează practic imobilizarea enzimei, iar unele dintre suporturile cele mai des utilizate sunt particulele de agaroză și ioni de Ni^{2+} . Această metodă s-a utilizat cu succes pentru imobilizarea PiKC hidroxilazei, *p*-nitro benzil esterazei, benzaldehid liazei și peroxidazei [97].

În afară de acest suport, enzimele pot forma legături ionice cu biopolimeri de natură polizaharidică funcționalizați sau nu ca dextranul, agaroză și chitosanul sau pe rășini acrilice ca Amberlite FPC3500 (cationic) sau FPA54 (anionic). Funcționalizarea se poate realiza cu derivați cuaternari de amoniu, dietilaminoetil și carboxi metil [98].

1.4.3.4. Imobilizarea prin incluziune (entrapare)

Entraparea enzimelor constă în includerea enzimei în rețeaua unui polimer sau închiderea ei într-o membrană semipermeabilă, fiind astfel prevenită desprinderea ei.

Entraparea enzimelor în matrici de sol-gel

Matricile de sol-gel sunt nanomateriale care se formează la temperaturi relativ scăzute, utilizând precursori anorganici și precursori alcoxidici. Utilizarea precursorilor alcoxidici implică transformarea acestor silani precursori într-un

polimer anorganic reticulat prin reacții de hidroliză și de condensare [99]. În ultimii ani, tot mai multe enzime au fost immobilizate prin această metodă deoarece structura terțiară a proteinelor nu este afectată în timpul immobilizării, preparatul se poate reutiliza ușor, capacitatea de entrapare este mare, iar dimensiunea și geometria porilor poate fi ușor controlată. Preparatele enzimatiche obținute prin această metodă au prezentat în general stabilitate operațională ridicată și termostabilitate [100].

1.4.3.5. Immobilizarea prin înrețelare (reticulare)

De multe ori s-a observat că utilizarea suporturilor solide pentru immobilizare poate afecta activitatea specifică a biocatalizatorului, chiar până la un factor de 10 ori mai mic. Immobilizarea enzimelor în absența unui suport solid este posibilă utilizând un agent de reticulare bifuncțional care să realizeze legături între moleculele de enzimă. Există trei tipuri de preparate enzimatiche care se pot obține prin această metodă și sunt prezentate schematic în Figura 1.11. Structurile cristaline de enzimă reticulată (Cross-linked Enzyme Crystals, CLEC) implică legarea covalentă între cristalele de proteină, având ca dezavantaj necesitatea utilizării enzimei ultra purificate. Cea de-a doua metodă, agregate enzimatiche reticulate (Coss-linked enzyme aggregates, CLEA) presupune precipitarea enzimei și reticularea ulterioară și a fost utilizată cu succes pentru o serie de enzime ca nitril hidratataza, penicillin acilaza, și lipaza [101]. A treia metodă de înrețelare implică formarea unei emulsii apă/ulei și adăugarea agentului de reticulare, rezultând particule sferice de enzimă immobilizată (Spherezymes). Această metodă s-a dovedit extrem de eficientă pentru lipaze, atât în mediu reacție apos cât și organic [98].

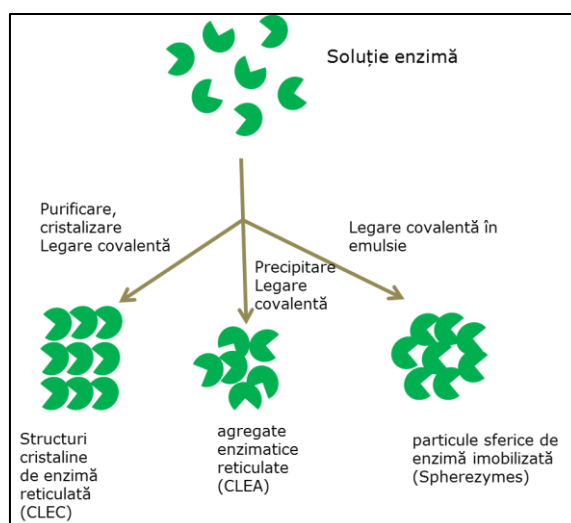


Figura 1.11 Immobilizarea enzimelor prin înrețelare

Fiecare dintre aceste metode prezintă avantaje și dezavantaje și practic alegerea metodei de immobilizare presupune un compromis între randamentul de

imobilizare, activitate și performanța enzimei. În Tabel 1.9 s-a realizat o sinteză cu principalele avantaje și dezavantaje pentru fiecare metodă de imobilizare

Tabel 1.9 Principalele avantaje și dezavantaje ale metodelor de imobilizare

Metoda de imobilizare	Avantaje	Dezavantaje
Adsorbția fizică	Metodă ieftină, simplă și rapidă Nu necesită funcționalizarea suportului Nu modifică conformațional enzima Nu distruge situsul activ al enzimei	Desprinderea enzimei de suport în timpul reacției, mai ales în mediu apos
Legare covalentă	Legare puternică a enzimei de suport Există o gamă largă de agenți de legare	Este necesară funcționalizarea/modificarea suprafeței suportului Utilizează compuși toxici (ex. glutaraldehidă) Datorită modificărilor conformaționale poate avea loc pierderea activității catalitice
Entrapare CLEA / încapsulare	Stabilitate în condiții dure de reacție (ex. pH extrem) Nu impune utilizarea enzimelor cu puritate ridicată Se poate aplica în co-imobilizare pentru enzime diferite (în cuplaj) Modificări conformaționale minime sau deloc	Proces experimental complicat (necesită mai mult de două etape) Rată de difuzie scăzută a substraturilor/produșilor datorită volumului redus al porilor

Parametrii critici care intervin în optimizarea proceselor de imobilizare sunt prezentați în Tabel 1.10

Tabel 1.10. Parametrii critici care intervin în optimizarea proceselor de imobilizare

	Parametrii	Exemple
Suport	Proprietăți chimice	Compoziție, grupări funcționale, stabilitate în solvenți, hidrofobicitate.
	Proprietăți fizice	Morfologie, dimensiune particule, porozitate (structură pori, distribuția dimensiunii porilor), aria suprafeței active, încărcarea suprafeței, abraziunea (pentru reactoarele cu agitare), rezistența la curgere
Enzimă	Proprietăți biochimice	Disponibilitate, stabilitate la depozitare, toxicologie, puritate, flexibilitate conformațională, greutate moleculară,

	Parametri cinetici	dimensiune, situs activ, morfologie, grupări funcționale de suprafață, încărcarea suprafeței (pI). Activitate specifică, profilul pH-ului și al temperaturii, stabilitate în condițiile de reacție (pH, solvenți, temperatură), aditivi pentru activare sau stabilizare.
Proces de imobilizare	Strategia imobilizării Condițiile imobilizării	Adsorbția fizică, încapsularea, legarea covalentă, reticularea, pH, temperatură, solvenți, agenți de stabilizare.
	Difuzie/transfer de masă Performanțe	Efectul soluției tampon, vâscozitatea mediului de reacție, difuzia porilor. Randament în timp și spațiu, reciclare, reutilizare, îndepărtare produs, toxicitate, inhibiția enzimei, cinetică.
	Costul procesului	Costul enzimei și al suportului, eliminarea deșeurilor, energie.

Din multitudinea de lipaze imobilizate raportate în literatură, în Tabel 1.11 s-a realizat o selecție a lipazelor imobilizate și utilizate cu precădere în sinteza poliesterilor și a polimerilor. Se poate observa că în perioada 2008-2015 pentru majoritatea reacțiilor anterior menționate lipaza cea mai utilizată a fost cea din *C. antarctica* B imobilizată prin adsorbție, disponibilă comercial ca și Novozyme 435. Și celelalte lipaze din alte surse au fost imobilizate tot prin adsorbție, indicând faptul că în sinteza polimerilor, datorită mediului organic în care se realizează sintezele, nu este favorizată desprinderea enzimei de pe suport și implicit pierderea activității.

Tabel 1.11. Lipaze imobilizate utilizate în sinteza poliesterilor

Sursa microbiană	Metoda de imobilizare	Suportul	Reacție	Referințe
<i>C. antarctica</i> B	Adsorbție	Rășină acrilică- Novozyme 435	Poliesteri pe bază de ciclotetrasiloxan	[102]
<i>C. antarctica</i> B	Adsorbție	Cleuri de montmorillonit și sepiolit	Sinteză PCL	[103]
<i>Rhizopus oryzae</i>	Adsorbție	Lewatit MonoPlus MP 64	Poliglicerol- poliricinoleat	[104]
<i>C. antarctica</i> B	Adsorbție	Chitină și chitosan	Sinteză acid polilactic	[105]
<i>C. antarctica</i> B	Adsorbție	Rășină acrilică- Novozyme 435	Sinteză PCL	[106]
<i>C. antarctica</i> B	Adsorbție	Lewatit VP OC 1600	Sinteză polilactidă	[107]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Adsorbție	Lewatit VP OC 1026	Co-Poliesteri PCL și dietilene glicol and 1,3-propanediol	[108]
<i>Burkholderia</i>	Adsorbție	Pământ de diatomee	Sinteză poli-epoxi- ricinoleat	[109]

22 Studiu de literatură-1

<i>cepacia</i>				
<i>C. antarctica B</i>	Adsorbție	Rășină acrilică- Novozyme 435	Sinteză PCL	[110]
<i>C. antarctica B</i>	Adsorbție	Rășină acrilică- Novozyme 435	Sinteză poliesteri de zaharuri și PEG	[111]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Adsorbție	Lewatit	Sinteză PCL	[112]
<i>C. antarctica B</i>		Rășină acrilică- Novozyme 435		
<i>C. antarctica B</i>	Adsorbție	Rășină acrilică- Novozyme 435	Poli-lactidă	[113]
<i>C. antarctica B</i>	Adsorbție	Rășină acrilică- Novozyme 435	Poliesteri siliconici aromatici	[114]
<i>C. antarctica B</i>	Adsorbție	Rășină acrilică- Novozyme 435	PEG- <i>b</i> -PCL	[115]
<i>C. antarctica B</i>	Adsorbție	Rășină acrilică- Novozyme 435	Poli-lactidă	[116]
<i>C. antarctica B</i>	Adsorbție	Rășină acrilică- Novozyme 435	Condensare 1,3- bis(3carboxypropyl)tetra- metildisiloxan cu 3- alchendioli	[117]
<i>C.rugosa</i>	Adsorbție	Particule de sticlă	Sinteză acid poli- ricinoleic	[118]
<i>P.cepacia</i>	Adsorbție	Ceramică	Polimerizare metil ricinoleat	[119]
<i>C. antarctica B</i>	Adsorbție	Rășină acrilică- Novozyme 435	Acid polilactic	[120]
<i>C. antarctica B</i>	Adsorbție	Rășină acrilică- Novozyme 435	Copolimeri ECL- acid 2,2 bis(hidroximetil)- butiric	[121]

Sinteza enzimatică a poliesterilor utilizând lipaze ca și catalizator se poate realiza prin două tipuri de reacții și anume:

(1) Policondesare, care se divide în două categorii:

- a. Policondensarea hidroxi-acizilor
- b. Policondensarea di-acizilor sau ai esterilor corespunzători

(2) Polimerizare cu deschidere de ciclu al lactonelor [122], [123]

1.4.4. Reacțiile de policondensare

Principalii produși ai reacțiilor de policondensare sunt poliesterii. Substraturile și produșii care pot fi utilizați în reacțiile de policondensare sunt prezentați în Figura 1.9. Poliesterii alifatici sunt polimerii biodegradabili cei mai utilizați pe scară largă în domenii precum protecția mediului și în aplicații biomedicale.

În general acești polimeri sunt sintetizați pe cale chimică prin reacții de policondensare, utilizând o varietate largă de catalizatori precum acetati de mangan, zinc, calciu, cobalt, magneziu, sau oxizi de titan. Reacțiile au loc la temperaturi cuprinse între 180–280°C, iar reacțiile secundare precum deshidratarea diolilor sau degradarea poliesterilor în acizi sau alchene nu poate fi evitată [122].

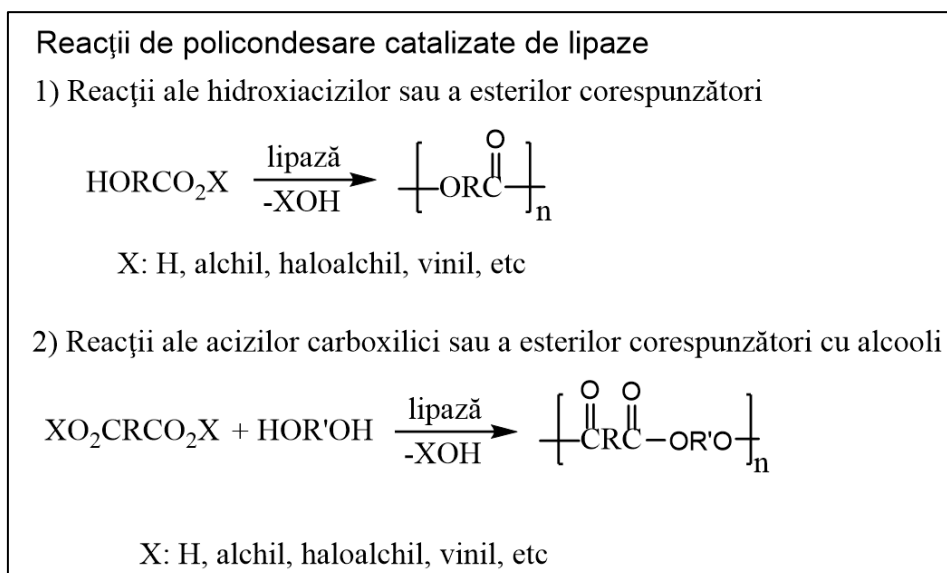


Figura 1.12 Reacțiile de policondensare catalizate de lipaze.

Reacțiile de policondensare enzimatică se realizează în general în solvenți organici sau în sisteme fără solvent, iar produșii de reacție au în general mase moleculare de ordinul miilor.

Pentru creșterea masei moleculare a produșilor, a fost raportată o metodă de policondensare enzimatică în două etape la temperatură scăzută (post polimerizare). Totuși prezența maselor moleculare mici nu a putut fi evitată, indicând necesitatea optimizării acestui proces. Liu ș.a. au utilizat β-ciclodextrină ca suport în policondensarea enzimatică, iar masele moleculare medii în reacția de policondensare a diesterilor cu dioli au fost de până la 62,100 g/mol. Acest efect a fost atribuit faptului că β-ciclodextrina poate înconjura catena polimerului și să o mențină astfel într-o configurație corespunzătoare [124].

Pe lângă acești copoliesteri, policondensarea enzimatică a fost extinsă pentru obținerea unor poliesteri funcționalizați precum poli(oleic-diacid-co-glicerină) poliesteri grefați cu grupări mercapto, poliesteri care să conțină subunități de

disiloxan sau poliesteri siliconici, oligoesteri funcționalizați cu grupări metacrilat și poliesteri care să conțină unități de acid L-malic.

O serie de derivați de zaharuri au fost copolimerizați cu PEG 600 și dimetil esterii pentru a forma polimeri derivați de zaharuri și PEG, care prezintă de asemenea potențial ca sisteme de eliberare treptată a medicamentelor [60].

Dintre lipazele utilizate pentru sinteza poliesterilor pe cale enzimatică, cea mai des utilizată a fost lipaza din *Candida antarctica* B imobilizată, comercializată sub numele de Novozyme 435.

Mecanismul reacțiilor de policondensare este prezentat în **Figura 1.13** și implică 2 etape: formarea intermediarului acil enzimă în etapa de inițiere, urmată de etapa de propagare în care are loc formarea poliesterului.

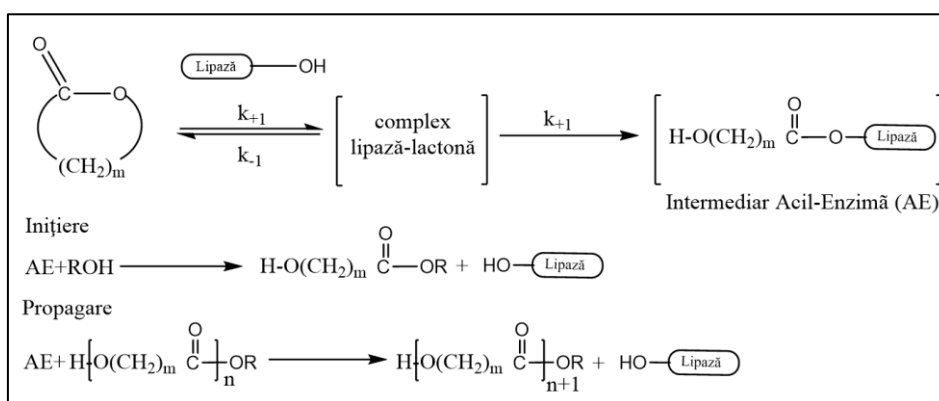


Figura 1.13 Mecanismul reacțiilor de polimerizare catalizate de lipaze [72]

1.4.5. Sinteza polimerilor prin deschiderea de ciclu a lactonelor

În contrast cu reacțiile de policondensare, în reacțiile de polimerizare cu deschidere de ciclu formarea apei sau a alcoolilor este evitată, ceea ce conduce la obținerea unor mase moleculare mai mari. În general lipazele prezintă reactivitate mai mare pentru polimerizarea cu deschidere de ciclu decât pentru policondensare [125].

Polimerizarea cu deschidere de ciclu catalizată de lipaze a fost observată pentru prima dată în 1993 pentru ϵ -caprolactonă și δ -valerolactonă. Numeroase studii prezintă polimerizarea și copolimerizarea lactonelor prin cataliză cu lipaze (Kobayashi 2009). Polimerizarea cu deschidere de ciclu a ϵ -caprolactonei și a ϵ -caprolactonei substituie a fost indusă ușor de lipaze de origini diferite. Dintre acestea, lipaza imobilizată provenită din *Candida antarctica* B (Novozyme 435) a fost cea mai eficientă pentru polimerizarea ϵ -caprolactonei, dar și a altor lactone [205].

ϵ -Caprolactona a fost monomerul cel mai des utilizat în studii model pentru sinteza enzimatică a poliesterilor cu deschidere de ciclu, dar și alte lactone/macrolactone precum cele prezentate în Figura 1.14 au fost utilizate cu succes ca substraturi pt lipaze. Dificultățile cel mai des întâlnite au fost obținerea de mase moleculare scăzute și cinetica lentă a reacțiilor de polimerizare. În încercarea de a preveni aceste inconveniente, s-a arătat că viteza de polimerizare și masa moleculară pot fi controlate prin combinarea diferiților parametri, cum ar fi temperatura, solventul, concentrația enzimei, sau concentrația de monomer [131].

În comparație cu enzimele libere/native, enzimele imobilizate prezintă activitate catalitică și stabilitate mai ridicată, fiind astfel favorizată sinteza poliesterilor cu mase moleculare medii mai mari, (M_w) între 13.400–25.100 g/mol. S-a demonstrat ca lipaza Novozyme 435 a fost eficientă în 10 cicluri de reacție pentru sinteza poli ϵ -caprolactonei cu mase moleculare medii de 50.000 g/mol [106].

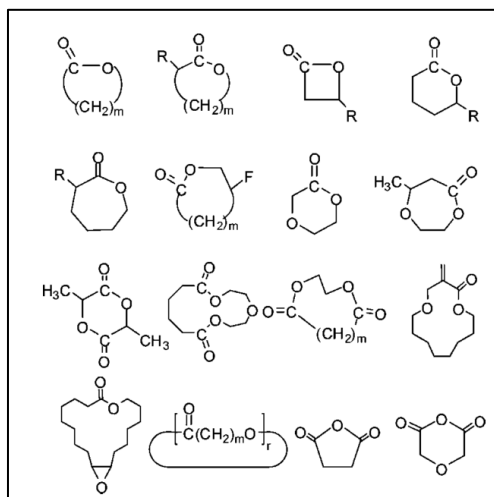


Figura 1.14 Lactone utilizate ca și substraturi pentru lipaze în reacții de poliesterificare [59]

În afară de enzimele imobilizate prin metode tradiționale, recent s-a demonstrat că lipazele acoperite cu lichide ionice au fost foarte eficiente, chiar mai eficiente comparativ cu situațiile în care lichidele ionice au fost utilizate ca mediu de reacție rezultând PCL și poli(1,4-dioxan-2-onă) cu mase moleculare medii maxime de 182.000 g/mol [60]

În polimerizarea enzimatică cu deschidere de ciclu există două metode disponibile pentru sinteza de noi structuri de poliesteri.

- (1) Copolimerizarea monomerilor de diferite tipuri.
- (2) Sinteza unor poliesteri terminal funcționalizați (prin metoda de inițiere)

Copolimerizarea lactonelor permite o îmbunătățire a proprietăților polimerilor, dar introduce și noi provocări în polimerizarea cu deschidere de ciclu catalizată de lipaze, cum ar fi elucidarea legăturii dintre reactivitatea comonomerului, transesterificare și microstructura polimerului. Copolimerizarea monomerilor ciclici cu unități hidrofille s-a realizat până în prezent în general prin cataliză chimică [43].

În ultimii ani, au fost raportate copolimerizări enzimatică ale PCL cu diferiți monomeri / polimeri, cum ar fi zaharuri, derivați de poli(etilen glicol), dioli și, cum era de așteptat, funcționalitățile nou introduse au sugerat noi potențiale aplicații. Novozyme 435 a fost cea mai eficientă dintre lipazele care au fost testate pentru aceste reacții. Au fost sintetizați cu succes poliesteri pe bază de derivați de zaharuri, pornind de la alditoli. Lipazele s-au dovedit a fi catalizatori eficienți pentru reacția dintre acidul adipic, respectiv 1,8-octandiol și diferiți alditoli ca manitol, xilitol, glucitol, galactitol, eritritol și ribitol. Cu toate acestea, nu a fost încă raportată

sinteza enzimatică a copolimerilor ECL cu lactone derivate din zaharuri [132]. Câteva exemple de co-monomeri utilizați în reacții de copolimerizare cu ECL sunt prezentate în Tabelul 1.12.

Tabel 1.12. Lipaze și lactone utilizate în reacții de copolimerizare a ϵ -caprolactonei

Enzima	Co-monomer	Referințe
<i>C. antarctica</i> B	ω -pentadecalactonă (PDL)	[126], [127]
<i>C. antarctica</i> B		[128]
<i>P. fluorescens</i>	8-octanolidă (8-OL)	
<i>C. antarctica</i>	PDL	[129]
<i>C. cylindracea</i>		
<i>M. miehei</i>		
<i>P. fluorescens</i>	δ -valerolactonă	[130]
<i>Pancreas de porc</i>		
<i>P. fluorescens</i>		
<i>Pseudomonas sp.</i>	lactat de etil etil 4-hidroxibutirat ciclopentadecanolidă	[61]

Copolimerii (bloc și aleatori) ai PCL pot fi sintetizați folosind o serie de monomeri ca etilenoxid, clorură de polivinil, cloropren, polietilenglicol, polistiren, diizocianați (uretani), tetrahidrofuran (THF), diglicolide, dilactide, δ -valerolactonă, caprolactone substituie, 4-vinil anisol, stiren, metacrilat de metil și acetat de vinil.

Polimerizarea cu deschidere de ciclu a ϵ -caprolactonei catalizată de o esterază termofilă de la *Archaeoglobus fulgidus* a fost realizată cu succes în solvenți organici. Au fost investigate efectele enzimei, concentrației de substrat, temperaturii, timpului de reacție, mediului de reacție și activității apei asupra conversiei monomerului și masei moleculare a produsului.

În afară de lipaza din *Candida antarctica* B și alte lipaze s-au dovedit eficiente pentru polimerizarea diferitelor lactone. De exemplu, lipaza PS-30 imobilizată pe Celite a fost folosită drept catalizator pentru a studia polimerizarea cu deschidere de ciclu a ω -pentadecalactonei (PDL-ROP) în condiții de reacție fără solvent. A fost obținută poli-PDL cu $M_n = 62000$ și indice de polidispersie 1.9.

Deoarece poli(ω -pentadecalactona) este un poliester alifatic cu grad de cristalinitate și hidrofobicitate ridicat, copolimerizarea cu alți monomeri sau înlocuirea cu macrolactone care prezintă legături duble, grupări amino sau epoxi, pot reprezenta alternative pentru îmbunătățirea proprietăților. În plus, prezența unor funcțiuni de tipul celor menționate în catena de bază a poliesterului poate fi utilizată în reacții de înrețelare, care conduc la formarea unor rețele complet amorfe.

Un studiu asupra sintezei funcțiunilor terminale ale macromerilor PCL a fost realizat folosind drept catalizator Novozyme 435. Polimerizarea cu deschidere de ciclu a ϵ -CL catalizată de lipaze a fost efectuată prin adăugarea în reacție a unor potențiali inițiatori de lanț (9-decenol, alcool cinamic, 2-4(hidroxifenil)etanol). Alternativ, acizi și esteri conținând funcțiuni terminale țintă (cum ar fi: acid oleic, acid linoleic, acid octadecanoic) au fost adăugați la prepolimerizarea ϵ -CL, rezultând PCL cu grupare acil terminală. Pentru a controla simultan atât grupările terminale hidroxil cât și grupările carboxil de inițiere și terminare macromerii au fost combinați, fie prin utilizarea unui ester di-funcționalizat sau prin adăugarea ulterioară de inițiator și terminator [61].

Dong ș.a. au realizat copolimerizarea ϵ -CL cu monomeri ciclici și liniari derivați ai β -propiolactonei (β -butirolactonă, α -decan- β -propiolactonă, α -dodecan- β -propiolactonă), în sistem fără solvent, la 45°C, timp de 20 de zile, utilizând lipaze din *Pseudomonas* sp. Dintre copolimerizările efectuate, polimerul cu cea mai mare masă moleculară medie s-a obținut în reacție ϵ -CL cu ciclopentadecanolide (M_n 8400 Da, randament 67%). Masele moleculare ale copolimerilor de ϵ -CL cu lactone au fost mai mari decât cele ale copolimerilor preparați din hidroxiesterii liniari corespunzători [133].

Pornind de la acidul 3-hidroxi butiric și δ -gluconolactonă s-au sintetizat noi copolimeri, urmărindu-se mai multe aspecte ale acestei sinteze, ca activitatea diferitelor enzime utilizate, influența mediului de reacție, influența temperaturii și a timpului de reacție. S-a arătat că dintre lipazele studiate enzima Novozyme 435 prezintă activitatea cea mai ridicată în reacțiile de esterificare ale 3HBA, iar selectivitatea cea mai ridicată a fost obținută utilizând ca mediu de reacție un amestec de DMSO /t-BuOH [6].

A fost demonstrată și copolimerizarea ϵ -caprolactonei (ϵ -CL) și D,L-lactidei, catalizată de lipaza *Candida antarctica* B [134]. Au fost efectuate copolimerizări la diferite rapoarte ϵ -CL: lactidă, iar produsul a fost monitorizat și caracterizat prin MALDI-TOF MS, GPC și ^1H RMN. Polimerizarea ϵ -CL, care este în mod normal promovată de lipaza din *C. antarctica* B, este încetinită inițial de prezența lactidei. În timpul acestei etape, lactida se consumă mai rapid decât ϵ -CL, și apare un dimer cu unități de acid lactic (LA). Pe măsură ce reacția avansează, cantitatea relativă de unități CL a copolimerului crește.

Un derivat diferit de glucoza, izosorbidul, a fost folosit ca inițiator multifuncțional pentru polimerizarea cu deschidere de ciclu a ECL catalizată de lipaza din *Yarrowia lipolytica* imobilizată, rezultând oligomeri PCL-izosorbidici cu valori M_n de până la 1068 [135].

Sinteza enzimatică a copolimerilor prin polimerizare cu deschidere de ciclu a fost intens studiată, utilizând lactone de diferite dimensiuni cum sunt ϵ -caprolactona și β -butirolactona [136], [137], respectiv ϵ -caprolactona și δ -valerolactona [138].

Heise ș.a. au investigat, de asemenea, atât polimerizarea enzimatică cu deschidere de ciclu a ϵ -caprolactonei cât și policondensarea dimetil adipatului cu 1,4 butandiol, utilizând ca solvent trei lichide ionice diferite: [BMIM][PF₆], [BMIM][PF₄], [BMIM][Tf₂N] și enzima Novozyme 435 drept catalizator [139].

Polimerizarea cu deschidere de ciclu a ω -pentadecalactonei a fost studiată în sistem bifazic la interfața ulei/apă, utilizând diferite medii de reacție. Masele moleculare obținute au fost în domeniul 870-3507 g/mol, cu mult mai mici decât masele obținute în toluen (64.500 g/mol). Rezultatele indică faptul că deși urmele de apă sunt esențiale în menținerea structurii enzimei și contribuie la formarea și inițierea reacțiilor de polimerizare, cantitățile de apă adiționale favorizează hidroliza polimerilor [60].

Pentru îmbunătățirea masei moleculare a fost testată o metodă nouă, în două etape: În prima etapă lipaza a fost utilizată pentru a cataliza polimerizarea acidului 6-mercaptohexanoic în toluen la concentrații reduse, pentru a favoriza formarea oligomerilor ciclici, care în a doua etapă au fost repolimerizați cu aceeași lipază. S-a demonstrat că aceeași lipază poate depolimeriza poliesterii formați în oligomeri ciclici [60].

Polimerizarea cu deschidere de ciclu a ϵ -caprolactonei și a δ -valerolactonei catalizată de lipaze a fost raportată pentru prima oară în anul 1993 de două grupuri diferite. Lipaza din *P. fluorescens* a condus la randament de 92%, M_n 7700 și PDI de 2.4 în sistem fără solvent la 75°C, după 10 zile. Similar, pentru δ -VL s-au obținut

mase moleculare de 1900, la 60°C. Alte lipaze, ca de exemplu *C. cylindracea* (lipase CC) și lipaza din pancreas de porc (PPL) au prezentat activitate pentru polimerizarea cu deschidere de ciclu. Acești poliesteri prezintă ca și grupări terminale o grupare carboxilică, respectiv o grupare hidroxil, indicând faptul că inițierea s-a realizat de către moleculele de apă, în lipsa altui inițiator [61], [130].

Cea de-a doua metodă pentru îmbunătățirea proprietăților poliesterilor este sinteza poliesterilor terminal funcționalizați prin metoda de inițiere. În această metodă, un nucleofil (alcool, amino sau zahăr) are rol de inițiator, pentru a induce polimerizarea enzimatică fiind apoi sintetizați poliesterii funcționalizați terminal [140].

Lipaza PPL s-a dovedit eficientă pentru polimerizarea cu deschidere de ciclu a ϵ -caprolactonei (ϵ -CL), folosind un inițiator multifuncțional, etil-glucopiranozidă (EGP) [141]. Produsele cu lungime variabilă a oligo-lanțului (ϵ -CL) ($M_n = 450, 2200$ Da) s-au format prin modificarea raportului ϵ -CL/EGP. Prin analiză structurală de tip 1H , ^{13}C , și COSY (^{13}C - ^{13}C) RMN s-a arătat că reacția a fost extrem de regiospecifică, adică lanțurile formate oligo (ϵ -CL) / oligo (TMC) pot fi legate printr-un ester / lanț carbonat exclusiv la radicalul hidroxil primar al EGP.

Toate aceste studii demonstrează o preocupare deosebită a cercetătorilor pentru obținerea de noi polimeri pe cale biocatalitică.

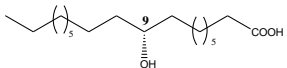
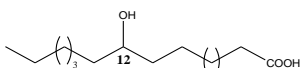
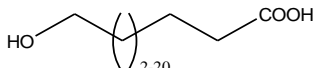
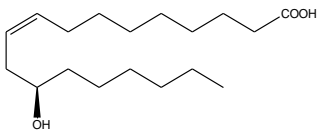
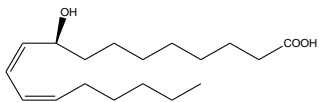
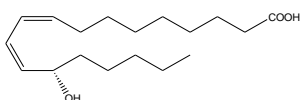
1.5. Hidroxi-acizi și estolide

Hidroxi-acizii grași (HFA) și derivații acestora aparțin unei clase de compuși de mare interes în multe domenii. Pe lângă faptul că sunt moleculele esențiale în multe procese biologice ei sunt folosiți într-o mare varietate de procese industriale și, mai recent, în domeniul chimiei materialelor. Din punct de vedere structural, hidroxi-acizii grași pot fi saturați sau nesaturați și pot să conțină una sau mai multe grupe hidroxil și un lanț lung ramificat cu o grupare carboxil terminală. Ei apar în natură ca și componente ale cerebrozidelor triacilglicerolilor, cerurilor, precum și altor lipide din animale, plante și microorganisme [142].

Spre deosebire de acizii grași nehidroxilați hidroxi-acizii grași (HFA) au reactivitate, miscibilitate în solvenți organici, stabilitate și vâscozitate ridicată și asta datorită prezenței grupării hidroxil în moleculă [143]. Astfel, ei sunt utilizați pe scară largă în industria cosmetică, chimică, farmaceutică [144] și a produselor alimentare. Proprietățile și utilizările industriale și medicinale ale unor hidroxi-acizi grași, incluzând mono-, di- și trihidroxi-acizi grași sunt centralizate în Tabel 1.13. Acidul 12-hidroxistearic este utilizat în principal ca agent de îngroșare pentru fabricarea unor unsoare lubrifiante. Acidul ricinoleic este utilizat pentru obținerea săpunurilor, în finisajele textile și în fabricarea ciocolatei [118], [145], [146].

HFA prezintă potențial farmaceutic, inclusiv anti-bacterian, anti-fungic, și activitate anti-diabetică [147], [148]. Polimerii sintetizați din hidroxi-acizi grași au unele avantaje față de polimerii derivați din petrol, cum ar fi o rezistență mai mare la căldură, substanțe chimice, flexibilitate mare, biocompatibilitate ridicată și toxicitate practic inexistentă [149].

Tabel 1.13. Exemple de hidroxi-acizi grași și aplicațiile acestora

Tipul de hidroxi acid gras	Întrebuințare	Proprietăți	Referințe
Acid 9R-hidroxiștearic 	α -inhibitor stereo-selectiv împotriva histon-deacetilazei umane (cancer de colon)	Produs secundar endogen a peroxidării lipidelor	[144]
Acid 12-hidroxiștearic 	-Polimer acrylic, cauciuc, ceară și unsoare -Eliberare hidrofobă de medicamente -Cosmetic și îngrijire personală (emolient) -Agent anticontractant pentru lână	Temperatură de topire ridicată, termostabil	[150]
ω -hidroxi acizi grași 	-Monomer polimeric ai fabricării plasticelor -Bactericid, fungicid și anticancerigen	Proprietăți asemănătoare poliesterilor, degradabil	[143]
Acid ricinoleic 	Emulsifiant, lubrifiant și dispersant Precursor de aromă Laxativ, eliberare de medicamente, aditiv în alimente și îngrijire personală	-Flexibilitate avansată, rezistență la căldură -Biocompatibil și biodegradabil	[151]
9S-HODE ¹ 	-Important în arteroscleroză ca și component major ai lipoproteine oxidate cu densitate scăzută și important în artrită reumatoidă -Activitate fungică	-Ligand PPAR- γ (antagonist)	[152]
13S-HODE ² 	-Inhibitor de adeziune a celulelor canceroase -Precursor de parfum -Activitate fungică		[153]

¹9S-HODE-acid 9S hidroxiocetadecadienoic, ²13S-HODE-acid 13S hidroxiocetadecadienoic, Ligand PPAR- γ -receptorul gamma activat de proliferatorul peroxizomilor,

30 Studiu de literatură-1

Enzimele/microorganismele utilizate pentru hidratarea/hidroxilarea acizilor grași din animale, plante sau microorganisme produc peste 100 de tipuri de hidroxi-acizi. 12-hidroxilazele [144], lipoxigenazele [154], și citocrom P450 monooxigenazele (P450) [155] din plante produc hidroxi-acizii grași acid ricinoleic (12-OH 18:1 Δ 9Z), acid 12-hidroxiștearic (12-OH 18:0), acid 13-hidroxiocetadecadienoic (HODE), cât și acizi ω -hidroxi grași. În Tabel 1.14 sunt prezentate câteva exemple de hidroxi-acizi grași sintetizați pe cale enzimatică.

Tabel 1.14 Obținerea HFA pe cale enzimatică/microbiană

Microorganism	Substrat ¹	Produs ²	Metodă	Referințe
<i>Bacillus megaterium</i> ALA2	LA	12,13,17-TODE	Conversie cu celule	[146]
<i>Flavobacterium</i> sp. DSS	OL	10-HSA	Conversie cu celule	[156]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	OA	10-HSA	Conversie cu celule	[157]
	EA	DED		
	OL	DOD	Conversie cu celule	[158]
	PTA	DHD	Conversie cu celule	[159]
	TOL	DOD	Conversie cu celule	[70]
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	OA	DOD	Conversie cu celule	[160]
	OA	RA	Conversie cu celule	[161]

¹LA-acid linoleic, OL-ulei de măsline, OA-acid oleic, EA-acid eicosenoic, PTA-acid palmitoleic, TOL-trioleină,

²12,13,17-TODE-acid 13,13,17 trihidroxiocetadecenoic, 10HSA-acid 10-hidroxiștearic, DED-acid 9,12-dihidroxi-10-eicosenoic, DOD-acid dihidroxiocetadecenoic, DHD-acid dihidroxihexadecenoic, RA-acid ricinoleic

În continuare vor fi prezentați hidroxi-acizii care au fost utilizați ca substraturi în vederea sintezei estolidelor din capitolul de contribuții originale, cât și cele mai relevante informații din literatură despre estolide.

1.5.1. Acidul 10-hidroxiștearic (10HSA)

10HSA (Figura 1.15) a fost sintetizat pe cale enzimatică în anul 1962, când s-a utilizat o tulpină din *Pseudomonas*, iar randamentul a fost de 14%. De atunci, hidratarea acidului oleic cu formare de 10HSA a fost demonstrată și prin intermediul tulpinilor microbiene precum *Nocardia (Rhodococcus)*, *Corynebacterium*, *Sphingobacterium*, *Micrococcus*, *Absidia*, *Aspergillus*, *Candida*, *Mycobacterium* și *Schizosaccharomyces*, *Sarcina lutea*, sau microorganisme din compost precum NRRL B-14797 [162].

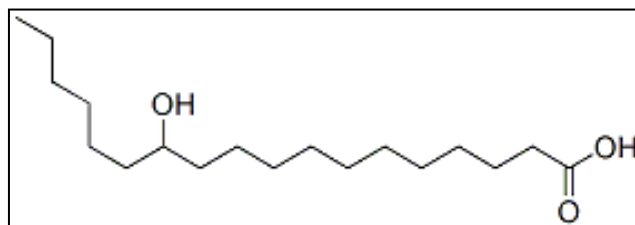


Figura 1.15 Structura acidului 10HSA

Stereospecificitatea 10HSA este dependentă de tipul de microorganism. *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 12674 a condus la formarea unui amestec de enantiomeri, speciile *Pseudomonas* NRRL B-3266 produc 10(*R*)-HSA pur. *Sphingobacterium* produce 10(*R*)-HSA și un procent de 2–18% 10(*S*)-HSA, iar specia *Flavobacterium* DS5 produce 66% 10(*R*)-HAS [148].

Deși există numeroase studii în care s-a raportat obținerea 10HSA, până în prezent acest compus nu a fost utilizat ca substrat pentru sinteza estolidelor.

Oleat hidrataza

Oleat hidrataza (OHaza) este o hidroliază investigată recent, care catalizează hidratarea legăturilor duble C=C izolate ale acizilor grași. Cel mai comun exemplu este acidul oleic, care în prezența OHazei conduce la formarea acidului 10HSA (Figura 1.16) [162].

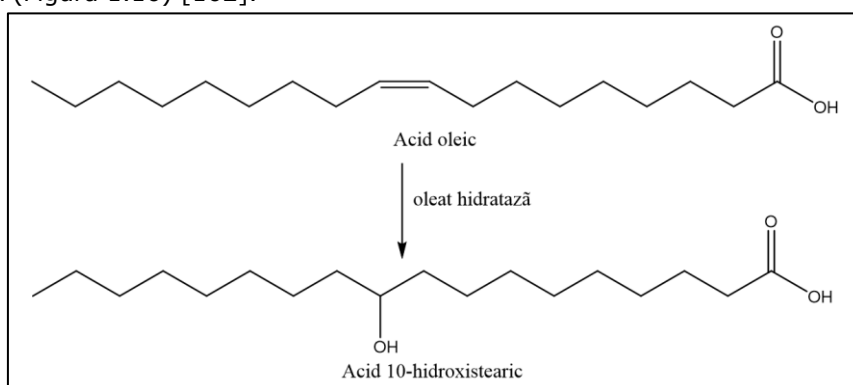


Figura 1.16 Sinteza enzimatică a 10HSA din acid oleic

Din punct de vedere structural OHaza este dimer cu masa moleculară de aproximativ 77.9 kDa. S-a demonstrat că toate hidratazele prezintă cofactorul FAD. Structura cristalină a oleat hidratazei din *L. acidophilus* a fost raportată recent, iar pe baza similarităților structurale cu alte enzime FAD-dependente s-au identificat 4-domenii. Domeniul 1 care (D1) este format dintr-un amestec de α -helixuri și foi β -pliate, domeniul 2 conține situsul de legare a FAD-ului iar domeniile 3 și 4 cuprind doar α -helix-uri. Autorii au observat că ultimul domeniu prezintă similarități cu domeniul N-terminal al acilglicerol lipazei din *Archaeoglobus fulgidus* [163].

În ultimii ani, tot mai multe enzime au fost desemnate ca oleat hidrataze, iar cele mai relevante dintre acestea sunt prezentate în Tabelul 1.15. Specificitatea

de substrat a OHazelor este diferită în funcție de sursa microbiană, cu toate că există condiții comune ale substraturilor pentru toate hidratazele: să conțină grupare carboxil, lungimea minimă a acidului gras să fie C14, dubla legătură să fie în conformație *cis* [162].

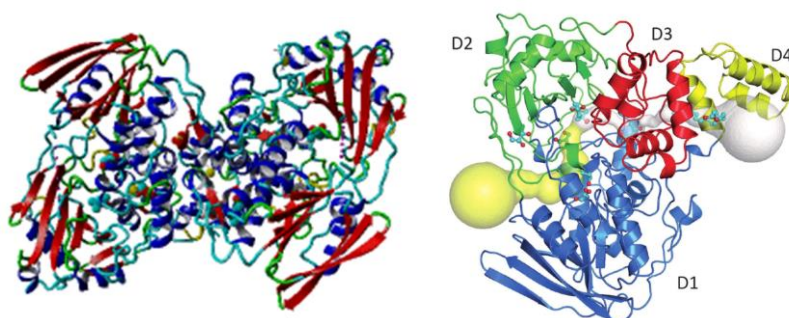


Figura 1.17 Structura tridimensională a oleat hidratazei din *L. acidophilus* [162]

Studiile referitoare la caracterizarea OHazei au indicat o stabilitate și un optim de temperatură relativ scăzut, dar cu toate acestea până în prezent nu s-au studiat metode de stabilizare a acestei enzime.

Tabel 1.15 Specificitatea oleat hidratazelor izolate din diferite surse microbiene

Microorganism	Substraturi testate		Referința
	Activitate enzimatică(+)	fără activitate (-)	
<i>Macrococcus caseolyticus</i>	acid oleic acid miristoleic acid palmitoleic acid linoleic acid α -linolenic acid γ -linolenic	acid lauric acid miristic acid palmitic acid stearic acid arachidic acid petroselinic acid elaidic acid vaccenic acid arachidonic acid erucic acid nervonic	[164]
<i>Streptococcus pyogenes</i> M49	acid oleic acid palmitoleic acid linoleic acid linolenic	acid miristoleic acid elaidic acid eicosatrienoic acid arachidonic trilinoleiglicerol	[165]
<i>Bifidobacterium breve</i> NCIMB 702258	acid palmitoleic acid oleic acid linoleic	acid miristoleic acid vaccenic acid elaidic acid rumenic acid linolenic acid arachidonic	[166]

<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	acid oleic acid palmitoleic acid linoleic acid α -linoleic acid γ -linoleic acid miristoleic		[167]
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	acid oleic acid palmitoleic acid γ -linolenic acid linoleic acid miristoleic acid α -linolenic	Acid miristic acid palmitic acid stearic acid arachidic acid petroselinic acid elaidic acid vaccenic acid arachidonic acid erucic acid nervonic	[168]
	hidrolizat de ulei de măsline acid ricinoleic		[169]

1.5.2. Acidul 12-hidroxistearic (12HSA)

12HSA (Figura 1.18) se obține prin hidrogenarea uleiului de ricin, urmată de saponificare cu diferite săruri. Ca și produs secundar se poate obține acid stearic [150].

12HSA este utilizat la scară largă pentru fabricarea unor unsori de calitate ridicată. Acești compuși sunt stabili și prezintă numeroase proprietăți favorabile. 12HSA este folosit ca ingredient pentru sinteza cerurilor, ca agent de finisare în industria automobilelor și la fabricarea electrocasnicelor. În industria cosmetică se utilizează ca agent de strălucire pentru diferite soluții, sau poate fi încorporat în creme reci pentru a crește vâscozitatea [144].

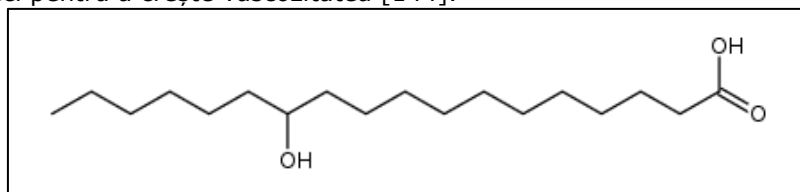


Figura 1.18 Structura acidului 12HSA

În vopsele este utilizat la obținerea esterilor acrilici, iar în pentru cauciucuri este utilizat ca și activator și lubrifiant.

1.5.3. Acidul ricinoleic (RCA)

RCA (Figura 1.19) se obține din uleiul de ricin prin hidroliză, în general în condiții bazice, utilizând NaOH [170]. Principalele utilizări includ materiale de acoperire, materiale plastice, cerneluri și cosmetice.

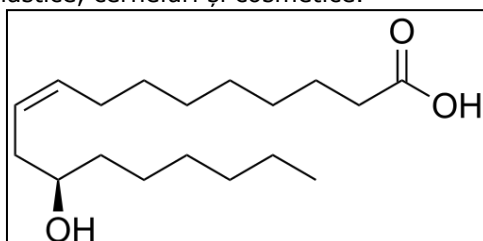


Figura 1.19 Structura acidului RCA

RCA este utilizat ca materie primă pentru sinteza macrolactonelor sau a poliesterilor, dar și ca substanță de tratament pentru inflamații ale pielii, pentru pecingine, cheratoză și infecții fungice. Sărurile cuaternare de amoniu a RCA și a hidroxi stearaților au fost folosite în produsele cosmetice pentru îngrijirea pielii și a părului, germicide și agenți de prelucrare pentru textile [150].

Deși există un număr mare de rapoarte despre biotransformarea lipidelor cu lipaze, există puține studii privind polimerizarea hidroxi-acizilor grași catalizate de aceste enzime. În 1989, Yamaguchi ș.a. au fost primii care au raportat esterificarea enzimatică a RCA în două etape, pentru a obține estolide cu un randament ridicat. Mai târziu, aceiași autori au arătat importanța controlului cantității de apă prezentă în mediul de reacție și avantajul folosirii lipazelor imobilizate. Randamentul reacției a fost îmbunătățit, iar produsul obținut a atins valori ale indicelui de aciditate (AV) de 40 [171].

Pentru îmbunătățirea reacției de obținere a estolidelor RCA au fost testate: [172]

- (i) îmbunătățirea suporturilor de imobilizare;
- (ii) încapsularea lipazelor în micelii;
- (iii) optimizarea condițiilor de reacție în bioreactor, pentru a crește calitatea și volumul producției de estolide.

1.5.4. Acidul 16-hidroxihexadecanoic (16HHDA)

Acidul 16-hidroxihexadecanoic (Figura 1.20) cunoscut și sub numele de acid 16-hidroxi palmitic sau acid juniperic este un metabolit al acidului palmitic obținut prin ω -hidroxilarea acidului palmitic de către citocromul P450 în plante și animale. În plante este un component al cutinei.

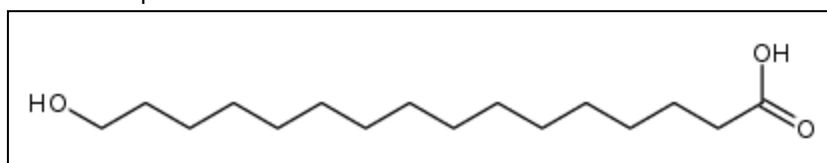


Figura 1.20 Structura acidului 16-hidroxi palmitic

1.5.1. Estolidele

Estolidele (Figura 1.21) sunt oligomeri naturali formați în general din hidroxi-acizi grași. Estolidele prezintă vâscozitate ridicată, stabilitate oxidativă bună și biodegradabilitate ridicată, de aceea prezintă potențial considerabil pentru obținerea de lubrifianți, plastifinanți, aditivi cosmetici și componente în vopsele [173].

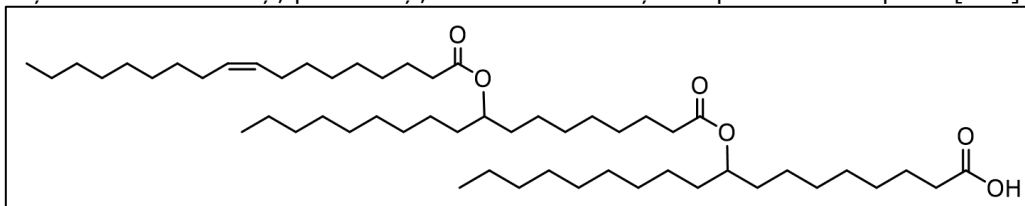


Figura 1.21. Structura general a estolidelor

Pe cale chimică, estolidele pot fi sintetizate la temperaturi și presiuni ridicate, din hidroxi-acizi [174].

A doua legătură esterică din structura estolidelor este mult mai robustă comparativ cu trigliceridele, iar hidroliza este îngreunată. Acest aspect structural al estolidelor trebuie conferă proprietăți superioare la temperaturi scăzute, în plus față de proprietățile inerente ale acidului gras. Biodegradabilitatea estolidelor a fost de asemenea demonstrată [175].

Anumiți hidroxi esteri, ca de exemplu esterii etilici ai acidului 3-hidroxibutiric, 4-hidroxibutiric, 5-hidroxihexanoic, 6-hidroxihexanoic, 5-hidroxidodecanoic și 15-hidroxipentadecanoic au fost polimerizați enzimatic, iar poliesterii corespunzători au avut mase moleculare medii cuprinse în intervalul 3.800-5.400g/mol [122].

O clasă nouă de estolide complexe, cu proprietăți termice superioare la temperaturi scăzute, au fost sintetizate din acid oleic și acizi grași saturați în diferite combinații, utilizând acid percloric ca și catalizator. Separarea s-a realizat prin distilare Kugelrohr, iar randamentele au fost între 45 și 65%. Estolidele saturate și esterii simplii au prezentat proprietăți fizice foarte diverse [176].

Homo-estolidele simple ale acidului oleic au prezentat stabilitate oxidativă mai bună decât fluidele pe bază de uleiuri vegetale sau petrol, când au fost formulate cu o cantitate scăzută de stabilizator oxidativ.

Estolidele acidului ricinoleic au fost sintetizate prin utilizarea lipazei native și imobilizate din *Candida rugosa*, la temperatură moderată, într-un bioreactor. Lipaza din *C. rugosa* a fost imobilizată pe 10 suporturi diferite prin legare covalentă și adsorbție fizică și fost selectat derivatul imobilizat cel mai eficient, pe baza cantității de enzimă imobilizată raportată la activitatea obținută. O rășină schimbătoare de anioni a fost considerată a fi cea mai eficientă [118]. O altă lipază imobilizată prin adsorbție pe CaCO_3 , *Staphylococcus xylosus* lipase 2 (SXL2), a fost utilizată pentru sinteza estolidelor de RCA, atât în sistem cu solvent organic cât și fără solvent. Conversii de aproximativ 65% au fost obținute în sistem fără solvent, la 55°C. Structura estolidei a fost demonstrată prin LC-MS, FT-IR și ^{13}C -RMN [177].

Poliesteri cu mase moleculare mari (DP 10) au fost sintetizați enzimatic pornind de la acid 10-hidroxidecanoic și 11-hidroxiundecanoic, utilizând lipaza din *C. rugosa* ca și catalizator. În cazul acidului 11-hidroxiundecanoic au fost obținute mase moleculare de aproximativ 22000, în prezența sitelor moleculare.

În cazul hidroxi-acizilor, reactivitatea acestora în reacții de policondensare a scăzut în următoarea ordine: acid 16-hidroxihexadecanoic \approx acid 12-

hidroxidodecanoic \approx acid 10-hidroxi-decanoic $>$ acid 6-hidroxi-hexanoic. S-a afirmat că în reacțiile de policondensare lipazele prezintă reactivitate mai mare față de monomerii cu catenă mai lungă datorită unui efect de activare mai puternic al substraturilor mai hidrofobe [122].

1.6. Biomateriale pe bază de uleiuri vegetale și aplicațiile lor

Așa cum arată datele unui raport publicat în SUA, anual se produc peste 18 milioane de livre de ulei de soia peste necesar, valoarea acestuia depășind 300 de milioane de lire sterline. Utilizarea acestui surplus de ulei devine efectiv o mare problemă economică în comunitatea agricolă din SUA [146].

În ultima vreme, sinteza de polimeri utilizând uleiuri vegetale ca materii prime cu costuri reduse a fost intens studiată, fapt dovedit de numărul mare de brevete din ultimii ani [178].

Printre aplicațiile care utilizează uleiuri vegetale (Figura 1.22) ca materii prime se numără surfactanții, produsele cosmetice și lubrifiantii [179]. Datorită costurilor relativ scăzute, uleiurile vegetale și acizii grași saturați și nesaturați derivați sunt considerate cele mai importante materii prime regenerabile din industria chimică pentru obținerea de biopolimeri funcționali și materiale polimerice [180].

Reacțiile de polimerizare a uleiurilor sunt cunoscute de mult timp, polimerizarea termică a uleiului de in a fost încercată pentru prima dată în anul 1830, iar producții de polimerizare a uleiurilor sau acizilor grași sunt disponibile începând din acea perioadă [181].

Până în prezent, pentru funcționalizarea acizilor grași pentru obținerea de monomeri utili în reacțiile de polimerizare s-au utilizat metode precum hidroxilarea, epoxidarea și ozonoliza.

Uleiurile vegetale și esterii au indici de vâscozitate și proprietăți lubrifiante superioare uleiurilor minerale. Totuși, esterii sintetici sunt de 2-6 ori mai scumpi decât uleiurile vegetale [175].

Uleiurile acrilate sunt co-monomeri excelenți pentru sinteza latex-ului. Grefarea monomerilor acrilici pe rețele de poliuretani pe bază de ulei de soia a condus la obținerea unor materiale hibride a căror stabilitate termică și mecanică a fost semnificativ îmbunătățită. Derivați de ulei de soia epoxidat s-au sintetizat cu succes din utilizând 2-hidroxi-etil acrilat, în prezența unui catalizator acid puternic (HBF_4) rezultând produși cu vâscozitate scăzută, cu un grad ridicat de acrilare [182].

Uleiul de soia a fost utilizat pentru sinteza adezivilor prin metode chimice, iar proprietățile fizice și mecanice i-au încadrat drept adezivi sensibili la presiune (o categorie foarte importantă de adezivi). Acești adezivi se utilizează la benzi autoadezive, etichete, timbre etc. Au fost obținute geluri adezive utilizând poliesteri funcționalizați cu grupări carboxil, sintetizați prin reacții de policondensare ale dimerilor acizilor grași și a diolilor grași în combinație cu trigliceride. Stabilitatea termică și transparența optică a acestor adezivi sunt caracteristici importante pentru produse electronice ca display-uri, semiconductori și celule solare.

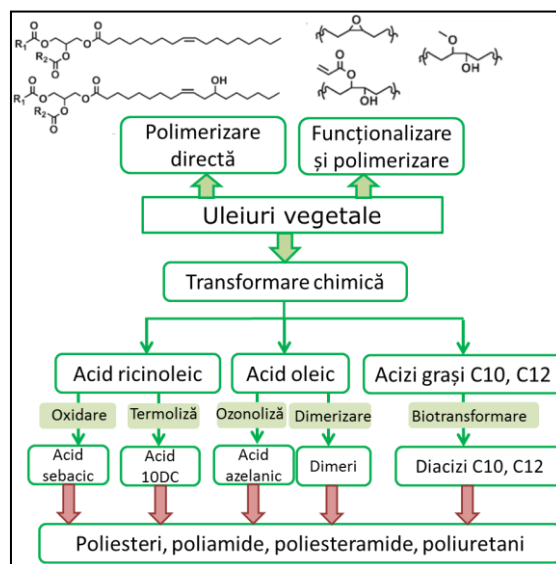


Figura 1.22 Metode generale de sinteză a polimerilor pe bază de uleiuri vegetale

Uleiul de in a fost epoxidat și transformat în rășină cu grupări carboxil prin reacție cu dietanolamină și anhidridă ftalică în două etape.

Datele de literatură arată că polimerizarea acizilor grași a fost inițiată prin formarea de dimer sau policondensare, utilizând catalizatori la temperaturi mai ridicate și cele mai multe rapoarte au sugerat că este necesară modificarea catalizatorilor și a condițiilor de proces pentru a favoriza obținerea produșilor pentru aplicații dorite.

Pentru a evita problemele întâlnite în timpul reacțiilor de policondensare, în ultimul timp a fost sugerată și utilizarea lipazelor comerciale ca biocatalizatori. Matsumura ș.a. a raportat posibilitățile de policondensare și producția de materiale polimerice, folosind diferite enzime bacteriene, inclusiv lipaza din *C. antarctica* [183].

Aplicațiile materialelor polimerice pe baza de uleiuri vegetale nu se limitează doar la cele din domeniul industrial, ci pot fi extinse la o varietate de aplicații biomedicale ca adezivi chirurgicali, pansamente farmacologice, plasturi și sisteme de eliberare treptată a medicamentelor. De exemplu, poli(glicerin) sebacatul a fost utilizat în ingineria țesuturilor moi ca retina, nervii, vasculare și repararea țesutului miocardic. Derivații acidului ricinoleic și sebacic au fost utilizați ca sisteme de eliberare treptată de medicamente, în special sub formă lichidă, care să poată fi injectate. Astfel, formulările încărcate cu *cis*-platină și paclitaxel au avut rezultate promițătoare pentru localizarea și livrarea agenților antitumorali. Aceiași polimeri au fost folosiți pentru eliberarea controlată a medicamentelor proteice și peptidice, a anestezicelor locale și sulfatului de gentamicină pentru tratamentul osteomielitei [184].

Obiectivele principale ale tezei de doctorat sunt:

1. Creșterea stabilității oleat hidratatei 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 hidratată și lipază.

2.2. Imobilizarea oleat hidratatei din *Elizabethkingia meningoseptica*

Izolarea și utilizarea enzimelor izolate ca biocatalizatori în diferite reacții prezintă avantaje deosebite, ca obținerea unor concentrații mai ridicate de produs, evitarea eventualelor reacții secundare, dar și simplificarea etapei de purificare a produșilor în comparație cu reacțiile în care produsul de reacție se formează intracelular. Cu toate acestea, enzimele izolate pot prezenta sensibilitate ridicată în condiții de sinteză care implică solvenți organici, valori extreme ale pH-ului sau temperaturi ridicate.

O metodă folosită adesea cu succes pentru îmbunătățirea performanțelor operaționale ale enzimelor, cu aplicabilitate la nivel industrial, este imobilizarea [185].

Oleat hidratata (OHaza) o enzimă recent izolată din mai multe surse microbiene, este responsabilă pentru hidratarea/hidroxilarea acidului oleic la acid 10-hidroxistearic și prezintă importanță datorită regio- și stereoselectivității sale față de acizi grași nesaturați.

Unul dintre impedimentele majore pentru utilizarea OHazei în scopuri industriale este stabilitatea sa scăzută, chiar și la temperatură ambiantă. Cel mai probabil, inactivarea termică se datorează disocierii subunităților, care poate implica și disocierea co-factorului FAD [186].

Deși numărul de publicații din ultimii ani despre oleat hidratată este destul de însemnat [162], imobilizarea acestei enzime nu a fost raportată până în prezent.

În condițiile în care nu există un protocol pentru alegerea celei mai eficiente metode de imobilizare în funcție de structura enzimei, în acest subcapitol au fost testate o varietate de metode de imobilizare, cu scopul de a obține un preparat de hidratată imobilizată cu performanțe ridicate.

Enzima nefiind disponibilă comercial, a fost necesară purificarea și caracterizarea ei în laborator, ceea ce s-a realizat cu oleat hidratată din *Elizabethkingia meningoseptica* exprimată în celule *E. coli* TOP 10.

2.2.1. Purificarea și caracterizarea oleat hidratizei

2.2.1.1. Purificarea oleat hidratizei

Obținerea și purificarea OHazei s-a realizat în laboratorul de Microbiologie MLII din cadrul grupului de Biotehnologie și Biocataliză al Universității Tehnice din Delft, Olanda.

OHaza a fost obținută din celule de *E. coli* TOP 10 care conțineau plasmidul pBAD-HISA-OH. Etapele au implicat cultivarea celulelor *E. coli*, inducerea lor și obținerea extractului celular care a fost supus procesului de purificare. OHaza a fost anterior modificată genetic și prezintă structura de 6 Histidine (His-Tag), ceea ce a simplificat procesul de purificare fiind necesară o singură etapă de separare prin cromatografie de afinitate conform metodei descrise în paragraful 3.2.2. Purificarea s-a realizat utilizând coloana His-Trap HP cu ioni de Ni^{2+} conectată la un sistem FPLC (GE Healthcare) capabilă să rețină enzimele care prezintă acest tip de secvență de aminoacizi. Eluția proteinei de interes s-a realizat cu soluție tampon cu un conținut ridicat de imidazol și a fost monitorizată prin detecție UV-VIS la 390 nm, lungime de undă caracteristică enzimelor cu FAD ca și cofactor (Figura 2.2).

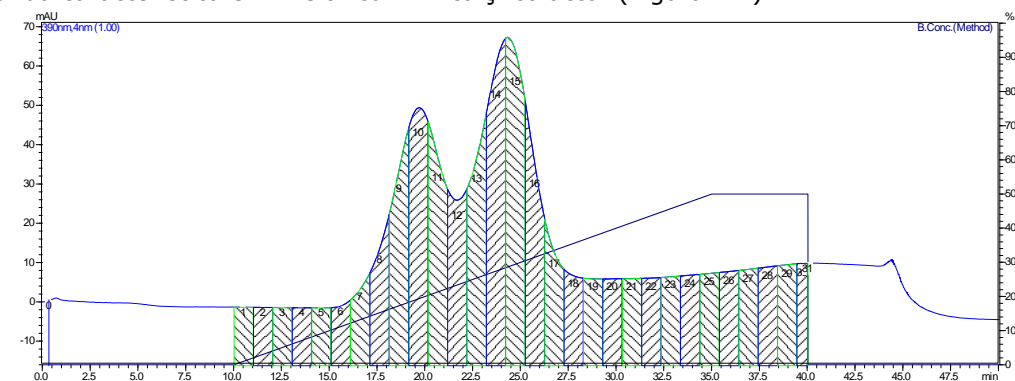


Figura 2.2 Cromatograma HPLC de eluție a OHazei de pe coloana Ni-NTA His Trap la 280nm respectiv 390nm.

Procesul de purificare a fost monitorizat prin electroforeză (metoda 3.3), o metodă mult folosită pentru vizualizarea proteinelor. Ulterior fracțiile care au conținut proteina de interes au fost colectate, concentrate și desalinizate.

Analiza calitativă a fracțiilor colectate s-a realizat prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă (SDS-gel) (Figura 2.3, linia A2), indică prezența unei benzi singulare la o valoare a masei moleculare de aproximativ 76 kDa, care confirmă puritatea ridicată a proteinei. Valoarea masei moleculare este apropiată de valoarea de 77,9 kDa calculată pentru oleat hidratază pe baza secvenței de 646 amino acizi, la care se adaugă catena de 6 histidine.

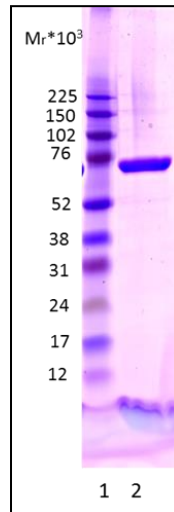


Figura 2.3 Analiza prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă a OHazei purificate (Linia 1: Standard, Linia 2: OHaza)

Analiza cantitativă a oleat hidratazei s-a realizat prin metoda BCA prezentată în secțiunea 3.4.1, iar activitatea a fost evaluată utilizând ca substrat acid oleic, conform metodei 3.5. Activitățile specifice au fost calculate conform relației:

$$\text{Activitatea specifică [U/g]} = \left(\frac{\mu\text{mol 10HSA}}{\text{timp [min]} \times \text{cantitatea de enzimă [g]}} \right)$$

Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabel 2.1. și indică faptul că din cele trei lot-uri de OHază purificată primele două au fost reproductibile iar activitatea celui de-al treilea a fost afectată probabil datorită unor modificări din timpul procesului de cultivare.

Tabel 2.1. Conținutul de proteine și activitatea OHazei purificate

Lot	Concentrație de proteină [mg/mL]	Activitate specifică [U/g]
1	11,74	113,24
2	11,68	104,64
3	6,48	59,12

2.2.1.2. Caracterizarea oleat hidratazei

După purificarea enzimei au fost determinate valorile optime ale parametrilor care influențează activitatea OHazei: pH-ul, temperatura, concentrația de NaCl, respectiv aditivul utilizat.

➤ Influența pH-ului

Influența pH-ului asupra activității oleat hidratazei a fost studiată în domeniul de pH 4,0-9,0. În acest sens a fost determinată activitatea OHazei conform metodei 3.7,

utilizând ca mediu de reacție soluții tampon preparate adecvat fiecărui interval de pH, conform Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Sărurile utilizate pentru soluții tampon cu diferite valori de pH

Sarea	Intervalul de pH
Acetat de sodiu	4,0÷4,5
Citrat monosodic	5,0÷5,5
Fosfat monosodic/disodic	6,0÷7,5
Tris(hidroximetil)aminometan (TRIS)	8,0÷9,0

Rezultatele prezentate în Figura 2.4 Influența pH-ului asupra activității OHazei native (curba roșie), exprimate ca activitate relativă în funcție de pH, indică faptul că OHaza prezintă două valori maxime ale activității, la pH 6,5 și 8,0.

Pentru a elimina efectul anionului asupra activității OHazei, care pentru unele enzime poate fi semnificativ, s-a realizat un al doilea studiu în care s-a utilizat un sistem de doi acizi și o sare (acid boric, acid citric și trifosfat de sodiu, [187]), foarte util pentru prepararea soluțiilor tampon cu domeniu larg de pH. A fost în acest fel posibilă evaluarea influenței pH-ului asupra activității OHazei în domeniul 4,0-9,0 în prezența aceluiași anioni și cationi.

Conform Figura 2.4 (curba roșie) activitatea OHazei nu este influențată semnificativ de natura anionilor prezenți în soluție, fiind observate și în acest caz două valori maxime ale activității, la aceleași valori de pH 6,5 și 8,0.

Pe baza acestor rezultate, studiile următoare au fost realizate la pH 8,0, în soluție tampon 20 mM TRIS/HCl.

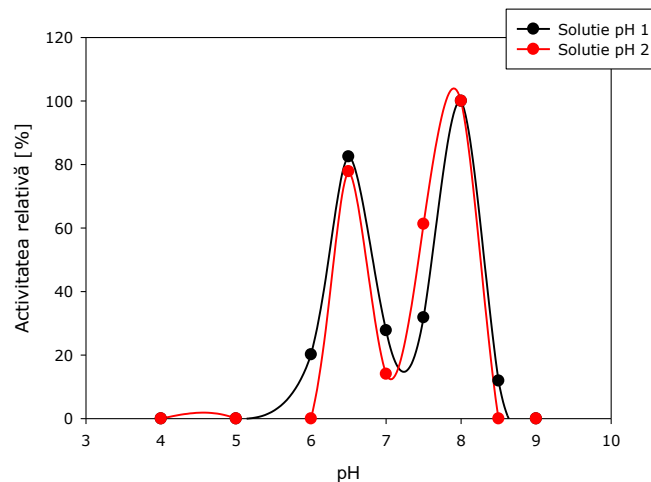


Figura 2.4 Influența pH-ului asupra activității OHazei native

➤ Efectul temperaturii asupra activității

Efectul temperaturii asupra activității OHazei a fost determinat în intervalul 30°C-50°C. Soluția de enzimă a fost incubată timp de 2 ore la valori prestabilite de temperatură, urmată de răcire pe baie de gheață, după care a fost determinată activitatea conform metodei 3.8.

2.2. Imobilizarea oleat hidratatei din *Elizabethkingia meningoseptica* 43

Valorile activităților relative reprezentate în funcție de temperatură (Figura 2.5) indică o sensibilitate ridicată a OHazei la temperatură, rezultând pierderi ale activității de aproximativ 20 % la o creștere a temperaturii cu numai 5°C. Ținând seama de acest rezultat, studiile ulterioare au fost efectuate la temperatura de 30°C.

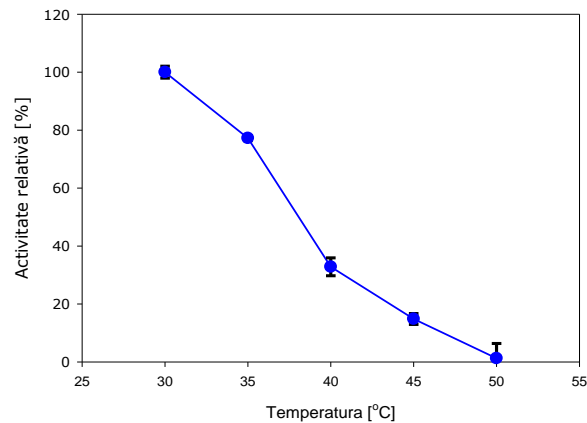


Figura 2.5 Efectul temperaturii asupra activității OHazei

➤ Efectul concentrației de NaCl

Prezența NaCl poate avea un efect semnificativ asupra activității enzimelor prin creșterea tăriei ionice a sistemului de reacție, iar o concentrație mare favorizează legarea cu substraturile hidrofobe. Activitatea OHazei fost evaluată la diferite concentrații de NaCl (conform metodei 3.5), în intervalul [0-200 mM]. Rezultatele prezentate în Figura 2.6 indică faptul că prezența NaCl în mediul de reacție este foarte importantă, fiind observată o creștere cu aprox. 30% a activității în comparație cu valoarea obținută în absența NaCl. Valoarea cea mai ridicată (214,35 U/mg) s-a obținut la o concentrație de NaCl de 150 mM, concentrație care a fost folosită în studiile următoare.

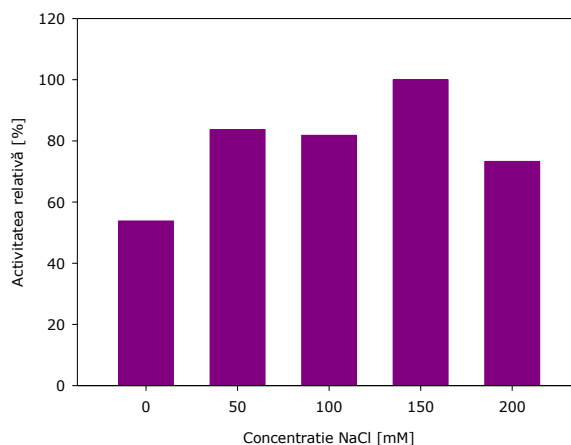


Figura 2.6 Influența concentrației de NaCl asupra activității OHazei

2.2.2. Efectul aditivilor asupra activității și stabilității la 4°C

Compușii cei mai utilizați pentru stabilizarea enzimelor/proteinelor sunt polioli și zaharurile [75]. Efectul stabilizator al acestor derivați este asociat cu creșterea vâscozității soluției, care contribuie la menținerea complexului enzimatic în stare activă și implicit la creșterea stabilității. În cadrul acestui studiu au fost testați ca și agenți de stabilizare următorii polioli și zaharuri: sorbitol, polivinil alcool, polietilen glicol, trehaloză și maltodextrină. Conform datelor de literatură, concentrația maximă a acestor aditivi nu poate depăși 15% deoarece la valori mai mari se poate produce precipitarea enzimei. Pentru acest studiu s-au pregătit probe de OHază (mg/mL) diluate în soluție tampon 20 mM TRIS/HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0, în care s-au adăugat aditivi (concentrație finală 2%) și care au fost păstrate diferite intervale de timp la 4°C, după care s-a determinat activitatea conform metodei descrise în paragraful 3.5.

Rezultatele prezentate în Figura 2.7 indică faptul că după 7 zile activitatea regăsită a fost de 2 ori mai mare în comparație cu OHaza fără aditivi. În plus, se poate observa că unii aditivi au avut efect activator asupra OHazei în primele 24h, urmat de o scădere semnificativă a activității în următoarele 24h, aceasta menținându-se totuși la o valoare considerabil mai mare decât în absența aditivului. Efectul activator cel mai pronunțat (valoarea activității de 4 ori mai ridicată după 24 de ore) a fost obținut în cazul sorbitolului și al PEG 8000. Pe termen lung sorbitolul s-a dovedit cel mai eficient, urmat de trehaloză (activitatea de 2,4 ori mai mare după 7 zile).

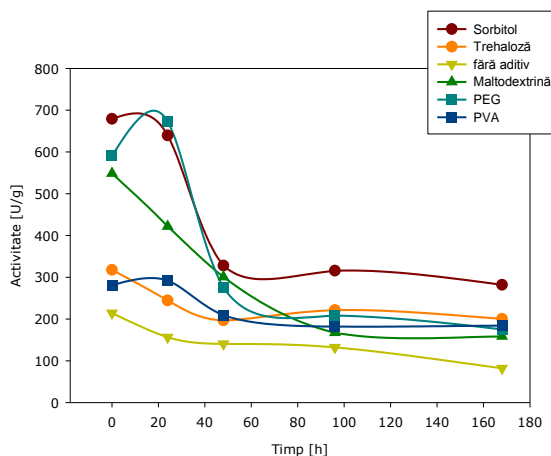


Figura 2.7 Efectul aditivilor asupra activității și stabilității OHazei, la o concentrație de aditiv de 2%

Pe baza acestor rezultate, s-a investigat efectul concentrației celor mai eficienți aditivi, sorbitolul și trehaloza, asupra activității OHazei în intervalul de concentrații 0-10%. Conform Figura 2.8, concentrația optimă de aditiv a fost de 5% în cazul sorbitolului și 3% în cazul trehalozei.

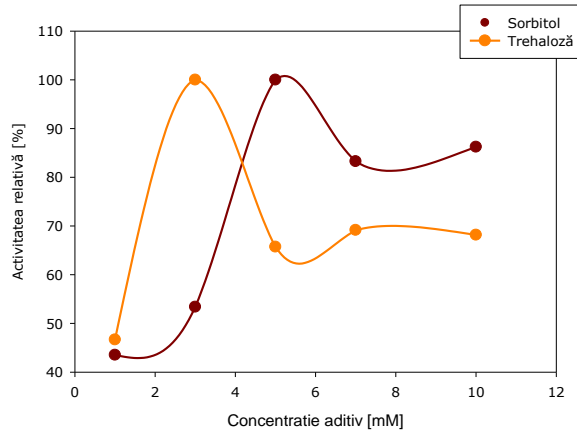


Figura 2.8 Efectul concentrației de sorbitol și trehaloză asupra activității hidratatei.

2.2.3. Imobilizarea OHazei prin diferite metode

În pofida numărului ridicat de publicații care au ca obiect imobilizarea enzimelor, nu există un protocol universal valabil pentru alegerea celei mai eficiente metode. Până în prezent, imobilizarea oleat hidratatei nu a fost raportată în literatură. Deși OHaza prezintă interes aplicativ ridicat, probabil că stabilitatea scăzută *in vitro* reprezintă cel mai important obstacol pentru utilizarea acestei enzime la scală largă.

În cadrul acestui subcapitol s-a propus selectarea metodei de imobilizare cea mai adecvată pentru OHază în termeni de activitate, stabilitate și utilizare în mai multe cicluri de reacție. Pentru o selecție cât mai rațională a metodelor de imobilizare, s-a efectuat o analiză structurală a enzimei. Deoarece structura cristalină a OHazei din *E. meningoseptica* nu a fost încă determinată, s-a utilizat modelul omolog al OHazei din *L. acidophilus* pe baza secvenței de aminoacizi, folosind aplicația YASARA [188].

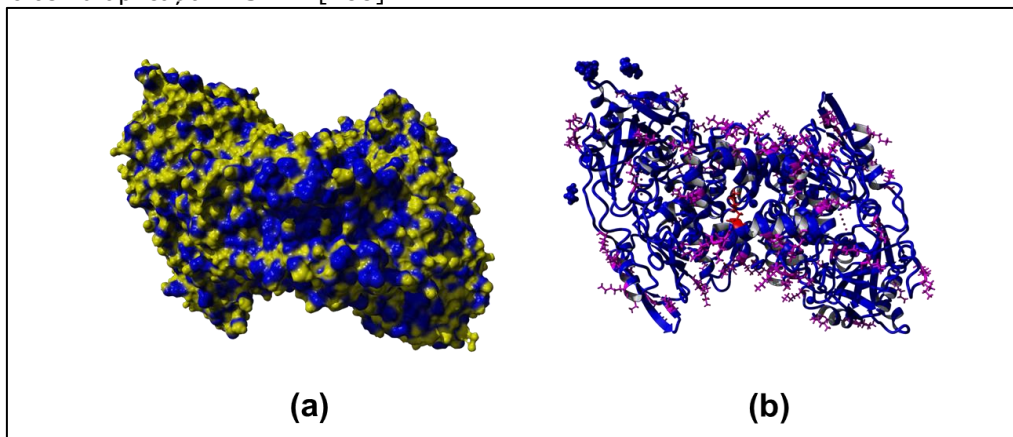


Figura 2.9 Harta hidrofobă a OHazei: suprafața hidrofobă (albastru) și suprafața hidrofilă (galben) (a). Diagrama structurii OHazei, cu evidențierea resturilor de lizină (roz) (b).

Harta hidrofobă a enzimei, ilustrată în Figura 2.9a indică un echilibru între cele două tipuri de suprafețe, hidrofilă și hidrofobă, în timp ce numărul relativ ridicat de lizine disponibile pe suprafața enzimei (Figura 2.9b) pot fi utile pentru imobilizarea prin legare covalentă.

Pe lângă aceste metode de imobilizare, care sunt recomandate de aspectele structurale ale enzimei, au mai fost investigate și alte metode ca entraparea în matrici de sol-gel și înrețelarea (cross-linking), care s-au dovedit a fi eficiente în cazul unui mare număr de enzime [189], [190].

Având în vedere aceste considerente, au fost testate următoarele metode de imobilizare: adsorbția (metoda 3.6.1), imobilizarea prin afinitate (metoda 3.6.2) imobilizarea prin interacțiuni ionice (metoda 3.6.3) înrețelarea (metoda 3.6.5), legarea covalentă utilizând suporturi funcționalizate cu grupări amino (metodele din secțiunea 3.6.4), cât și entraparea în matrici de sol gel (metoda 3.6.6.).

Metodele de imobilizare au fost comparate pe baza valorilor obținute pentru activitatea recuperată după imobilizare, iar randamentele de imobilizare și activitățile specifice sunt prezentate centralizat în Tabel 2.3.

Randamentul de imobilizare și activitatea regăsită au fost calculate conform relațiilor

$$\text{Activitatea regăsită} = \left(\frac{\text{activitatea calculată}}{\text{activitatea inițială}} \right) \times 100$$

$$\text{Randamentul de imobilizare} = \left(\frac{P_0 - (P_{liq} + P_w)}{P_0} \right) \times 100$$

În care: P_0 - cantitatea inițială de proteină [mg/mL]

P_{liq} - conținutul de proteine în lichid la sfârșitul imobilizării [mg/mL]

P_w - suma conținutului de proteine în apele de spălare [mg/mL]

Tabel 2.3. Influența metodei de imobilizare asupra activității

Metoda de imobilizare	Tipul suportului	Randament imobilizare [%]	Activitate regăsită [%]	Activitate specifică [U g _{proteină} ⁻¹]
Adsorbție	Celită 545	32,0	0,0	0,0
	Celită 545 + (Span 80)	83,0	2,9	6,2
Afinitate	Rășină Ni-NTA Superflow	99,3	1,8	3,9
Legare ionică	CHT	97,9	5,5	11,8
Înrețelare	-	99,8	16,5	35,4
Legare covalentă	AMP	97,6	~2,0	4,3
	CMP	98,4	19,8	42,5
	CHT-GL	99,2	12,7	27,2
	Epoxi-SB: 25°C / 4°C	99,5	<1,0	2,1
	4°C - 3 etape	99,6	~2,0	4,2
Entrapare în matrici de sol gel	AMP-CHT	99,3	23,7	50,8
	TEOS/TMOS/TEOS:TMOS=1:1	98,6	0,0	0,0
	TEOS:iBuTMOS=1:1	98,4	0,0	0,0
	TEOS:DMeDMeOS=1:1	98,7	0,0	0,0
	TEOS:3NH ₂ PrTMOS=1:1÷1:4	98,1	0,0	0,0

Deși adsorbția este una dintre metodele de imobilizare cele mai simple și există un număr însemnat de enzime adsorbite pe diferite suporturi care au fost utilizate cu succes în procese biotehnologice [191] utilizarea Celitei 545 ca suport pentru imobilizarea OHazei nu s-a dovedit eficientă, probabil datorită prezenței suprafețelor hidrofiele din structura enzimei care prin interacțiunea cu moleculele de apă pot favoriza desorbția în mediu apos, în opoziție cu interacțiunile dintre părțile hidrofobe ale enzimei și suportul hidrofob care stau la baza adsorbției. Prezența unui emulgator (Span 80) favorizează adsorbția, probabil prin favorizarea accesului enzimei la suprafața adsorbentului, însă activitatea după imobilizare rămâne redusă, fiind regăsită mai puțin de 3% din activitatea enzimei native.

Imobilizarea prin legături ionice pe chitosan a condus de asemenea la valori mici ale activității regăsite, de doar 5%. Imobilizarea enzimelor pe particule de agaroză Ni-NTA a devenit de interes în ultimii ani datorită protocolului simplu de imobilizare, care se pretează pentru enzimele de tipul His-Tag. Acest material, deși s-a dovedit eficient pentru purificarea OHazei, nu a dat rezultate și ca suport de imobilizare, fiind regăsit și în acest caz mai puțin de 5% din activitatea enzimei native.

Imobilizarea în matrici de sol-gel s-a dovedit eficientă pentru multe enzime, în special pentru lipaze destinate utilizării în solvenți organici, dar și pentru enzime ca subtilizina, celulazele și nitril hidratata care după entrapare au avut activitate ridicată în soluții apoase [192], [193].

În acest studiu OHaza a fost entrapată în matrici a căror hidrofilicitate a fost controlată prin utilizarea silanilor precursori de tipul TEOS în combinație cu silani având diferite grupări alchil nehidrolizabile, în diferite rapoarte molare. Rezultatele din Tabelul 2.3 indică faptul că, deși enzima a fost reținută în totalitate în matricea de sol-gel, preparatele nu au prezentat activitate. Această lipsă de activitate se poate datora dezactivării termice datorită creșterii temperaturii în timpul formării matricii sau datorită prezenței unei cantități relativ ridicate (aproximativ 20 mmol) de alcooli inferiori (metanol și etanol) formate în timpul reacției de polimerizare. Pierderea activității se poate datora și solvenților (hexan și *i*-PrOH) utilizați în timpul etapei de spălare.

Imobilizarea prin legare covalentă implică formarea de legături între grupările active ale suportului și grupările reactive din resturi de amino acizi precum lizina (gruparea amino), cisteina (gruparea tio), acidul aspartic sau glutamic (gruparea carboxil), care sunt prezente pe suprafața enzimei [194]. În acest studiu au fost testate 5 suporturi diferite, având grupări reactive de tip amino, carboxil sau epoxi. Datorită separării ușoare a preparatelor enzimactice din amestecurile de reacție, mai ales din sistemele neomogene, legarea covalentă a OHazei pe particule magnetice a fost studiată în detaliu.

Valorile activităților regăsite după imobilizare s-au situat între 1,0% și 23,7%, chiar dacă imobilizările s-au realizat în aproximativ aceleași condiții blânde (pH, temperatură).

Particulele cu grupări epoxi au fost testate cu succes pentru enzime cu structuri asemănătoare OHazei, cum ar fi D-amino-oxidaza. Totuși, prin utilizarea suporturilor cu grupări epoxi s-au obținut valori mai mici de 5% ale activității regăsite după imobilizare, probabil datorită formării legăturilor covalente nu numai cu resturile de lizină ci și cu resturi de aminoacizi precum cisteina, histidina, tirozina, etc [195]. Pentru a evita acest inconvenient, s-a încercat blocarea unui procent de aproximativ 50% din grupările epoxi prin tratare cu soluție de glicină. Valoarea scăzută a activității obținută și în acest caz indică faptul că pierderea

activității nu s-a datorat legării covalente în mai multe puncte. Inactivarea OHazei imobilizate pe particule cu grupări epoxi se poate datora și împiedicării sterice care se produce în urma legării enzimei de suport.

Imobilizarea prin înrețelare (CLEA) a fost de asemenea testată pentru OHază. În comparație cu rezultatele obținute prin metodele investigate anterior, activitatea recuperată în acest caz a fost mai mare, de 17%. Impedimentul major pentru utilizarea metodei CLEA în cazul sistemului de reacție specific OHazei este necesitatea utilizării solvenților organici în etapa de separare a produsului de reacție, solvenți care determină denaturarea enzimei înrețelate.

Trebuie menționat că, în cazul în care produsul de reacție este solid, separarea enzimei din mediul heterogen nu se poate realiza prin filtrare. O posibilă soluție pentru rezolvarea acestui inconvenient poate fi separarea magnetică, ce poate facilita atât recuperarea produsului cât și reutilizarea enzimei.

Utilizarea particulelor magnetice funcționalizate cu grupări carboxil în cazul OHazei a condus la regăsire a activității de până la 20%. Totuși, adsorbția parțială a produsului 10HSA, care este un solid alb, cât și a substratului nereacționat insolubil în mediul de reacție nu au putut fi evitate. Pentru rezolvarea acestui impediment s-a investigat utilizarea macrocompozitelor magnetice de chitosan (AMP-CHT) ca suport de imobilizare, urmată de activarea acestora cu glutaraldehidă. Macroparticulele magnetice, obținute conform metodei din paragraful 3.6.4, sunt prezentate în Figura 2.10, în absența (a) și prezența (b) magnetului.



Figura 2.10 Macro-particule magnetice cu chitosan

În cazul utilizării acestui suport, activitatea regăsită a fost de aproximativ 24%. În acest caz, pierderea activității se poate datora legării enzimei de suport într-o conformație nefavorabilă, cauzată de prezența unor resturi de lizină foarte aproape de situsul catalitic (marcat cu roșu în Figura 2.9b).

2.2.4. Caracterizarea OHazei imobilizate

2.2.4.1. Efectul pH-ului asupra activității OHazelor imobilizate

Efectul pH-ului asupra activității preparatelor de OHază imobilizată a fost studiat în același domeniu (4,0-9,0) ca și în cazul enzimei native, conform metodei descrise în paragraful 3.7. Pentru acest studiu au fost utilizate trei dintre cele mai active preparate imobilizate (CMP, chitosan și AMP-CHT).

Rezultatele prezentate în Figura 2.11 indică faptul că în cazul OHazei imobilizate pe chitosan dependența de pH a fost similară cu cea a enzimei native. O modificare semnificativă a profilului de pH s-a observat în cazul preparatelor imobilizate pe particule magnetice. Aceste două preparate au fost active într-un domeniu mai larg de pH în comparație cu enzima nativă, iar profilurile de pH prezintă câte un singur optim, la pH 6,5 pentru OHaza imobilizată pe particule magnetice funcționalizate cu grupări carboxil, respectiv la pH 8,0 pentru preparatul imobilizat pe macroparticule magnetice de chitosan (AMP-CHT).

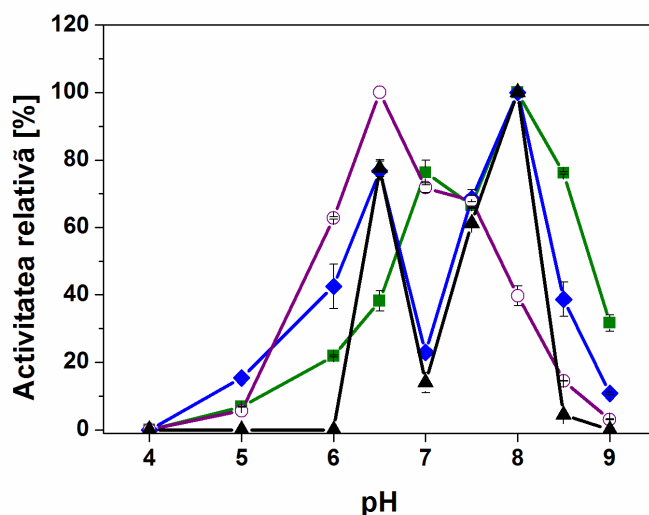


Figura 2.11 Influența pH-ului asupra activității OHazelor imobilizate ▲ OHaza nativă; ◆ OHaza-CHT; ○ OHaza-CMP; ■ OHaza-AMP-CHT

Pentru explicarea acestei tendințe trebuie să se țină seama de starea fizică a acidului oleic în funcție de pH-ul soluției. La pH mai mic decât 7,0 acidul oleic se prezintă sub forma unui ulei, având gruparea carboxil protonată. La valori de pH mai mari de 7,0 gradul de ionizare crește, formându-se sisteme lamelare sau vezicule mari ale acidului [196]. Lipsa activității enzimei native la pH 7,0 se datorează probabil existenței substratului în formă neionizată la această valoare. În cazul enzimei imobilizate pe particule magnetice, interacțiunile cu grupările libere amino sau carboxil care există la suprafața particulelor favorizează probabil accesul substratului la situsul catalitic al enzimei, ceea ce duce la activități mai mari în raport cu alte metode de legare covalentă. Exceptând preparatul imobilizat pe particule magnetice funcționalizate cu grupări carboxil, valoarea de pH la care s-a înregistrat activitatea cea mai mare pentru enzimele imobilizate a fost 8,0, la fel ca

în cazul enzimei native. Aceste rezultate arată că afinitatea maximă a enzimei pentru substrat se înregistrează în mediu slab bazic și nu se modifică în urma existenței unor grupări amino libere în structura suportului, în timp ce prezența grupărilor carboxil determină o deplasare a acestui maxim spre valori neutre de pH.

2.2.4.2. Stabilitatea termică a OHazelor imobilizate

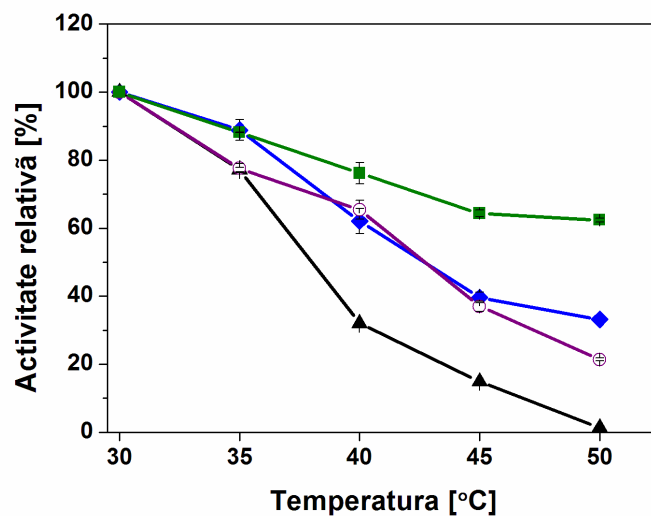


Figura 2.12 Stabilitatea termică a preparatelor de OHază imobilizată. ▲ OHază nativă; ◆ OHaza-CHT; ○ OHaza-CMP; ■ OHaza-AMP-CHT

Stabilitatea termică a preparatelor de OHază imobilizată a fost studiată pentru preparatele imobilizate pe chitosan, CMP și AMP-CHT. La fel ca și în cazul enzimei native, enzimele imobilizate au fost incubate la diferite temperaturi, în intervalul 30°C-50°C, timp de 2h. Activitatea a fost determinată conform metodei standard (paragraful 3.5). Conform datelor prezentate în Figura 2.12, toate preparatele au prezentat activitate mai ridicată în comparație cu enzima nativă la temperaturi mai mari de 40°C. Preparatul cel mai stabil s-a dovedit cel obținut cu macroparticule magnetice de chitosan ca și suport. Această stabilitate termică a preparatului AMP-CHT poate fi datorată flexibilității mai reduse a enzimei după imobilizare, care nu favorizează deplierea enzimei și denaturarea [197]. Chiar și la temperatura de 50°C acest preparat și-a menținut mai mult de 65% din activitatea inițială, în timp ce enzima nativă a fost complet inactivată.

2.2.4.3. Studiul reutilizării OHazei imobilizate

Reutilizarea este o caracteristică esențială în biocataliză, iar prin imobilizarea enzimelor crește posibilitatea de utilizare a acestora în mai multe cicluri de reacție, având ca rezultat creșterea productivității și reducerea costurilor. Stabilitatea operațională a OHazei imobilizate pe macrocompozite magnetice de chitosan a fost testată în mai multe cicluri de reacție, conform metodei descrise în paragraful 3.9.

După fiecare ciclu de reacție biocatalizatorul a fost recuperat prin separare magnetică, spălat și reutilizat în reacția de obținerea acidului 10HSA din acid oleic.

Produsul și substratul nereacționat au fost recuperate din supernatantul rezultat după separarea enzimei prin trei extracții succesive cu diclormetan, după ajustarea în prealabil a pH-ului cu HCl.

Rezultatele din Figura 2.13 indică faptul că după 5 cicluri de reacție activitatea relativă a fost de aproximativ 70%, o valoare bună dacă se ia în considerare stabilitatea redusă a OHazei native. Mai mult decât atât, reutilizarea enzimei contracarează complet pierderea activității din timpul imobilizării.

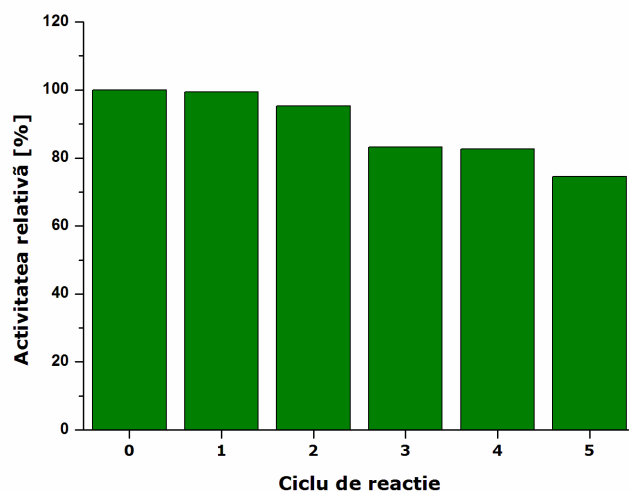


Figura 2.13 Utilizarea OHazei imobilizate în mai multe cicluri de reacție

2.2.4.4. Reproducibilitatea metodei de imobilizare

Studiul reproducibilității metodei de imobilizare a fost necesar deoarece până la obținerea preparatului final trebuiau parcurse o serie de etape (obținerea suportului prin precipitarea soluției de chitosan cu particule magnetice, activarea acestuia cu glutaraldehidă, legarea covalentă a OHazei), cu posibil efect negativ asupra activității preparatului final. Astfel, atât funcționalizarea suportului (de tip AMP-CHT) cât și procesul de imobilizare au fost repetate identic de șapte ori, rezultatele fiind reprezentate în Figura 2.14. deviațiile standard calculate față de valoarea medie a activității relative recuperate nu au depășit 8%, ceea ce demonstrează o reproducibilitate bună a metodei de imobilizare și implicit a obținerii suportului funcționalizat.

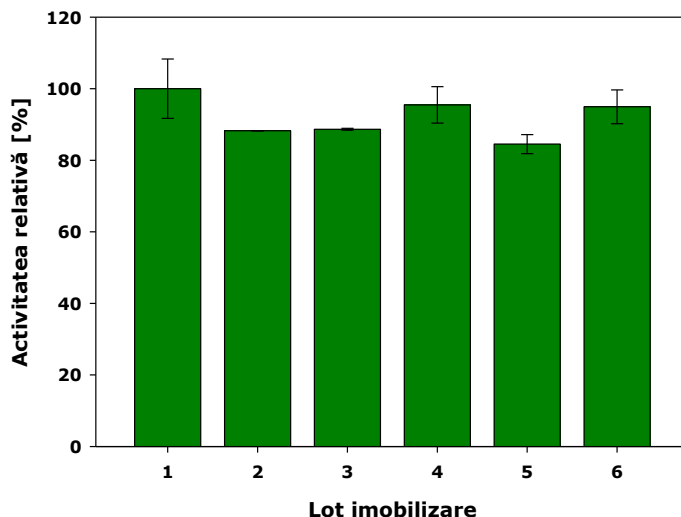


Figura 2.14 Reproducibilitatea metodei de immobilizare prin legare covalentă pe AMP-CHT

2.2.4.5. Caracterizarea morfologică a OHazei immobilizate

Marcarea proteinelor cu izotiocianat de fluoresceină (FITC) are la bază reacția dintre gruparea izotiocianat ($-N=C=S$) din structura FITC (Figura 2.15) cu grupările amino primare, imidazol, carbonil sau tirozil din structura proteinei. Acest procedeu face posibilă vizualizarea distribuției enzimei în matricea solidă, datorită fluorescenței structurii aromatice atașate în acest mod enzimei. OHaza nativă a fost marcată cu FITC conform schemei din Figura 2.16, iar FITC-ul nereacționat a fost îndepărtat prin spălări succesive, conform metodei de la paragraful 3.11.

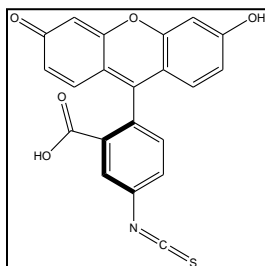


Figura 2.15 Structura izotiocianatului de fluoresceină (FITC)

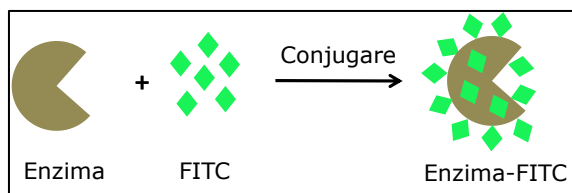


Figura 2.16 Schema de obținere a enzimei marcate cu FITC

După fiecare ciclu de spălare s-au măsurat spectrele UV-VIS ale apelor de spălare în domeniul 300-600 nm, până când valoarea absorbției de la 493 nm, corespunzătoare FITC a scăzut sub 0,1 (Figura 2.17).

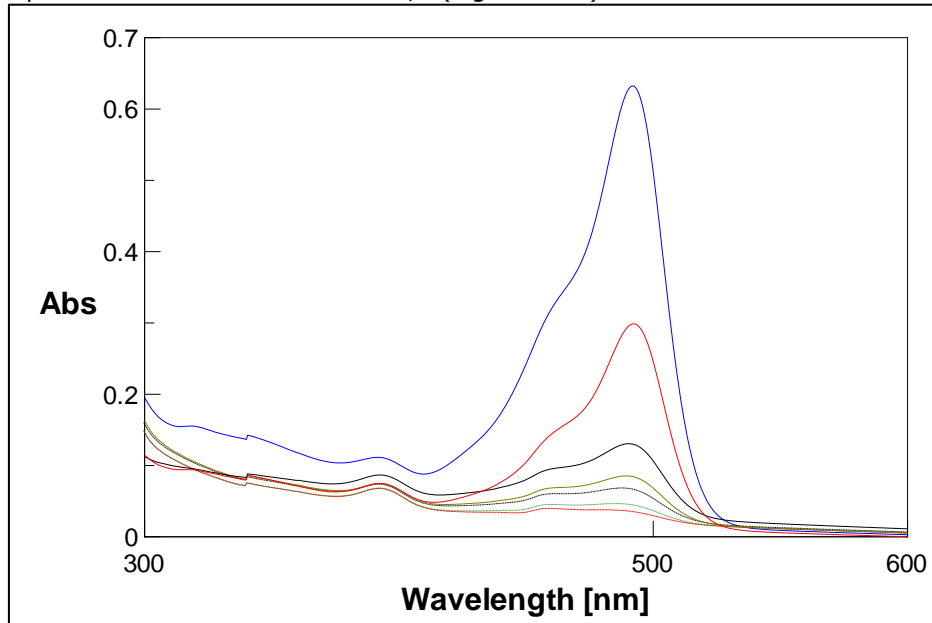


Figura 2.17 Spectrele UV-VIS colectate în timpul îndepărtării excesului de FITC

Proteina marcată a fost supusă imobilizării conform metodei 3.6.4 iar imaginile de fluorescență colectate pentru particula secționată și referință sunt prezentate în Figura 2.18. Stratul fluorescent de pe partea exterioară a macroparticulei magnetice de chitosan secționată indică o distribuție uniformă a complexului OHaza-FITC pe suprafața sferelor. După cum era de așteptat, interiorul particulelor este compact, fără să conțină enzimă imobilizată. Suprafața fragilă a particulei chitosan, unde enzima este imobilizată, se datorează agentului de reticulare [198].

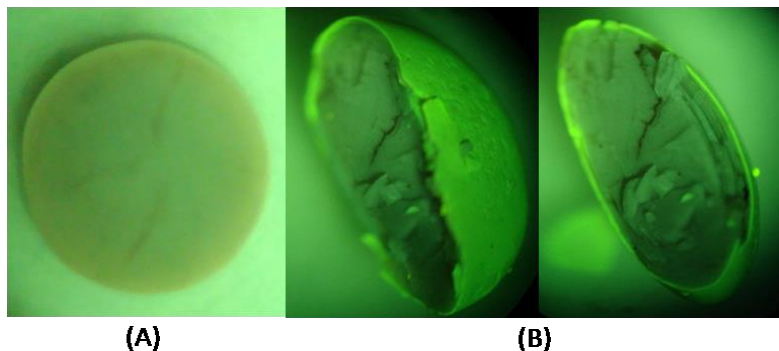


Figura 2.18 Imaginile de fluorescență ale macroparticulele magnetice de chitosan cu OHază legată covalent (A) control, (B) particula secționată care conține OHază marcată cu FITC

2.2.5. Concluzii parțiale

Oleat hidratata a fost stabilizată prin adaos de polioli și prin imobilizare pe diferite suporturi. Rezultatele prezentului studiu demonstrează pentru prima dată posibilitatea de imobilizare a acestei enzime.

Studiul comparativ al metodelor de imobilizare a demonstrat superioritatea legării covalente, iar cele mai eficiente suporturi pentru imobilizarea prin această metodă au fost compozitele magnetice cu chitosan, obținute cu glutaraldehidă ca agent de reticulare.

Biocatalizatorul rezultat a demonstrat stabilitate și activitate ridicată pe un domeniu mai larg de pH și la temperaturi mai ridicate, în comparație cu enzima nativă. După 6 cicluri de reacție, a fost regăsită 75% din activitatea inițială, ceea ce arată că prin imobilizare s-a obținut o stabilitate operațională remarcabilă pentru o enzimă care în stare nativă se dezactivează extrem de ușor.

2.3. Biotransformări ale hidroxi-acizilor grași cu lipaze libere și imobilizate [199]

Hidroxi-acizii grași au fost intens studiați în ultimii ani datorită aplicabilității lor în special în industria cosmetică, alimentară, a vopselelor, dar și ca intermediari în sinteza unor produse farmaceutice.

Poliesterii sintetizați utilizând ca monomeri hidroxi-acizi grași (denumite și estolide) prezintă de asemenea o varietate largă de aplicații, în special datorită biodegradabilității lor.

În cadrul cercetărilor prezentate în acest capitol, s-au sintetizat și caracterizat estolidele derivate de la 4 hidroxi-acizi grași: acidul 10-hidroxistearic, acidul 12-hidroxistearic, acidul ricinoleic și acidul 16-hidroxistearic, utilizând ca biocatalizatori atât lipaze libere cât și imobilizate. Deși 3 dintre acești compuși au mai fost utilizați ca și substraturi pentru unele lipaze, caracterizarea lor a fost incompletă pentru a demonstra structura compușilor formați [118]. Trebuie menționat și faptul că până în prezent acidul 10-hidroxistearic nu a mai fost utilizat ca substrat pentru lipaze. Prezentul studiu a avut ca obiectiv și evaluarea selectivității lipazelor pentru substraturi saturate/ nesaturate, cu grupare OH primară, respectiv secundară.

Deoarece 10HSA nu este disponibil comercial, acest compus a fost sintetizat în laborator pe cale enzimatică, utilizând acid oleic ca substrat și oleat hidratată drept biocatalizator și a fost caracterizat în detaliu.

2.3.1. Sinteza enzimatică a acidului 10-hidroxistearic utilizând oleat-hidratată

Acidul 10-hidroxistearic (10HSA) este un hidroxi-acid tot mai des menționat ca produs de reacție al hidratării enzimatică a acidului oleic. Acidul 10-hidroxistearic fost sintetizat din acid oleic, utilizând un extract celular care conținea OHază recombinantă, în conformitate cu metoda descrisă în paragraful 3.13.

2.3. Biotransformări ale hidroxi-acizilor grași cu lipaze libere și imobilizate 55

Conversia acidului oleic în 10HSA a fost monitorizată prin HPLC (Figura 2.19), conform metodei 3.12. La sfârșitul reacției a fost ajustat pH-ul cu HCl 4N până la valoarea 2, iar produsul de reacție a fost extras cu acetonă.

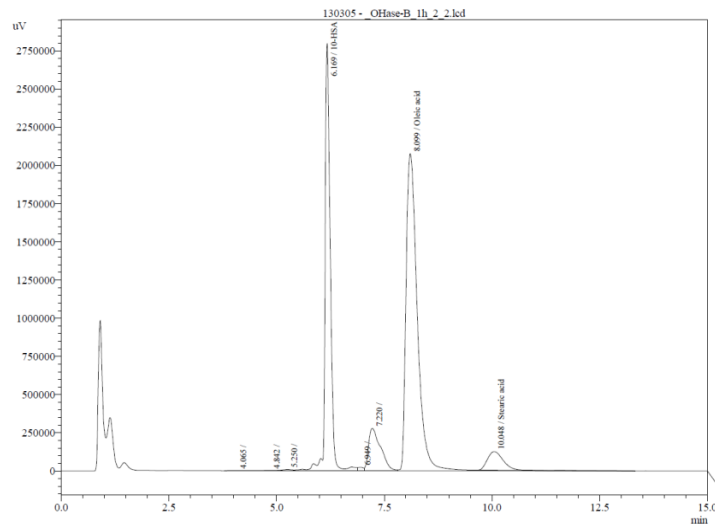


Figura 2.19 Cromatograma HPLC a derivaților de acid oleic și 10HSA.

10HSA se prezintă ca o pulbere albă, iar caracterizarea acestui produs s-a realizat prin diferite tehnici spectroscopice și cromatografice. În spectrul FT-IR (Figura 2.20) se observă mai multe benzi caracteristice care confirmă structura atribuită: o bandă intensă la 1696 cm^{-1} caracteristică grupării carbonil din structura hidroxi-acidului, două benzi la 2913 cm^{-1} și 2849 cm^{-1} corespunzătoare grupărilor $-\text{CH}_2-$ și $-\text{CH}_3$, respectiv banda de la 3399 cm^{-1} caracteristică grupării hidroxil.

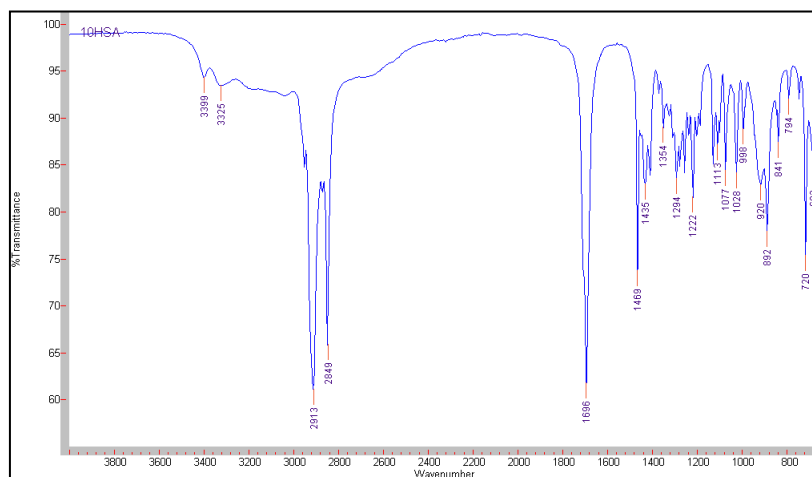


Figura 2.20 Spectrul FT-IR al acidului 10-hidroxistearic

Analiza structurală a 10HSA s-a realizat și prin cromatografie de gaze cuplată cu spectrometrie de masă. Proba a fost derivatizată cu BSTFA și analizată conform metodei 3.14. Fragmentele ionice cu valorile m/z de 215 și 331, regăsite în cromatograma ionică (Figura 2.21), corespund valorilor derivatului tetrametil-silil al acidului 10-hidroxi stearic.

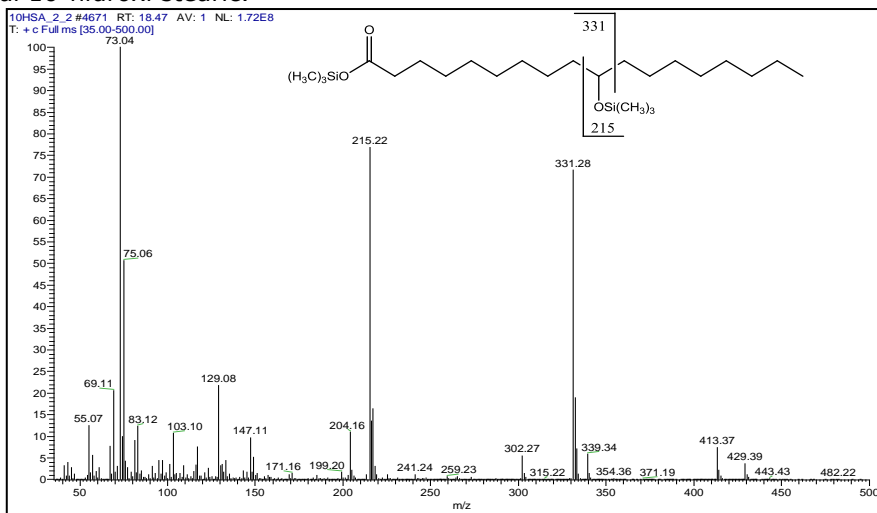


Figura 2.21 Cromatograma ionică a derivatului sililat de 10HSA

Pe baza spectrelor ^1H -RMN (Figura 2.22) și ^{13}C -RMN (Figura A 9) ale acidului 10HSA colectate în piridină- d_5 au fost atribuite următoarele semnale:

^1H -RMN (400 MHz, piridină- D_5) δ (ppm): 3.89-3.83 (m, 1H, CHOH), 2.51 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 2H, CH_2CO), 1.68-1.51 (m, 28H), 0.85 (t, $J=7.2\text{Hz}$, 3H, CH_3);
 ^{13}C -RMN (100.62 MHz, piridină- D_5) δ (ppm): 176.4 (COOH), 71.3 (CH-OH), 38.9 (11- CH_2 ,9- CH_2), 35.3 ($\text{CH}_2\text{-COOH}$), 32.5 (16- CH_2), 30.6 (13- CH_2), 30.5 (6- CH_2), 30.4 (14- CH_2), 30.3 (5- CH_2 ,15- CH_2), 29.9 (4- CH_2), 26.8 (8- CH_2 ,12- CH_2), 26.0 (3- CH_2), 23.3 (17- CH_2), 14.7 (CH_3).

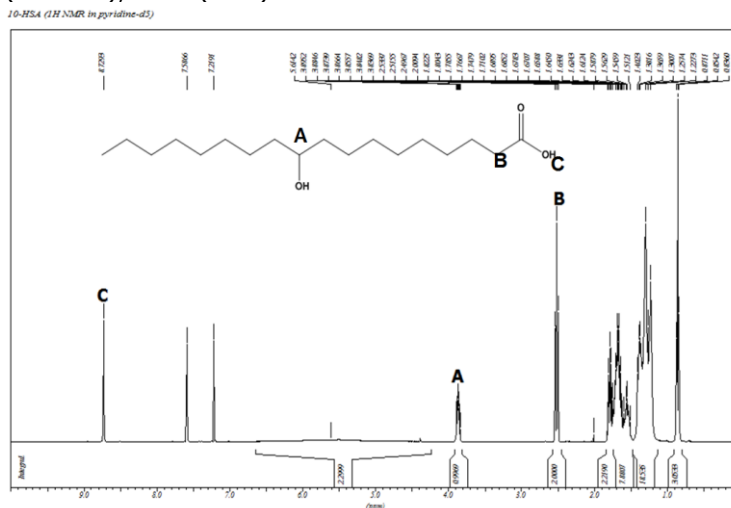


Figura 2.22 Spectrul ^1H -RMN al acidului 10HSA

Aceste rezultate confirmă structura 10HSA și sunt în concordanță cu datele raportate anterior pentru 10HSA [200].

2.3.2. Determinarea purității enantiomerice a 10HSA

Puritatea enantiomerică a 10HSA a fost determinată conform metodei raportate în literatură de Yang ș.a. [201], pe baza reacției dintre esterul metilic al 10HSA cu acidul (S)-(+)-O-acetilmandelic (Figura 2.23), urmată de analiza produsul/produșilor de reacție prin spectroscopie RMN. Metoda este simplă, iar racemizarea în timpul reacției este exclusă. Conform acestei metode, dacă ambii izomeri sunt prezenți în spectrul RMN se vor putea distinge două semnale, corespunzătoare grupărilor funcționale ale esterilor metilici și ale protonilor metilenici ai acidului mandelic.

Deși puritatea enantiomerică a acidului 10HSA obținut utilizând hidratază din specia *Pseudomonas* 3266 a fost determinată și raportată anterior [201] confirmarea a fost necesară datorită faptului că 10HSA urma să fie utilizat ca substrat pentru lipaze.

În prima etapă a reacției a fost necesară sinteza chimică a esterului metilic al 10HSA. Această reacție a fost realizată conform metodei de la paragraful 3.14, iar conversia acidului 10HSA a fost monitorizată prin GC-MS, după derivatizare (Figura A 5).

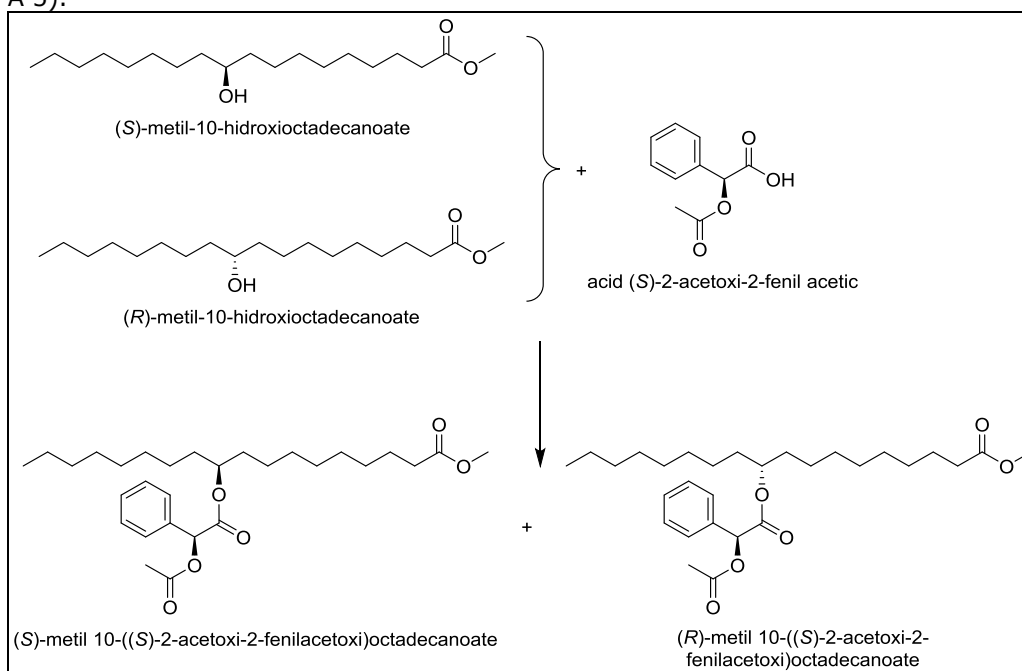


Figura 2.23 Schema de obținere a derivaților de acid mandelic

În spectrul ^1H -RMN (Figura 2.24) al derivatului mandelic al 10HSA semnalele de la 3.68 ppm respectiv 5.86 ppm apar sub formă de singlet și confirmă că 10HSA sintetizat este enantiomeric pur.

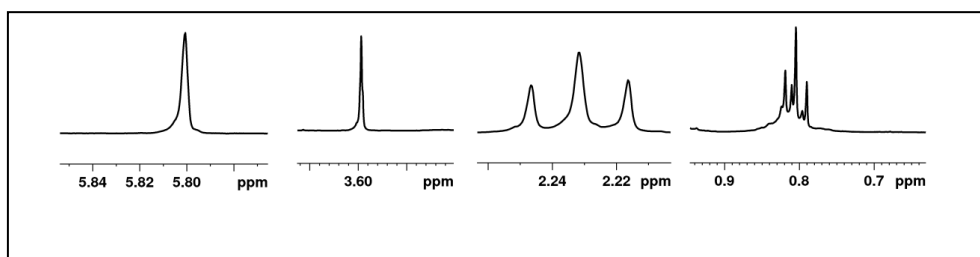


Figura 2.24 Spectrul ^1H -RMN al derivatului de acid 10HSA

2.3.3. Selecția biocatalizatorului pentru sinteza estolidelor

Pentru o evaluare corectă a eficienței catalitice și selectivității lipazelor față de hidroxi-acizii grași s-au determinat mai întâi activitatea hidrolitică și activitatea specifică, raportată la conținutul de proteine determinat prin metoda Bradford (3.4.2), pentru un număr de 15 lipaze native selectate pentru acest studiu, utilizând *p*-nitro-fenil palmitat ca substrat model, conform metodei 3.18.

Valorile activităților sunt prezentate în Tabel 2.4. Dintre lipazele testate, activitatea hidrolitică cea mai ridicată a fost a lipazei din *Alcaligenes* sp., urmată de lipazele din *C. lipolytica* și *P. stutzeri*. În același timp, alte lipaze, ca cea din pancreas de porc sau cele microbiene din *Rhizopus arrhizus* sau *Penicillium roqueforti* au avut activitate foarte redusă. Valorile activităților, chiar dacă au fost obținute pentru un substrat model (care este însă un derivat de acid gras) oferă indicii importante pentru alegerea lipazei potrivite, însă un aspect important de care trebuie ținut cont este și selectivitatea lipazei.

Tabel 2.4. Activitatea hidrolitică a lipazelor din diferite surse

Nr. crt.	Sursa lipazei	Activitate [U]	Activitate specifică [U/mg liofilizat]
1	<i>Alcaligenes</i> sp.	8,49	3,86
2	<i>Aspergillus oryzae</i>	1,43	1,30
3	<i>Candida antarctica</i> A	0,35	0,02
4	<i>Candida antarctica</i> B	2,97	0,30
5	<i>Candida lipolytica</i>	7,76	2,59
6	<i>Candida rugosa</i>	1,03	0,05
7	<i>Mucor javanicus</i>	4,46	0,16
8	<i>Pseudomonas cepacia</i>	4,31	0,37
9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,11	0,11
10	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2,42	1,21
11	<i>Penicillium roqueforti</i>	0,24	0,01
12	<i>Rhizopus arrhizus</i>	0,25	0,01
13	<i>Thermoanaerobium broickii</i>	3,93	1,31
14	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	11,88	1,09
15	Pancreas de porc	0,01	0,003

Deoarece scopul acestui studiu a fost de a selecta lipaza nativă cea mai eficientă pentru formarea estolidelor, s-a realizat o evaluare a diferențelor dintre aceste enzime și în funcție de tipul produșilor care se pot forma în funcție de: numărul de atomi de carbon din moleculă, poziția grupării hidroxil (primară sau secundară) și sursa lipazei.

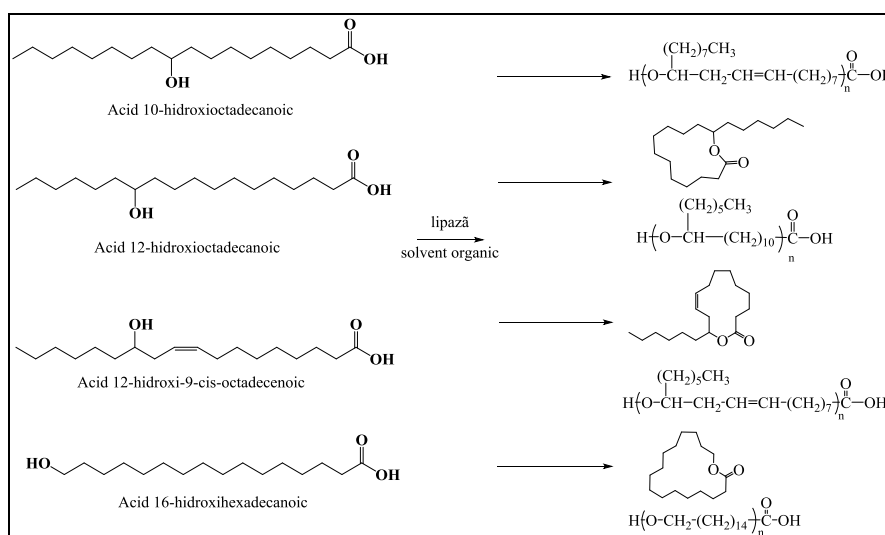


Figura 2.25 Schema de sinteză enzimatică a estolidelor

Pe baza activităților determinate anterior, reacțiile prezentate în Figura 2.25 s-au efectuat utilizând același număr de unități de lipază [U] față de substrat (50 U/moli substrat). Deoarece conform datelor de literatură formarea monolactonelor este favorizată la concentrații scăzute, în acest studiu concentrația de substrat a fost stabilită la 1 mM pentru a evalua capacitatea lipazelor de a forma monolactone [203]. Ca și mediu de reacție s-a folosit toluenul, solvent în care substraturile au fost miscibile, iar temperatura la care s-au efectuat reacțiile a fost de 40°C, temperatura optimă pentru majoritatea lipazelor. După 24h reacțiile au fost oprite prin separarea enzimei din mediul de reacție prin centrifugare, iar probele au fost analizate prin GC-MS după derivatizare și prin MALDI-TOF MS, conform metodelor 3.13 respectiv 3.20.

Deși unele dintre aceste substraturi, în special acidul ricinoleic, au mai fost testate cu lipaze [118], ca substraturi unice sau în combinație cu diferiți polioli, studiile respective pot fi considerate neconcludente deoarece analiza produșilor de reacție a fost sumară iar mersul reacțiilor a fost monitorizat doar prin titrare. Prezentul studiu este justificat și de faptul că cele mai multe dintre lipazele testate de noi nu au fost încă raportate ca posibili biocatalizatori pentru asemenea tipuri de reacții.

Rezultatele prezentate în Tabel 2.5 indică faptul că formarea monolactonei a fost favorizată în cazul a 3 substraturi (12HSA, RCA, 16HHDA), folosind ca biocatalizatori lipazele din *P. fluorescens* și *P. stutzeri*. Pentru substratul care conține gruparea OH primară, prezența monolactonei a fost observată și în cazul lipazelor din *P. cepacia* și *Alcaligenes* sp.

În majoritatea cazurilor, formarea monoestolidei (dimerului) a fost favorizată. Totuși, chiar și la concentrații de 1 mM, în cazul 16HHDA au fost identificate specii precum trimerii și tetramerii.

Tabel 2.5. Abilitatea lipazelor de a cataliza reacțiile de lactonizare/oligomerizare a 10HSA, 12HSA, RCA și 16HHDA. ML-monolactonă, DL-dilactonă, D-dimer, T-trimer, Tr-tetramer

Sursa lipază	Conversia [%], Producții de reacție identificați (GC-MS/MALDI-TOF MS)							
	10HSA		12HSA		RCA		16HHDA	
<i>Alcaligenes</i> sp.	52,5	D	52,3	D	0	n.d.	62	ML,D
<i>A. oryzae</i>	21,4	D,DL	0	n.d.	25	D	9,8	DL
<i>C. antarctica</i> A	15,9	D,DL	0	n.d.	15,1	D	0	n.d.
<i>C. antarctica</i> B	21,4	D	27,5	D	33,2	D	91,6	D,T,Tr
<i>C. lipolytica</i>	21,5	D	9,1	D	0	n.d.	0	n.d.
<i>C. rugosa</i>	18,4	D,DL	0	n.d.	25,5	DL	0	n.d.
<i>M. javanicus</i>	12,9	D	0	n.d.	10,1	D	12,5	DL
<i>P. cepacia</i>	0,0	n.d.	0	n.d.	6,6	D	54,5	ML,D,T
<i>P. fluorescens</i>	25,3	D,DL	15,2	ML,D,T	31,5	ML,D,T	91,6	ML,DL
<i>P. stutzeri</i>	34,4	D,T	32,8	ML,D	10	ML+D	62,1	ML,D,T
<i>P. roqueforti</i>	3,1	D	0	n.d.	16,6	D	0	n.d.
<i>R. arrhizus</i>	9,6	D	0	n.d.	10,9	D	48,9	DL
<i>T. brockii</i>	31,9	D	7,7	D	0	n.d.	11,5	D
<i>T. lanuginosus</i>	9,2	D	0	n.d.	20,1	D	91,6	DL
Pancreas de porc	0,0	n.d.	0	n.d.	16,5	D	91,6	D,T,Tr

n.d. - nu s-a determinat

Conversiile cele mai ridicate s-au obținut tot în cazul 16HHDA, datorită regioselectivității lipazelor pentru gruparea OH primară în comparație cu gruparea OH secundară, explicată de acomodarea/orientarea acestora în situsul catalitic al enzimei. Pentru acomodarea alcoolilor în situsul catalitic al enzimei este necesară împachetarea acestora într-o conformație compatibilă cu structura situsului catalitic, fiind reduse gradele de libertate și îngreunată formarea intermediarului acil-enzimă. Dintre lipazele testate cu 16HHDA ca substrat, un număr de 5 au condus la formarea unui singur produs de reacție, iar cele mai interesante au fost lipazele din *R. arrhizus* și *T. lanuginosus*, care au condus la formarea dilactonei la o conversie mai mare de 40%. Lipaza din *C. antarctica* B a prezentat activitate și este promițătoare pentru sinteza estolidelor.

În cazul substraturilor C18 (10HSA, 12HSA și RCA) se pot observa diferențe importante. Deși toate aceste substraturi conțin grupări hidroxil secundare, două dintre ele chiar în aceeași poziție (C12), o serie de lipaze ca cele din *C. rugosa*, *A. oryzae*, *M. javanicus*, *C. antarctica* A, *R. arrhizus*, *P. roqueforti*, *P. cepacia*, *T. brockii*, *T. lanuginosus* și pancreas de porc nu au prezentat activitate pentru 12HSA, dar au determinat conversii de până la aproximativ 32% în cazul 10HSA respectiv 35% în cazul acidului ricinoleic. Aceste diferențe au la bază probabil tot compatibilitatea stereochimică dintre substrat și centrul catalitic activ al enzimei. În majoritatea cazurilor monoestolidele au fost produși unici de reacție, excepție făcând lipazele din *Pseudomonas*.

2.3.4. Influența mediului de reacție

Mediul de reacție are o influență foarte importantă asupra reacțiilor de sinteză catalizate de enzime. În acest studiu, au fost evaluați o serie de solvenți cu indici de polaritate log P cuprinși între -0,1 și 4,3, de la polar la nepolar. Reacțiile s-au efectuat la 75°C și concentrații de substrat 5 mM, utilizând lipaza din *P. fluorescens*. Rezultatele prezentate în Tabel 2.6 indică faptul că formarea estolidelor și conversia substratului au fost favorizate de utilizarea solvenților cu valori log P mai ridicate, adică cu polarități scăzute.

În cazul solvenților polari, ca N,N-dimetil formamida și metil-etil-cetona, conversiile au fost scăzute sau nule. Valorile cele mai ridicate ale conversiilor s-au obținut în cazul 16HHDA și RCA. Deși obținerea unor oligomeri cu masă moleculară mai mare a fost favorizată în heptan, fiind identificate și specii precum hexamerul în spectrul 12HSA, respectiv pentamerul în cazul 16HHDA, solubilitatea substraturilor nu a fost completă în acest solvent iar determinarea conversiei reale nu a fost posibilă.

În cazul substratului 10HSA, la fel ca și în cazul 12HSA și 16HHDA, s-a observat o creștere a conversiei cu creșterea valorii log P a solventului, iar gradul de polimerizare cel mai ridicat a fost obținut la folosirea ca mediu de reacție a heptanului.

Luând în considerare valorile conversiilor pentru toate substraturile studiate, tipul produșilor formați, dar și punctul de fierbere mai ridicat, care să permită o eventuală creștere a temperaturii de reacție, toluenul a fost selectat ca mediu de reacție pentru sinteza enzimatică estolidelor.

Tabel 2.6 Influența mediului de reacție asupra conversiei totale a HFA și formării oligomerilor, catalizată de lipaza din *P. fluorescens*. D-dimer (monoestolidă); DL-dilactonă; T-trimer; Tr-tetramer; P-pentamer; H-hexamer

Solvent	log P	Conversia (GC-MS)/ Producții de reacție identificați (MALDI-TOF MS)							
		10HSA		12HSA		16HHDA		RCA	
N,N-dimetil formamidă	-1,0	0,0	n.d.	0,0	n.d.	0,0	n.d.	7,6	n.d.
Metil-etil-cetonă	0,3	24,0	D	0,0	n.d.	0,0	n.d.	0,0	n.d.
Toluen	2,5	48,3	D	55,5	ML+D	65,7	ML+D+T	92,8	D+T+Tr
Ciclohexan	3,2	77,7	D+DL	80,1	D+T+Tr	25,5	D+DL	91,7	D+T+Tr
Heptan	4,3	n.c.	D+..T	n.c.	ML+..H	n.c.	D+DL	n.c.	ML+D+..P

n.d.-nu s-a determinat; n.c.-nu s-a calculat

2.3.5. Efectul temperaturii și al concentrației de substrat

Pentru o evaluare cât mai corectă a efectului temperaturii, la început a fost testată stabilitatea termică a unui număr de 3 lipaze selectate pe baza studiilor anterioare, prin incubarea acestora la diferite temperaturi până la 80°C pentru diferite intervale de timp, până la 24 h. Pe baza rezultatelor din Figura 2.26 se observă că lipazele din *P. fluorescens* și *Candida antarctica* B și-au păstrat peste 80% din activitatea hidrolitică chiar la temperatura de 80°C, în timp ce lipaza din *T. lanuginosus*, și-a pierdut peste 90% din activitate după 2h deja la 70°C.

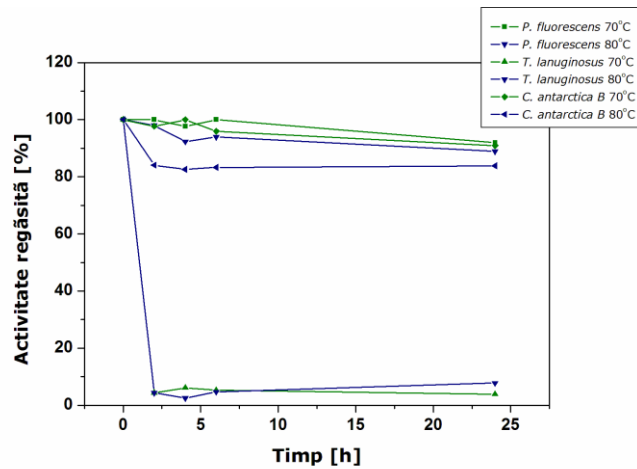


Figura 2.26 Stabilitatea termică a lipazelor *P. fluorescens*, *T. lanuginosus*, *CalB*

Pentru a evalua efectul combinat al temperaturii și al concentrației de substrat asupra formării estolidelor, concentrația inițială de hidroxi-acid a fost mărită la 5 mM, iar temperatura de reacție la 75°C, rezultatele fiind comparate cu cele ale studiului anterior realizat la concentrație de 1 mM și temperatură de 40°C. Din Figura 2.27 se pot observa creșteri însemnate (până la 2-3 ori) ale conversiei pentru substraturile 12HSA, RCA, 10HSA. În ce privește elongarea catenei, aceasta a fost favorizată de enzimele din speciile *Pseudomonas* pentru toate cele 4 substraturi.

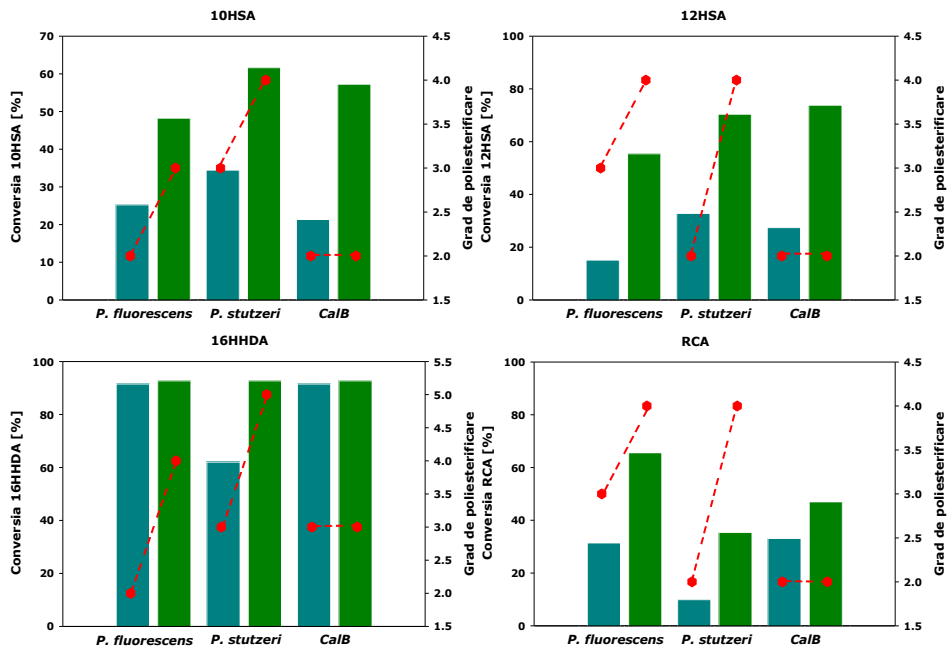


Figura 2.27 Influența concentrației de substrat și a temperaturii (1mM/40°C - albastru; 5mM/75°C - verde) asupra conversiei hidroxi-acizilor grași; și a gradului de polimerizare (roșu), catalizată de lipazele din *P. fluorescens*, *P. stutzeri* și *C. antarctica B*.

2.3.6. Studiul reacției de poliesterificare a 10HSA în timp

Deoarece în cazul substratului 10HSA formarea estolidelor s-a dovedit a fi mai lentă comparativ cu celelalte substraturi, reliefată de valorile mai scăzute ale conversiilor dar și de prezența în spectrele MALDI a compușilor de tipul dimer și trimer, au fost selectate 4 lipaze (*P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *C. antarctica* și *Alcaligenes* sp.) pentru a urmări și evalua desfășurarea reacțiilor într-un interval de timp mai mare de 24 h, probele fiind colectate în intervalul de timp 24 h-120 h. În Figura 2.28 se observă o creșterea conversiilor în primele 72 h, indiferent de natura lipazei, urmată de o creștere mai lentă sau chiar stoparea reacției la timp mai lung. Faptul că nu se obțin conversii mai mari de 65% nici după un timp de reacție de 120 de ore se datorește specificității de substrat mai reduse a lipazelor față de 10HSA.

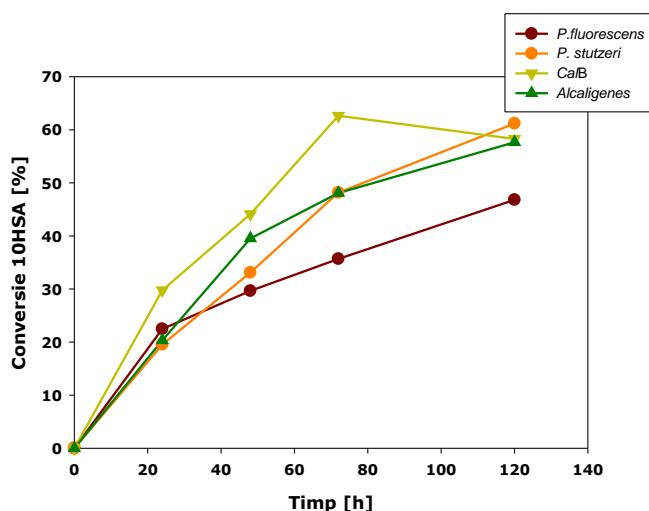


Figura 2.28 Formarea estolidelor acidului 10HSA în timp la 50°C

Analiza spectrelor MALDI-TOF MS (Tabel 2.7) indică faptul că în cazul lipazei din *Alcaligenes* sp., deși conversia a fost ridicată, monoestolida a fost regăsită ca produs unic. În cazul lipazelor din *Pseudomonas* pe lângă estolide liniare s-a observat și prezența macrolactonelor (di- și tri). Cu excepția lipazei din *P. stutzeri*, apariția estolidelor de tip trimer și tetramer a fost observată doar după 72 h.

Tabel 2.7. Analiza produșilor de reacție ai 10HSA în timp pe baza spectrelor MALDI-TOF

Sursa lipaza	Timp [h]	Conținutul relativ de produși de reacție [%] (MALDI-TOF MS)				
		DL	D	TL	T	Tr
<i>P. fluorescens</i>	24	n.d.	100,00	n.d.	n.d.	n.d.
	48	n.d.	100,00	n.d.	n.d.	n.d.
	72	4,46	93,54	1,99	n.d.	n.d.
	120	4,55	87,82	1,91	5,71	n.d.
<i>P. stutzeri</i>	24	n.d.	100,00	n.d.	n.d.	n.d.
	48	4,56	82,69	4,69	8,05	n.d.
	72	3,02	73,92	0,44	20,54	1,35
	120	7,19	82,93	0,93	8,84	0,60

CALB	24	n.d	100,00	n.d.	n.d.	n.d.
	48	n.d.	100,00	n.d.	n.d.	n.d.
	72	n.d.	53,37	n.d.	46,63	n.d.
	120	n.d.	65,55	n.d.	34,45	n.d.
<i>Alcaligenes</i> sp	24	n.d.	100,00	n.d.	n.d.	n.d.
	48	n.d.	100,00	n.d.	n.d.	n.d.
	72	n.d.	100,00	n.d.	n.d.	n.d.
	120	n.d.	100,00	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.-nu s-a determinat. DL-dilactonă, D-dimer (monoestolidă), TL-trilactonă, T-trimer, Tr-tetramer

2.3.7. Selecția biocatalizatorilor imobilizați

Utilizarea enzimelor imobilizate prezintă avantaje deosebite în ceea ce privește stabilitatea termică și posibilitatea de reutilizare a acestora.

Pentru a compara eficiența catalitică și selectivitatea lipazelor imobilizate în reacțiile de elongare a catenei au fost testate diferite lipaze, dar și o protează imobilizată, disponibile comercial. Activitatea hidrolitică a lipazelor imobilizate a fost determinată conform metode 3.18.2 iar rezultatele sunt prezentate în Tabel 2.8. Dintre preparatele selecționate activitățile hidrolitice cele mai ridicate au fost obținute pentru lipazele imobilizate prin înrețelare din *P. stutzeri*.

Tabel 2.8. Activitățile lipazelor imobilizate în reacția de hidroliză a *p*-nitro-fenil-palmitatului

Lipaza imobilizată	Activitate [U]	Activitate [U/mg]
CLEA <i>Ca</i> B	0,68	1,53
CLEA <i>P. stutzeri</i> OM	0,32	10,61
CLEA <i>P. stutzeri</i>	0,42	16,70
Novozyme	0,12	3,06
Lipozyme	0,39	7,65

Reacțiile de sinteză a estolidelor au fost efectuate în toluen la 75°C, timp de 24h la o concentrație de substrat de 5 mM. Lipazele testate au fost imobilizate prin înrețelare (CLEA) din *P. stutzeri* (CLEA-*P. stutzeri* și CLEA *P. stutzeri* OM), *C. antarctica* (CLEA *Ca*B), iar alte două lipaze au fost adsorbite pe silice, Lipozyme TL (*T. lanuginosus*), respectiv pe o rășină acrilică, Novozyme 435 (*C. antarctica*).

Pe baza spectrelor MALDI-TOF au fost calculate masele moleculare medii numerice (M_n) și gravimetrice (M_w) și valorile indicelui de polidispersitate (PDI), 3 indici des utilizați în domeniul polimerilor.

Masa moleculară medie numerică (M_n), este considerată una dintre masele moleculare medii cele mai relevante și reprezintă raportul dintre masa totală a polimerului și numărul de macromolecule pe care le conține.

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_x N_x \cdot M_x}{\sum_x N_x} = \sum_x X_x M_x$$

2.3. Biotransformări ale hidroxi-acizilor grași cu lipaze libere și imobilizate 65

în care N_x este numărul de macromolecule de lungime x , care au masa M_x , iar X_x este funcția de distribuție numerică

În calculul **masei moleculare medii gravimetrice (M_w)**, se ține cont și de mărimea sau greutatea lor polimerilor și se calculează pe baza relației:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_x N_x \cdot M_x^2}{\sum_x N_x M_x}$$

Raportul dintre masa moleculară medie gravimetrică (M_w) și masa moleculară medie numerică (M_n) reprezintă indicele de polidispersie (PDI) și oferă informații despre distribuția maselor moleculare în amestecul de polimeri.

$$PDI = \frac{M_w}{M_n}$$

Valorile acestor indici calculați pentru estolidele obținute utilizând lipaze imobilizate, cât și conversiile determinate pe baza spectrelor GC-MS sunt prezentate în Tabel 2.9. Deși în cazul substratului 16HHDA s-au obținut cele mai ridicate valori ale conversiilor (mai mari de 70%), gradul de polimerizare cel mai ridicat (DP_{max} 10) a fost obținut în cazul substratului RCA utilizând lipaza *CLEA P. stutzeri*. Spectrul MALDI al unui produs de reacție pe bază de acid ricinoleic este prezentat în Figura 2.28, în care semnalele corespunzătoare maselor moleculare ale speciilor ciclice ca dilactona, cât și a formelor liniare au fost identificate ca și aducți de K^+ .

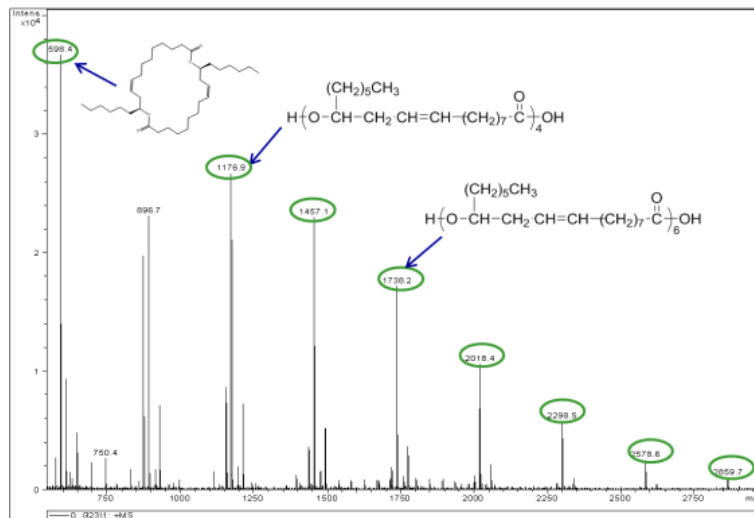


Figura 2.29 Spectrul MALDI-TOF al estolidelor sintetizate pe bază de acid ricinoleic, folosind lipaza *CLEA P. stutzeri*

Formarea estolidelor cu grad de polimerizare între 2 și 10 se poate observa în cazul RCA pe baza spectrului MALDI-TOF MS (Figura 2.29). Estolide cu mase moleculare mai mici formate din acid ricinoleic au fost sintetizate utilizând lipaza imobilizată din *Staphylococcus xylosus*.

Conform Tabel 2.9, dintre lipazele testate lipaza CLEA *P. stutzeri* a fost cea mai eficientă pentru formarea estolidelor, în cazul tuturor celor 4 substraturi. În cazul 12HSA toate lipazele testate cu excepția lipazei CLEA *P. stutzeri* au dus la formarea monoestolidei ca produs unic de reacție, în timp ce lipaza din *P. stutzeri* a favorizat și formarea dilactonei și a estolidelor până la DP_{max} 7. În cazul 10HSA, așa cum era de așteptat, gradul de esterificare a fost mai scăzut probabil și datorită formării produșilor ciclici de reacție. Rezultate interesante s-au obținut și cu Alcalaza CLEA, care deși este o protează a prezentat activitate de esterificare.

Tabel 2.9. Sinteza derivaților de hidroxi-acizi grași folosind lipaze imobilizate ca și catalizator. DP_{max} – gradul de maxim de polimerizare

Substrat	Conversia[%]	ENZIMĂ			
		M_n	M_w	PDI	DP_{max}
LIPOZYME					
10HSA	57,3	659	659	1,00	2
16HHDA	91,6	986	1040	1,05	5
12HSA	66,7	659	659	1,00	2
RCA	76,8	630	630	1,00	2
NOVOZYME					
10HSA	65,7	659	659	1,00	2
16HHDA	92,8	714	779	1,09	5
12HSA	97,6	659	659	1,00	2
RCA	82,9	655	655	1,00	2
CLEA <i>Ca/B</i>					
10HSA	65,1	659	659	1,00	2
16HHDA	98,6	1067	1190	1,11	9
12HSA	66,2	659	659	1,00	2
RCA	73,1	655	655	1,00	2
CLEA <i>P. stutzeri</i>					
10HSA	66,5	750	782	1,04	5
16HHDA	97,8	966	1034	1,07	7
12HSA	74,9	749	795	1,06	7
RCA	92,9	1140	1326	1,16	10
CLEA Alcalase					
10HSA	35,2	659	659	1,00	2
16HHDA	60,2	595	612	1,02	3
12HSA	22,6	659	659	1,00	2
RCA	45,8	655	655	1,00	2

2.3.7. Caracterizarea estolidelor

Structura estolidelor sintetizate a fost confirmată pe lângă spectrometria de masă MALDI-TOF și prin spectrofotometrie FT-IR și spectroscopie RMN.

În spectrele FT-IR corespunzătoare derivaților de 10HSA, 12HSA, RCA și 16HHDA se observă o deplasare a benzii corespunzătoare grupării carbonil de la valori de 1696 cm^{-1} spre 1716 cm^{-1} (10HSA-Figura A 10), 1694 cm^{-1} spre 1703 cm^{-1} (12HSA Figura A 11), 1708 cm^{-1} spre 1720 cm^{-1} , (RCA, Figura A 12), 1681 cm^{-1} spre 1693 cm^{-1} (16HHDA, Figura A 13).

Formarea legăturii esterice a fost confirmată prin spectroscopie RMN. În spectrul ^{13}C -RMN (Figura 2.30) se observă în zona deplasărilor chimice specifice atomilor de carbon carbonilici (170-180 ppm) apariția unui semnal nou la 173.97 ppm, diferit de semnalul atomului de carbon carboxilic de la 176.52 ppm.

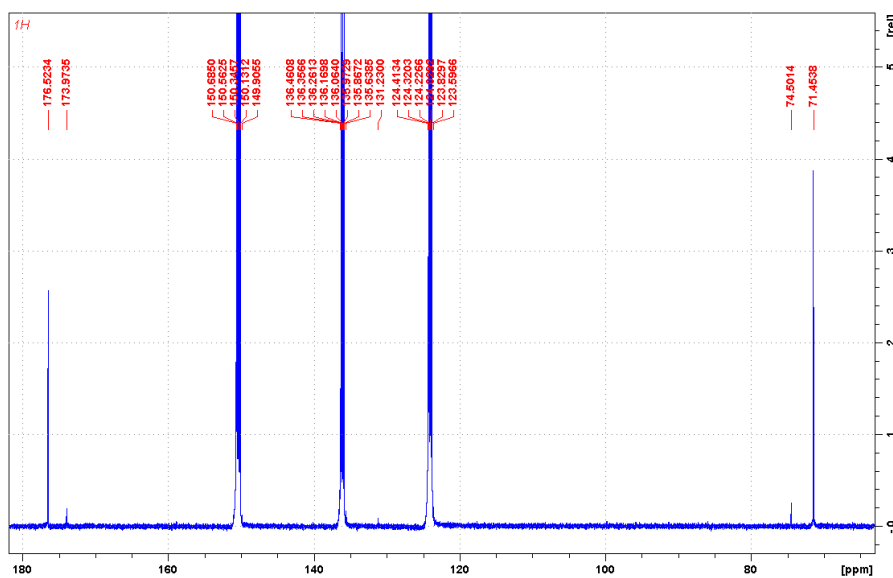


Figura 2.30 Spectrul ^{13}C -RMN al derivatului de 10HSA

Formarea monoestolidei (Figura 2.31) a fost confirmată și prin spectroscopie bidimensională ^1H - ^{13}C HMBC prin intermediul cuplajelor la distanță dintre atomul de carbon (C-1) de la 174 ppm și protonii de la 2.48 ppm (cuplaj ^2J) și respectiv protonii de la 1.76 ppm (cuplaj ^3J) (Figura 2.32).

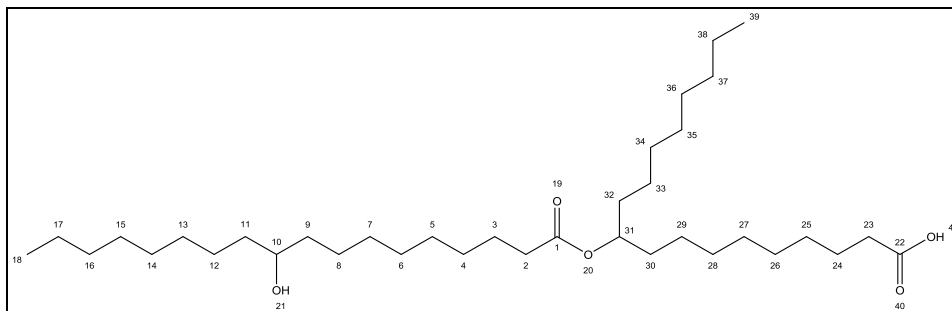


Figura 2.31 Structura monoestolidei de 10HSA

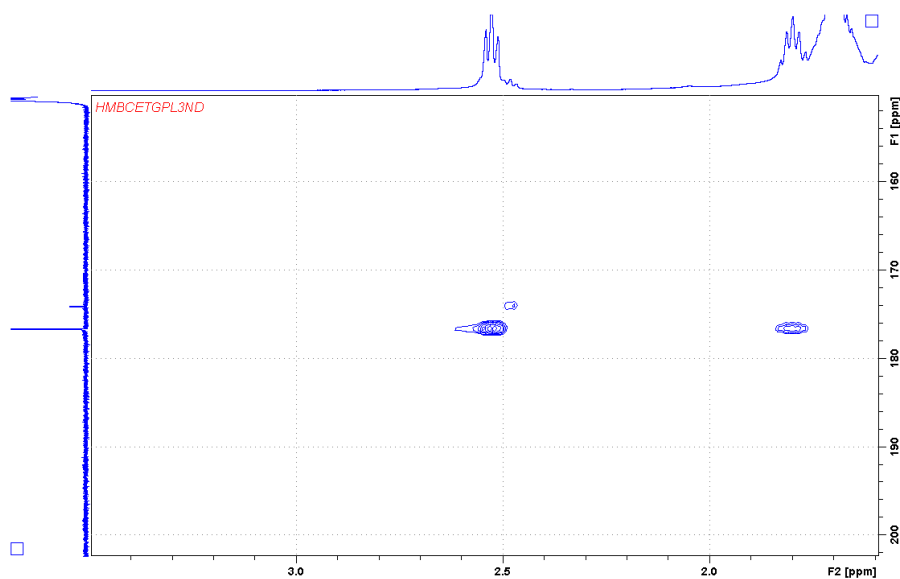


Figura 2.32 Spectrul HMBC al derivatului de 10HSA

2.3.7.1. Caracterizarea estolidelor prin termogravimetrie

Scopul caracterizării estolidelor prin termogravimetrie este de a evalua stabilitatea termică a acestora pe diferite intervale de temperatură. Având în vedere natura organică a compușilor studiați, intervalul de temperatură selectat pentru analiza acestora a fost 20°C-600°C.

În Figura 2.33 sunt exemplificate termogramele estolidei corespunzătoare 10HSA (roșu) în comparație cu materia primă 10HSA (verde). Din alura curbelor TG se poate observa că atât produsul cât și standardul de 10HSA prezintă trei puncte de inflexiune, relativ apropiate ca valoare, ceea ce indică faptul că descompunerea are loc în trei etape. Aceleași tendințe au fost observate și în cazul derivaților de 12HSA. Valorile pierderilor de masă prezentate în Tabel 2.10 indică faptul că estolidele sintetizate, cu excepția E_16HHDA, se descompun în proporție de aprox. 90% până la 400°C, în timp ce E_16HHDA pierde doar aprox. 35,26% din masa inițială.

2.3. Biotransformări ale hidroxi-acizilor grași cu lipaze libere și imobilizate 69

În cazul 16HHDA degradarea are loc în două etape, acest lucru fiind confirmat de cele două puncte de inflexiune observate pe termogramele corespunzătoare (Figura A 8). Deoarece atât acidul ricinoleic cât și produsul de reacție al acestuia se regăsesc la temperatura camerei în fază lichidă, vâscoasă, pentru analiza acestora a fost necesară alegerea unui alt interval de temperatură și anume -100°C-500°C.

Tabel 2.10. Pierderile de masă pe diferite intervale de temperatură pentru estolide 10HSA, 12HSA, RCA, 16HHDA

Proba	Pierderile de masă (%)			
	20°C-200°C	20°C-300°C	20°C-400°C	20°C-500°C
E10HSA	0,51	45,70	94,29	96,49
E12HSA	2,37	46,14	94,88	96,29
ERCA	1,08	7,35	90,36	97,21
E16HHDA	2,28	18,87	35,26	95,50

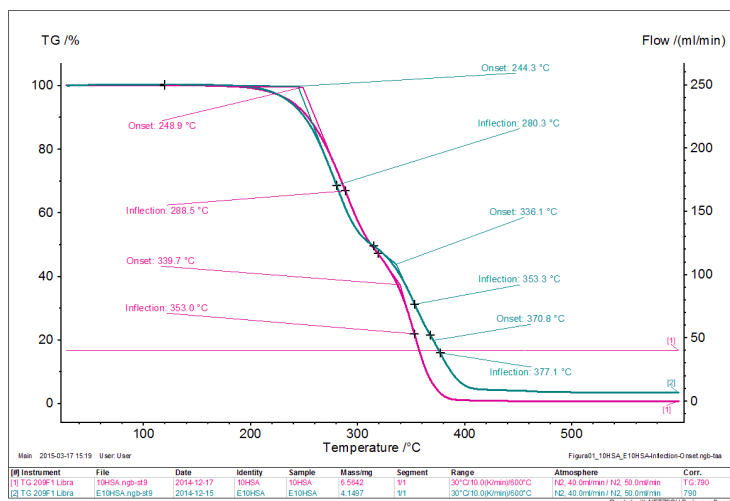


Figura 2.33 Termogramele 10HSA și a estolidei corespunzătoare

2.3.7.2. Caracterizarea estolidelor prin calorimetrie diferențială de baleiaj (DSC)

Analizele DSC s-au efectuat cu scopul de a evidenția efectul termic datorat transformărilor de fază pe domenii specifice de temperatură, și de a punctul critic al transformărilor de fază la încălzirea probei.

Analizele DSC ale produșilor de reacție au fost realizate cu o viteză de încălzire de 10K/min în intervalul de temperatură 20°C-590°C. Pe baza diagramelor suprapuse (Figura 2.34) pentru derivații de 10HSA se poate observa că tranziția corespunzătoare produsului este la o temperatură mai joasă cu aproximativ 12°C față de cea a 10HSA.

Aceleași tendințe au fost observate și pentru 12HSA și 16HHDA, temperaturile de topire ale produșilor de reacție fiind mai scăzute (Tabel 2.11). Totuși valorile

temperaturilor de topire (temperatura la peak) cele mai ridicate au fost cele ale derivatului de 16HHDA.

Tabel 2.11. Temperatura la peak și ΔH determinate pe baza curbelor DSC

Proba	Temperatura la peak [°C]	ΔH [J/g]	Proba	Temperatura la peak [°C]	ΔH [J/g]
10HSA	88,4	359,0	E_10HSA	75,8	74,86
12HSA	84,0	356,0	E_12HSA	74,7	89,55
RCA	n.d.	362,3	E_RCA	5,1	n.d.
16HHDA	101,7	423,2	E_16HHDA	91,1	212,3

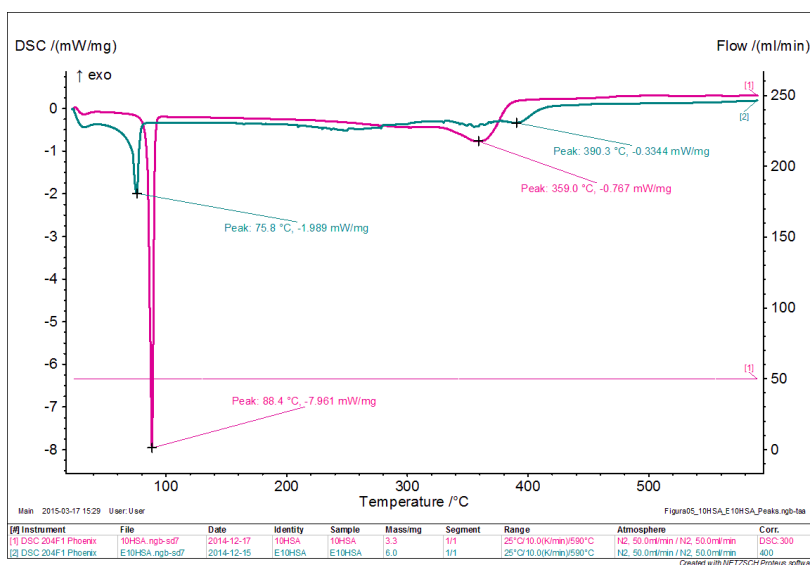


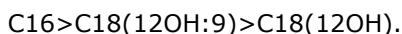
Figura 2.34 Curbele DSC ale 10HSA și a estolidelor corespunzătoare

2.3.8. Concluzii parțiale

Acidul 10HSA a fost sintetizat și caracterizat în detaliu prin metode spectroscopice. Prin spectroscopie RMN s-a demonstrat puritatea enantiomerică a acestui compus.

Utilizarea celor 4 hidroxi-acizi grași ca și substraturi pentru lipaze a condus la sinteza unor estolide noi, a căror structură a fost demonstrată pe baza spectrelor MALDI-TOF MS, RMN și FT-IR. Formarea produșilor de reacție este influențată de poziția grupării OH și de gradul de nesaturare a substratului dar și de sursa lipazei. Sinteza mono- și macrolactonelor a fost favorizată de lipazele din *P. fluorescens* *P. stuzeri*, *T. lanuginosus*.

Tendința de elongare vs. lactonizare este favorizată de temperatură, concentrația de substrat și creșterea valorii log P a solventului (de solvenți nepolari). Selectivitatea lipazelor față de substraturi descrește în următoarea ordine:



2.4. Sinteza și caracterizarea copolimerilor ϵ -caprolactonei cu hidroxi-acizi grași catalizată de lipaze

Proprietățile termice dar și fizice ale estolidelor prezentate în subcapitolul 2.3 limitează aplicabilitatea acestor compuși în domeniul polimerilor. Utilizarea estolidelor ca polimeri este limitată de proprietățile termice nefavorabile. O soluție eficientă pentru eliminarea acestor dezavantaje ar putea fi copolimerizarea cu alți monomeri de tipul lactonelor precum ϵ -caprolactona, astfel încât să se obțină copolimeri cu proprietăți fizice adecvate unor utilizări practice.

Deoarece poli-(ϵ)-caprolactona este un polimer biodegradabil, biocompatibil dar cu o serie de dezavantaje precum hidrofilicitate scăzută, punct de topire scăzut ($\sim 60^\circ\text{C}$), biodegradabilitate lentă, copolimerizarea cu hidroxi-acizi grași poate reprezenta o abordare interesantă și totodată o soluție de îmbunătățire a proprietăților atât pentru poli-(ϵ)-caprolactonă cât și pentru estolide.

În acest capitol cei 4 hidroxi-acizi testați în capitolul 2.3 (acidul 10-hidroxi stearic, acidul 12-hidroxistearic, acidul ricinoleic și acidul 16-hidroxihexadecanoic) au fost utilizați individual ca și co-substraturi în reacții de copolimerizare biocatalitică cu ϵ -caprolactonă.

Prođușii de reacție posibili s-au exemplificat pentru reacția în care acidul 10-hidroxistearic și ϵ -caprolactona au fost utilizați ca monomeri (Figura 2.35). Aceștia pot fi: copolimeri liniari sau ciclici, dar și homopolimeri (ca și produși secundari de reacție) atât de tipul poli- ϵ -caprolactonei dar și estolide, liniare sau ciclice.

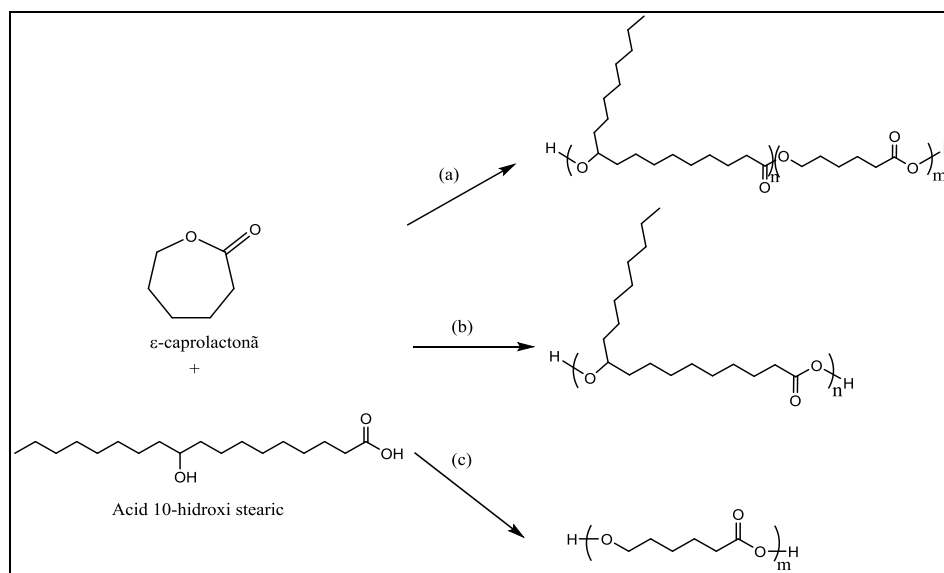


Figura 2.35 Copolimerizarea 10HSA cu ϵ -caprolactonă, catalizată de lipaze

2.4.1. Selecția biocatalizatorului

Pentru selecția biocatalizatorului au fost selectate și testate enzime imobilizate (Novozyme 435, Lipozyme, două tipuri de lipază din *P. stutzeri* (CLEA), una specifică pentru mediu organic (OM) și una cu aplicabilitate generală) dar și lipaza nativă din *P. fluorescens*, care s-a dovedit eficientă în studiile de sinteză a estolidelor. Ca și mediu de reacție s-a folosit toluenul, solvent în care ambele substraturi au fost solubile. Reacțiile au fost efectuate conform metodei 3.19 utilizând un raport lipază/substrat de 50 U/mmol. Conversia substraturilor a fost monitorizată prin GC-MS, folosind hexadecan ca și standard intern conform metodei 3.21. Datorită reactivității ridicate a ϵ -caprolactonei, la sfârșitul reacțiilor acest monomer nu a mai fost prezent în amestecul de reacție, conversia ei fiind mai mare de 98%.

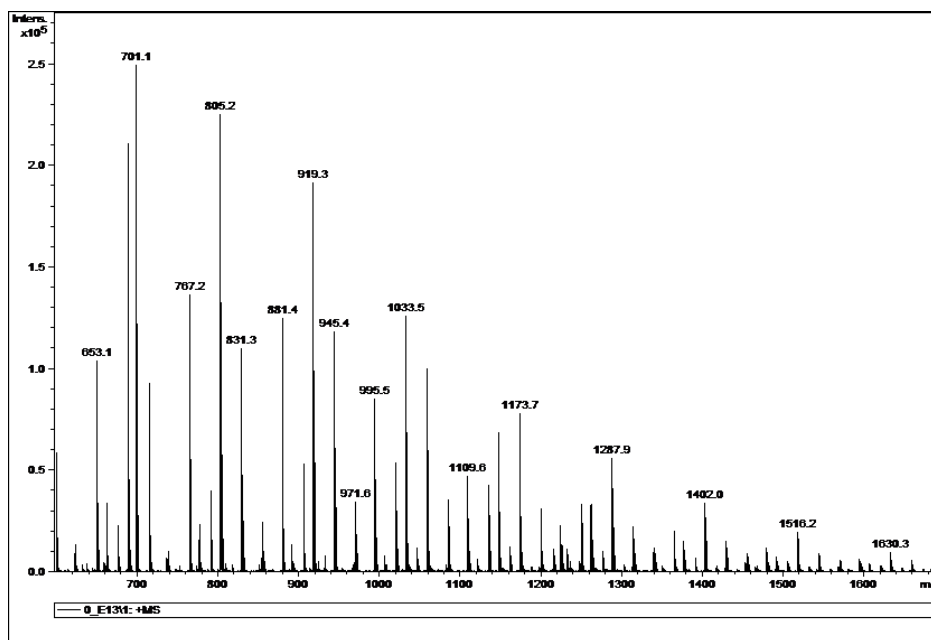


Figura 2.36 Spectrul MALDI-TOF MS al produsului 16ECL

Formarea copolimerilor a fost demonstrată prin MALDI-TOF MS. În Figura 2.36 este prezentat spectrul MALDI-TOF MS al produșilor de reacție în care se regăsesc valorile m/z 831, 1199 și 1568 corespunzătoare aducțiilor de K^+ ai produșilor de reacție de tipul $(16HHDA-ECL)_n$, $n=2-5$. În spectrul MALDI-TOF MS se observă și prezența produșilor de reacție de tipul $[(16HHDA)_n-(ECL)_m]$ de exemplu valorile corespunzătoare peak-urilor m/z 691,05 805,19 919,33 1033,47 1147,61 corespund aducțiilor de K^+ de tipul $[(16HHDA)_n-(ECL)_m]$, unde $n=1$, $m=2-11$ iar valorile 945,45, 1059,59, 1173,73, 1287,87, 1402,01, 1516,15, 1630,29 sunt corespunzătoare moleculelor unde $n=2$ și $m=3-11$.

2.4. Sinteza și caracterizarea copolimerilor ϵ -caprolactonei cu hidroxi-acizi grași 73

Conform Tabel 2.12 conversiile cele mai ridicate ale co-monomerului hidroxi-acid, precum și masele moleculare cele mai mari s-au obținut în cazul 16HHDA. Conversia co-monomerului ECL a fost în toate cazurile mai mare de 99%, conform spectrelor GC-MS, în care semnalul corespunzător ECL nu a fost regăsit.

Dintre enzimele testate, lipazele imobilizate comerciale Novozyme 435 și Lipozyme TL s-au dovedit cele mai eficiente pentru toate cele 4 co-substraturi, atât în ceea ce privește conversia cât și valorile maselor moleculare medii, gradului de polimerizare maxim și conținuturilor relative de copolimeri, calculate pe baza spectrelor MALDI-TOF MS. Comparând aceste două lipaze, se observă că în reacțiile catalizate de Lipozyme TL s-a obținut un conținut relativ mai ridicat de oligomeri liniari. Preparatele CLEA au favorizat inserția hidroxi-acizilor grași în catena PCL, dar masele moleculare medii au fost mai scăzute în comparație lipazele Novozyme 435 și Lipozyme TL.

Tabel 2.12. Masele moleculare medii, PDI, determinate pentru copolimerii de ECL și HFA

Co-substrat	Lipaza	Conversia HFA [%]	M_n _C	M_w _C	PDI	DP_{max} _C	CL [%]	CC [%]
10HSA	<i>P. fluorescens</i>	73,3	727	793	1,09	8	51,8	17,0
	Novozyme 435	88,3	1215	1284	1,05	9	46,7	19,6
	Lipozyme	88,6	1052	1146	1,09	11	83,1	0,4
	CLEA <i>P stutzeri</i>	67,2	663	702	1,06	6	59,2	15,7
	CLEA <i>P st</i> OM	75,9	741	826	1,11	10	56,6	18,9
12HSA	<i>P. fluorescens</i>	75,8	855	887	1,03	9	52,6	20,4
	Novozyme 435	87,2	1169	1399	1,19	14	50,7	17,5
	Lipozyme	89,7	913	1002	1,09	13	60,7	0,2
	CLEA <i>P stutzeri</i>	86,4	806	908	1,12	11	54,6	19,1
	CLEA <i>P st</i> OM	83,3	693	751	1,08	11	57,8	15,3
RCA	<i>P. fluorescens</i>	76,9	1304	1426	1,09	11	18,8	16,8
	Novozyme 435	91,4	1145	1291	1,12	10	59,9	16,3
	Lipozyme	94,3	917	1009	1,10	9	55,1	21,1
	CLEA <i>P stutzeri</i>	74,6	997	1086	1,09	8	32,8	21,8
	CLEA <i>P st</i> OM	83,2	694	730	1,05	7	37,3	18,6
16HHDA	<i>P. fluorescens</i>	98,3	1177	1294	1,09	12	57,5	18,2
	Novozyme 435	99,1	1321	1479	1,12	15	54,7	21,9
	Lipozyme	99,1	1101	1232	1,12	15	62,4	18,5
	CLEA <i>P stutzeri</i>	98,7	724	825	1,14	9	78,8	1,9
	CLEA <i>P st</i> OM	99,3	677	764	1,13	8	76,5	4,5

2.4.2. Caracterizarea produșilor de reacție prin RMN, TG și DSC

Inserția acizilor grași în catena hidrofobă a poli- ϵ -caprolactonei a fost demonstrată pe baza spectrelor bidimensionale ^1H - ^{13}C HMBC. Pentru exemplificare în Figura 2.36 este prezentat spectrul ^1H - ^{13}C HMBC al copolimerului sintetizat utilizând 16HHDA și ECL în care se observă cuplajele la distanță dintre atomul de carbon carbonilic de la 173.7 ppm (C-1) și protonii de la 4.18 ppm (H_2C -33, 3J), de la 2.4 ppm (H_2C -2, 2J) și respectiv cu protonii de la 1.69 ppm (H_2C -3, 3J).

În spectrul ^{13}C RMN se observă prezența mai multor semnale în zona corespunzătoare grupărilor carbonil ceea ce confirmă existența mai multor tipuri de produși și este în concordanță cu spectrul MALDI-TOF MS (Figura 2.37).

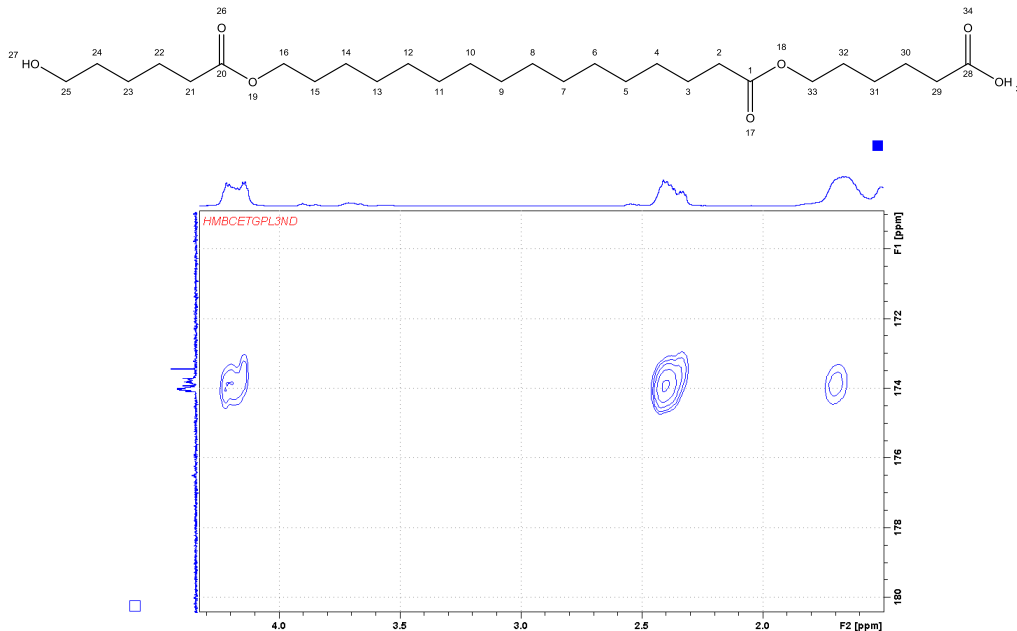


Figura 2.37 Spectrul HMC al copolimerilor 16HHDA-ECL.

Stabilitatea termică a copolimerilor este mai bună decât a estolidelor (Figura 2.38), fapt dovedit de valorile pierderilor de masă prezentate pe diferite intervale de temperatură în Tabel 2.13. Până la 300°C pierderea de masă a copolimerilor a fost de până la 35% în timp ce la estolide valorile depășeau 45% pentru E_10HSA și E_12HSA. În comparație însă cu PCL (homopolimerul corespunzător ϵ -caprolactonei), cu excepția probei 16HHDA_ECL, stabilitatea termică a fost mai scăzută.

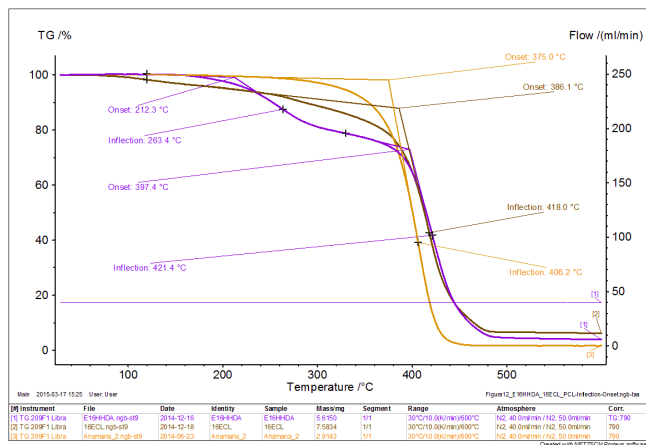


Figura 2.38 Termogramele copolimerilor 16HHDA cu ECL și a homopolimerilor corespunzători

2.4. Sinteza și caracterizarea copolimerilor ε –caprolactonei cu hidroxi-acizi grași 75

Tabel 2.13. Pierderile de masă pe diferite intervale de temperatură pentru copolimerii HFA cu ECL

Proba	Pierderile de masa [%]			
	20°C-200°C	20°C-300°C	20°C-400°C	20°C-500°C
10ECL	2,93	30,80	78,98	94,21
12ECL	1,34	33,03	92,96	96,76
RCA-ECL	7,34	35,85	83,97	97,82
16ECL	4,76	11,27	35,23	93,42
PCL	0,39	2,83	49,14	98,30

Analizele DSC ale produșilor de reacție au fost realizate cu o viteză de încălzire de 10K/min în intervalul de temperatură 20°C-590°C. Pe baza diagramelor suprapuse (Figura 2.39) pentru derivații de 16HHDA cu ECL se poate observa că temperatura de topire a produsului este ca valoare între cele două materii prime, la 72,4°C.

Aceleași tendințe au fost observate și pentru copolimerii 12ECL și 16ECL, temperaturile de topire ale produșilor de reacție fiind mai scăzute în comparație cu PCL. Totuși valorile temperaturilor de topire (temperatura la peak) cele mai ridicate au fost cele ale derivatului de 16HHDA-ECL (Tabel 2.14)

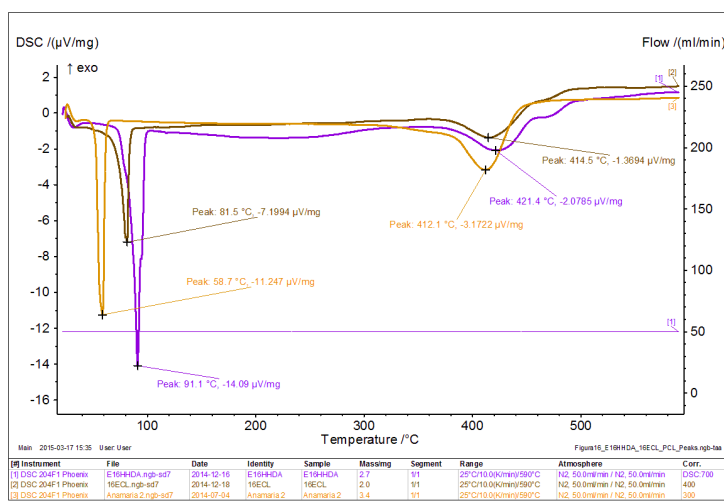


Figura 2.39 Curbele DSC ale copolimerilor 16HHDA cu ECL și a homopolimerilor corespunzători

Tabel 2.14. Temperatura la peak și ΔH determinate pe baza curbelor DSC

Proba	Temperatura la peak [°C]	ΔH [J/g]	Proba	Temperatura la peak [°C]	ΔH [J/g]
10HSA	88,4	359,0	10ECL	63,3	365,7
12HSA	84,0	356,0	12ECL	72,4	363,2
RCA	n.d	362,3	RCA_ECL	n.d	352,2
16HHDA	101,7	423,2	16ECL	81,5	414,5

n.d.-nu s-a determinat

2.4.3. Influența temperaturii

Efectul temperaturii asupra conversiei, a tipurilor de produși formați și a gradului de polimerizare a fost studiată pentru sistemul de reacție 16HHDA-ECL, în raport molar 1:1 la concentrație de 30 mM. Ca și biocatalizator s-a utilizat lipaza Lipozyme TL, iar intervalul de temperatură selectat a fost 40°C-80°C.

Conversiile au fost calculate pe baza spectrelor GC-MS, iar formarea produșilor de reacție a fost monitorizată prin spectrometrie MALDI-TOF MS. Rezultatele prezentate în Figura 2.40 indică o creștere a maselor moleculare medii cu 35% odată cu creșterea temperaturii în intervalul studiat. O tendință și mai pronunțată se observă pentru valorile conținutului relativ de copolimeri CP, pentru care la 80°C a fost mai mare de 80%, pe baza valorilor calculate din spectrele MALDI.

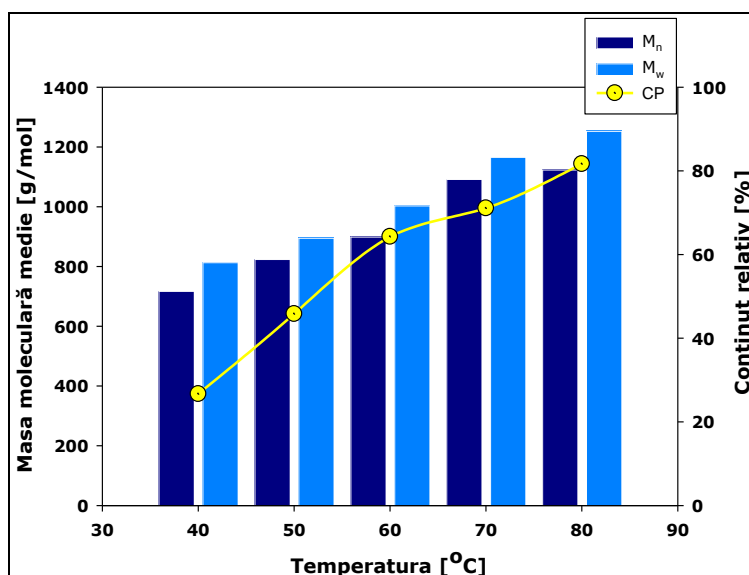


Figura 2.40 Influența temperaturii asupra maselor moleculare medii și a conținutului de copolimeri de tipul 16HHDA-ECL.

2.4.4. Studiul utilizării biocatalizatorului în mai multe cicluri de reacție

Pe baza rezultatelor prezentate în Tabel 2.12, în studiul reutilizării biocatalizatorului au fost selectate lipaza Lipozyme TL și acidul 16HHDA în calitate de co-substrat. Acest studiu s-a realizat pentru 4 cicluri de reacție, iar după fiecare ciclu probele au fost analizate prin spectrometrie MALDI-TOF MS pentru a stabili efectul reutilizării biocatalizatorului asupra maselor moleculare medii și a distribuției produșilor de reacție. Rezultatele sunt prezentate în Tabel 2.15. Se poate observa o creștere a valorilor calculate pentru masele moleculare medii după fiecare ciclu, confirmând faptul că activitatea lipazei nu este afectată și are loc chiar o activare a

2.4. Sinteza și caracterizarea copolimerilor ϵ -caprolactonei cu hidroxi-acizi grași 77

lipazei. Acest efect a mai fost observat și raportat în literatură pentru lipaze după mai multe cicluri de reutilizare [1, 100]. Analiza compoziției produșilor de reacție indică un conținut relativ de copolimeri mai mare de 80%, dar în același timp și creșterea conținutului relativ produși ciclici după fiecare ciclu de reacție.

Tabel 2.15. Rezultatele obținute la reutilizarea preparatului Lipozyme TL utilizând 16HHDA și ECL ca și substrat

Ciclu de utilizare	M_n	M_w	PDI	CL	CC	CP	HL	HC	DP_{ma} x
1	1101	1232	1,12	62,4	18,5	80,9	18,9	0,3	15
2	1030	1219	1,18	67,4	22,1	89,5	4,8	5,5	13
3	1151	1342	1,16	61,3	29,1	84,2	5,1	4,3	14
4	1257	1462	1,16	58,5	33,8	92,3	4,6	3,0	15

2.4.5. Concluzii parțiale

Au fost sintetizați 4 noi tipuri de copolimeri ai hidroxi-acizilor grași cu ϵ -caprolactonă, utilizând ca biocatalizatori lipaze libere și imobilizate.

Mase moleculare medii cele mai mari ale copolimerilor s-au obținut în cazul folosirii preparatelor comerciale Lipozyme TL și Novozyme 435.

Structurile produșilor de reacție au fost demonstrate prin spectrometrie de masă MALDI-TOF MS și RMN.

Rezultatele analizei termice indică o stabilitate mai ridicată a produșilor față de estolidele corespunzătoare și mai redusă față de homopolimerul PCL.

2.5. Sinteza și caracterizarea copolimerilor ϵ -caprolactonei cu δ -gluconolactonă catalizată de lipaze [202]

Sinteza unor biopolimeri prin greșarea/insertia ECL a fost intens studiată în ultimii ani utilizând de cele mai multe ori $Sn(Oct)_2$ ca și catalizator, în timp ce lipaze din diferite surse au fost utilizate în majoritatea cazurilor doar pentru degradarea enzimatică a acestora.

Datorită hidrofobicității ridicate ale PCL în acest capitol a fost studiată insertia unităților de acid 2,3,4,5,6-pentahidroxi-caproic, prin utilizarea de δ -gluconolactonei (GL) ca și co-substrat. GL este un material relativ ieftin, care se poate obține pe cale enzimatică prin oxidarea glucozei, conform schemei de reacție din Figura 2.41.

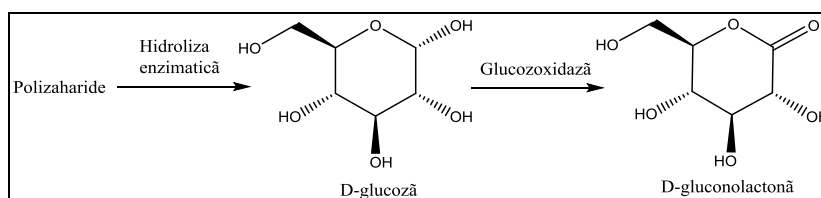


Figura 2.41 Sinteza enzimatică a δ -gluconolactonei

Prođușii de reacție posibili sunt prezentați în Figura 2.42, iar aceștia pot fi: copolimeri liniari (a) sau ciclici (b) dar și homopolimeri de ECL (PCL), de asemenea liniari (c) sau ciclici (d). Formarea homopolimerilor ca și produși secundari de reacție se datorează (i) solubilității mai ridicate a ECL în solvenți nepolari în comparație cu solubilitatea derivaților de zaharuri, fiind astfel favorizat accesul ECL în situsul catalitic al enzimei, dar și (ii) reactivității ridicate ale lactonelor cu ciclul de 7 [203]

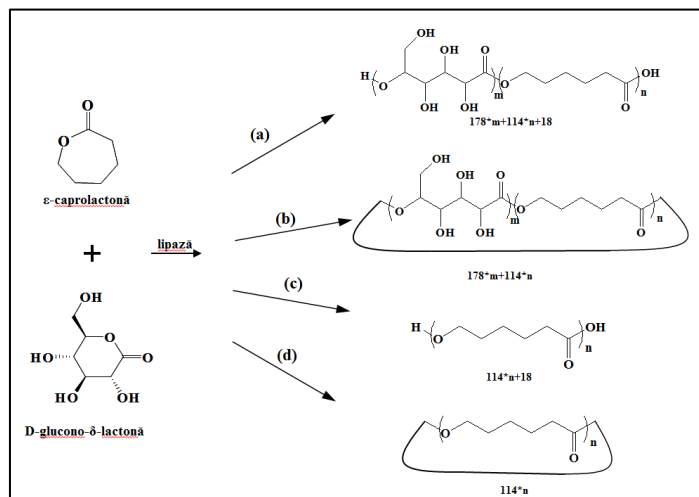


Figura 2.42 Formarea copolimerilor liniari (a) și ciclici (b) și a homopolimerilor liniari (c) și ciclici (d) ca și produși posibili de reacție. Structurile indică formulele de calcul corespunzătoare oligomerilor, m reprezentând numărul de unități de GL și n , numărul de unități de ECL

Formarea produșilor de reacție a fost monitorizată prin spectrofotometrie FT-IR, observându-se o deplasare a benzilor corespunzătoare grupării carbonil de la 1721 cm^{-1} în ECL și 1722 cm^{-1} în GL la 1766 cm^{-1} pentru ester (Figura 2.43).

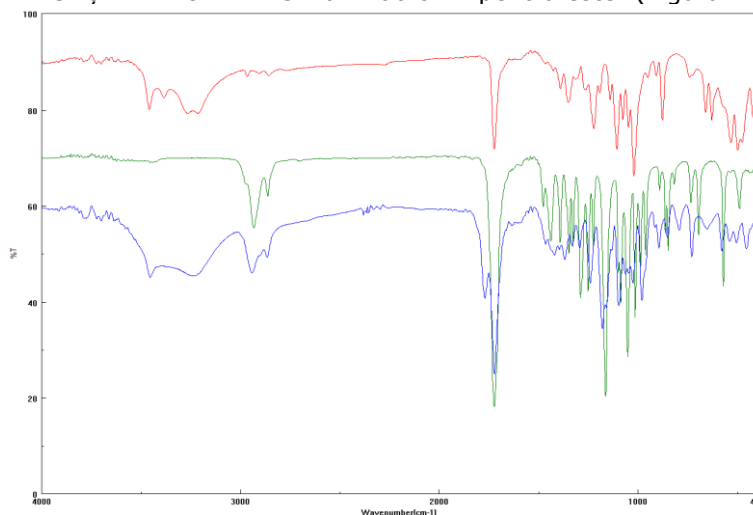


Figura 2.43 Spectrele FT-IR ale (a) GL; (b) ECL; (c) produsul de reacție obținut după 24 h de reacție fără solvent, în prezența lipazei imobilizate în matrici de sol-gel

2.5. Sinteza și caracterizarea copolimerilor ϵ -caprolactonei cu δ -gluconolactonă 79

Prođușii de reacție au fost identificați pe baza spectrelor MALDI-TOF MS. În Figura 2.44 este prezentat un spectru MALDI-TOF MS pentru produșii de reacție obținuți în sistem de reacție fără solvent, utilizând lipaza entrapată în matrici de sol-gel ca și biocatalizator. Semnalele care pot fi atribuite aducțiilor de sodiu corespunzătoare seriei de oligomeri ($M+Na$) indică formarea de copolimeri liniari și ciclici cu rest de GL în moleculă, dar și formarea homopolimerilor (Figura 39 c,d). De exemplu, peak-ul de la m/z 1131.6 corespunde aductului de sodiu a oligomerului liniar cu grad de polymerizare $n=8$ și o singură unitate de GL inserată $m=1$, în timp ce semnalul de la m/z 1177.6 corespunde aductului de sodiu corespunzător oligomerului ciclic cu $n=7$ și $m=2$ (două unități de GL inserate). Seria de homopolimeri PCL a fost de asemenea regăsită, de exemplu semnalul de la m/z 725.4 demonstrează prezența oligomerului cu $n=9$.

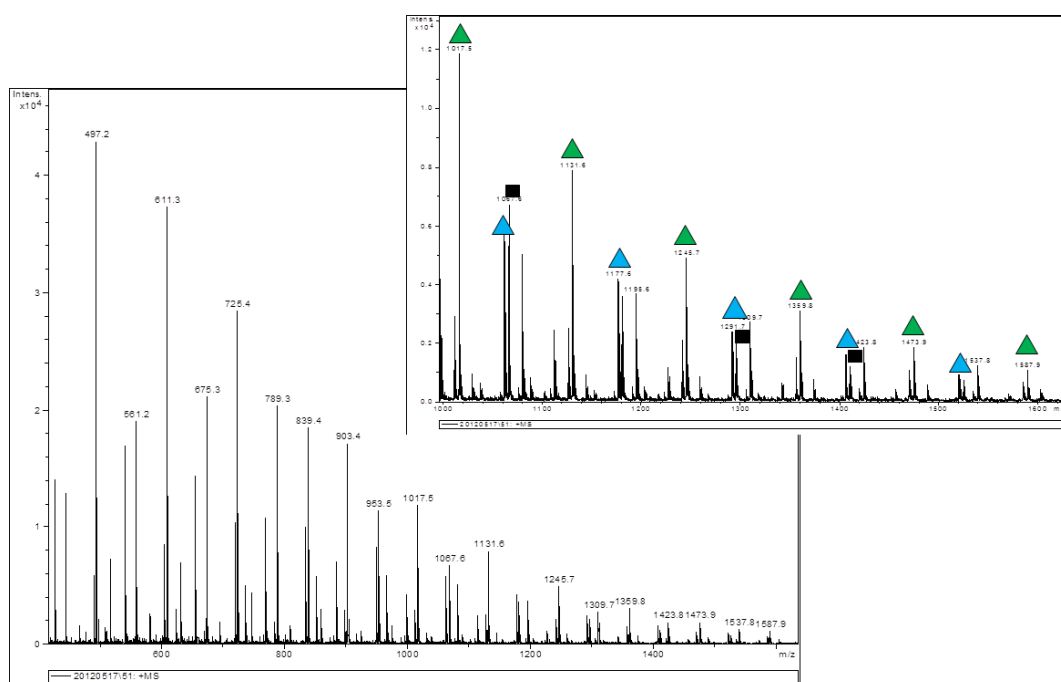


Figura 2.44 Spectrul MALDI-TOF MS al copolimerilor ECL cu GL sintetizați de lipaza CalB entrapată în matrici de sol-gel la 50°C, 24h. Inset: zona 1000-1600 m/z (simboluri: ▲ - copolimeri liniar; ▲ - copolimer ciclic ■ - homopolimer liniar).

2.5.1. Influența mediului de reacție

Alegerea mediului de reacție pentru sinteza copolimerilor are un rol extrem de important, mai ales în condițiile în care solubilitatea co-substraturilor în solvenții nepolari care favorizează reacțiile catalizate de lipaze este scăzută.

În acest studiu au fost testați solvenți organici cu valori ale coeficienților de partiție $\log P$ în intervalul -0,31 și 2,73, dar și sisteme de reacție fără solvent.

Deoarece solvenții potriviți pentru solubilizarea zaharurilor precum dimetil-sulfoxidul, piridina și dimetil formamida pot afecta semnificativ activitatea lipazelor [204], au fost testate și amestecuri de solvenți precum DMSO:*t*-BuOH, piridină:*t*-BuOH, piridină:toluen. În studii anterioare s-a demonstrat că pentru sinteza esterilor

de zaharuri cantități de DMSO de până la 20% în mediul de reacție au fost tolerate de lipaze, cu pierderea doar parțială a activității [205].

Tabel 2.16. Influența mediului de reacție în sinteza copolimerilor ECL și GL

Solvent organic	log P ^a	M _n ^b	M _w ^c	PDI ^d	Conținutul relativ de produs, [%]			
					LC	CC	LH	CH
Dioxan	-0,31	827	934	1,13	21,6	22,0	14,8	46,5
DMSO: <i>t</i> -BuOH 1:4	0,33	539	559	1,03	45,4	17,9	34,4	2,3
DMSO: <i>t</i> -BuOH 1:5	0,60	761	852	1,12	19,0	35,5	42,0	3,4
Piridină	0,71	532	608	1,14	34,4	9,3	54,4	1,9
Piridină: <i>t</i> -BuOH 1:4	0,86	549	631	1,15	16,2	4,3	79,0	0,6
Piridină: <i>t</i> -BuOH 1:5	0,87	560	649	1,16	19,8	5,0	75,0	0,7
Piridină: Toluen 1:10	2,49	1291	1743	1,35	34,0	11,5	39,8	14,6
Toluen	2,73	715	792	1,11	n.d	n.d	93,3	6,7

^alog P - coeficientul de partiție [206] (Sangster 1989,) LC – copolimer liniar; CC – copolimer ciclic; LH – homopolimer liniar; CH- homopolimer ciclic;

Ca și biocatalizator în acest studiu s-a utilizat lipaza Novozyme 435, timpul de reacție fiind de 24 h. Rezultatele, prezentate în Tabel 2.16 arată o ușoară creștere a valorilor maselor moleculare medii M_n și M_w, cu excepția mediului de reacție format din DMSO:*t*-BuOH în raport de 1:4 când masele moleculare au fost mai scăzute datorită sensibilității lipazelor la DMSO, menționată anterior. Au fost observate diferențe importante în ceea ce privește compoziția produsilor de reacție. Conținutul relativ ridicat de copolimeri ciclici explică valoarea mai scăzută a maselor moleculare. În ceea ce privește conținutul relativ mare de homopolimeri, formarea acestora nu a putut fi evitată, probabil datorită excesului de ECL utilizat, mai ales în reacțiile fără solvent.

Datorită conținutului mai ridicat de copolimerii liniari LC față de cei ciclici CC (raportul LC/CC=1,8) obținut în sistemul de reacție fără solvent în comparație cu solvenții organici (în dioxan LC/CC=0,98, în DMSO:*t*-BuOH=1:5 LC/CC=0,53), experimentele următoare au fost efectuate în sisteme fără solvent.

2.5.2. Influența conținutului de apă

Prezența apei în reacțiile catalizate de lipaze s-a dovedit esențială, cu toate că aceste enzime necesită doar cantități reduse de apă pentru a păstra conformația catalitic activă și în consecință își mențin activitatea în solvenți organici în condiții aproape anhidre [207]. De asemenea, apa reprezintă agentul nucleofil pentru etapa de inițiere a reacțiilor de polimerizare cu deschidere de ciclu [208].

2.6. Optimizare reacției de poliesterificare a β -butirolactonei cu δ -gluconolactonă 81

În cazul sistemului de reacție studiat în acest capitol, apa poate avea două efecte opuse, în sensul că poate facilita solubilizarea GL dar în același timp să favorizeze hidroliza. De aceea, investigarea influenței conținutului de apă și determinarea cantității optime de apă au fost considerate esențiale pentru acest proces.

Pentru a controla activitatea apei din sistemul de reacție, substraturile și enzima au fost pre-echilibrate separat, prin menținere timp de 12 de ore într-o incintă închisă în prezența unor soluții saturate de săruri a căror activitate a apei a_w este cunoscută, astfel încât să acopere intervalul între 0,22 și 0,98. Experimentele au fost efectuate la 80°C, timp de 24 h în atmosferă de argon. Distribuția produșilor de reacție și indicii de polidispersie au fost determinați pe baza spectrelor MALDI-TOF MS. Conform rezultatelor prezentate în Tabel 2.17, cele mai mari valori ale maselor moleculare medii s-au obținut în cazul în care pre-echilibrarea s-a realizat cu soluție saturată de sulfat de sodiu, la valori ridicate ale activității apei ($a_w=0,95$). La valori scăzute ale indicelui a_w au fost detectate concentrații mai mari de homopolimeri ciclici, în timp ce formarea copolimerilor ciclici nu a putut fi evitată, indiferent de cantitatea de apă din sistem.

Tabel 2.17. Influența conținutului de apă din mediul de reacție asupra formării copolimerului, utilizând Novozyme 435 ca biocatalizator

Sare	a_w	M_n	M_w	PDI	Conținutul relativ de produs, [%]			
					LC	CC	LH	CH
-		841,43	954,06	1,13	20,5	11,3	66,9	1,4
K ₂ SO ₄	0,973	877,13	974,35	1,11	16,0	10,1	73,9	n.d
Na ₂ SO ₄	0,95	1108,78	1210,81	1,09	22,9	16,9	60,14	n.d
K ₂ CO ₃	0,432	832,56	936,58	1,12	6,0	24,6	60,7	8,8
MgCl ₂	0,225	808,71	858,72	1,06	16,7	12,8	66,6	3,9

a_w - valoarea activității apei [209] LC - copolimer liniar; CC - copolimer ciclic; LH - homopolimer liniar; CH- homopolimer ciclic;

2.5.3. Selecția biocatalizatorului

Studiile anterioare, de influență a naturii și polarității mediului de reacție și al conținutului de apă, au fost efectuate cu enzima Novozyme 435, deoarece această enzimă imobilizată a fost utilizată în majoritatea studiilor de polimerizare catalizate de lipaze [210].

Totuși, datorită cantității relative ridicate de homopolimer prezente în produșii de reacție, s-a considerat necesară testarea și a altor lipaze, native sau imobilizate prin diferite metode, în perspectiva creșterii conținutului de copolimer și a gradului de polimerizare.

Au fost testate două lipaze native, *Candida antarctica* B liofilizată (C-Lecta) și lipaza din pancreas de porc (PPL), precum și patru enzime imobilizate: Novozyme 435, Lipozyme TL-IM și două preparate obținute prin entraparea în sol-gel a lipazei din *C. antarctica* (Sol-gel CALB 1 (OcTMOS:TMOS=1:1 ca și silani precursori pentru formarea matriciei), și Sol-gel CALB 2 (3-NH₂PrTMOS:TMOS=1:1 ca și silani precursori pentru formarea matriciei), conform metodei 3.25.

Experimentele au fost efectuate la 50°C, pentru a nu afecta stabilitatea enzimelor native, în condiții de agitare la 300 rpm și sub atmosferă de argon, utilizând un raport enzimă/substrat de aproximativ 25 U/mmol, după prechilibrarea substraturilor și a enzimei la $a_w=0,95$.

Compozițiile relative ale produșilor de reacție, calculate pe baza intensităților corespunzătoare m/z din spectrele MALDI, sunt prezentate în Figura 2.45.

Dintre enzimele testate, lipazele immobilizate Lipozyme TL IM și preparatul sol-gel CALB 2 au fost cele mai eficiente pentru sinteza copolimerului ECL-GL, chiar mai eficiente decât Novozyme 435.

Lipaza din pancreas de porc nu a dat rezultate pentru reacția urmărită, în spectrul MALDI fiind imposibilă identificarea copolimerilor (Figura A 33), iar gradul de polymerizare a homopolimerului a fost 5.

Metoda de immobilizare a enzimei dar și caracteristicile suportului au importanță deosebită, deoarece pot influența atât activitatea cât și specificitatea de substrat a enzimelor. Au fost observate diferențe importante ce se datorează metodelor diferite de immobilizare, dar și a suporturilor utilizate care au avut porozități diferite. Astfel, enzima Novozyme 435 a facilitat sinteza homopolimerului liniar, în timp ce conținutul relativ de copolimer nu a depășit 20% iar gradul de polymerizare maxim a fost 15. Utilizând lipaza *C. antarctica* entrapată în matrici de sol-gel (Sol gel CALB 2), s-a obținut cel mai ridicat conținut relativ de copolimer, 50%, la un grad de polymerizare maxim de 13 (raportul m/z 1587, Figura 2.44). Prin înlocuirea silanului precursor 3-NH₂PrTMOS cu OctMOS în compoziția matricii de sol-gel, valoarea masei moleculare medii M_n a fost mai mare dar conținutul de copolimer a fost mai scăzut, probabil datorită creșterii hidrofobicității matricii care poate influența difuzia substratului către situsul catalitic al enzimei.

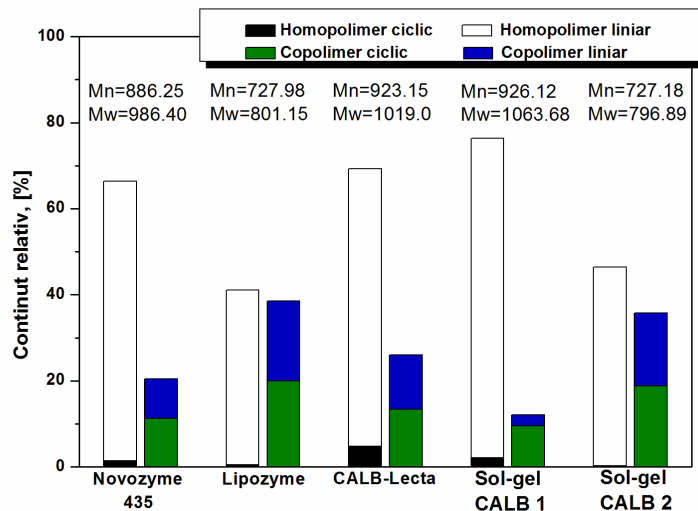


Figura 2.45 Conținutul relativ a copolimerilor de ECL și GL obținuți utilizând lipaze immobilizate din diferite surse

2.5.4. Caracterizarea produsilor de reacție

Structura copolimerilor ECL-GL a fost confirmată și prin spectroscopie RMN. În acest sens au fost colectate atât spectrele uzuale ^1H și ^{13}C , cât și spectrele bidimensionale ^1H - ^1H COSY și ^1H - ^{13}C HETCOR (HMQC, HSQC, HMBC) care au permis confirmarea exactă a formării legăturii esterice dintre acidul 6-hidroxihexanoic (ϵ -caprolactonă după deschiderea ciclului) și acidul 2,3,4,5,6-pentahidroxi-caproic.

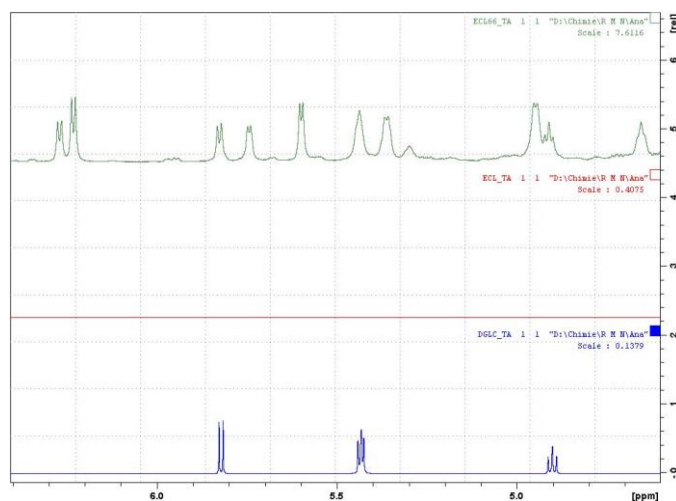


Figura 2.46 Spectrul ^1H -RMN (5.6-6.5ppm) a produsului de reacție (verde), ϵ -caprolactonă (roșu) și δ -gluconolactonă (albastru)

În spectrul ^1H - ^1H -COSY (Figura 2.47) se observă cuplajul dintre protonii hidroxilici de la 6.25 și 6.22 ppm și respectiv de la 5.73 și 5.59 ppm cu protonii grupărilor CH (multipleteții din zona 4.66-4.04 ppm) care demonstrează inserția unității de GL deschisă.

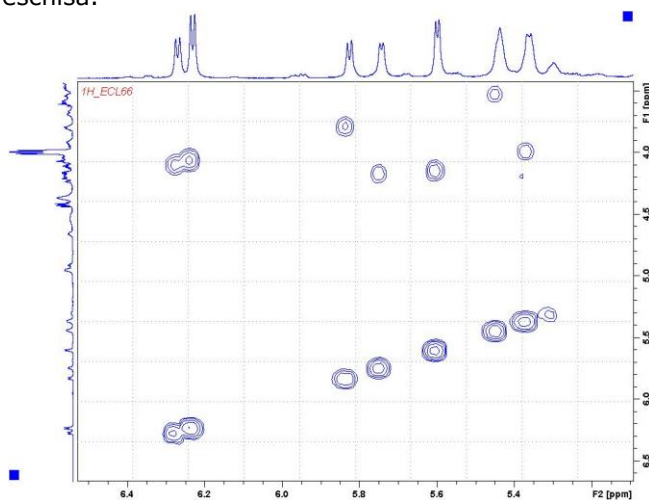


Figura 2.47 Spectrul RMN ^1H - ^1H -COSY 2D NMR (5.1-6.5 ppm/3.8-6.5 ppm) a produsului de reacție

Deplasările chimice corespunzătoare protonilor din grupările OH din GL apar mai ecranate față de cele corespunzătoare protonilor hidroxilici din materia primă (Figura 2.48) sau mai dezecranate în spectrul copolimerului, indicând formarea copolimerilor ciclici dar și liniari (valorile δ din intervalul 4.03-3.5 ppm).

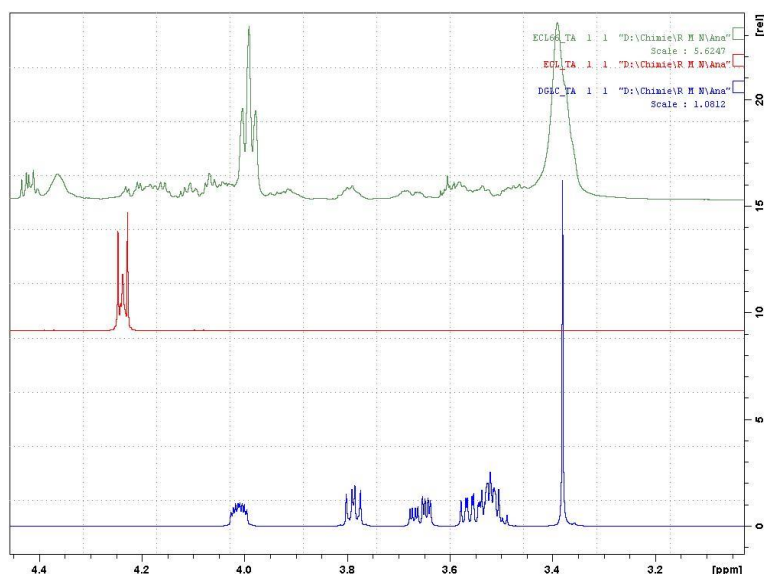


Figura 2.48 Spectrul $^1\text{H-NMR}$ (3.0-4.5ppm) a produsului de reacție (verde), ϵ -caprolactonă (roșu) și δ -gluconolactonei (albastru)

Stabilitatea termică a copolimerilor ECL-GL în comparație cu homopolimerul PCL și cu gluconolactonă a fost evaluată prin termogravimetrie.

Termogramele prezentate în Figura 2.49 indică o scădere a stabilității termice a copolimerului (albastru) față de homopolimer (portocaliu). Pierderea de masă începe în jurul temperaturii de 100°C. În comparație cu homopolimerul, degradarea copolimerului are loc în două trepte, fapt confirmat de cele două inflexiuni de la 270,9°C și respectiv 430,7°C (Tabel 2.18).

Tabel 2.18. Pierderile de masă pe diferite intervale de temperatură pentru copolimeri, în comparație cu homopolimerul și δ -gluconolactonă

Proba	Pierderile de masă [%]			
	20°C-200°C	20°C-300°C	20°C-400°C	20°C-600°C
ECL-GL	6,47	43,55	72,70	89,43
PCL	0,39	2,83	49,14	98,30
GL	0,21	53,91	77,90	82,74

2.6. Optimizare reacției de poliesterificare a β -butirolactonei cu δ -gluconolactonă 85

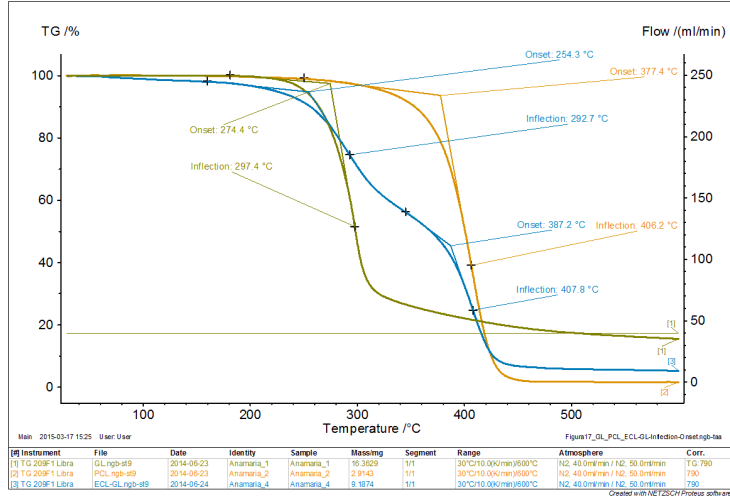


Figura 2.49 Termogramele copolimerilor ECL-GL (albastru), PCL (portocaliu) și δ -GL (verde)

Curbele DSC (Figura 2.50) prezintă două peak-uri endoterme la 50°C și 153°C, probabil datorită unor tranziții interne care pot să apară. În cazul produsului de reacție (albastru) valorile temperaturilor T_m sunt cu aproximativ 9°C mai scăzute comparativ cu materiile prime. Această modificare a comportării termice a PCL în copolimer poate fi atribuită prezenței unor oligomeri cu catenă mai scurtă.

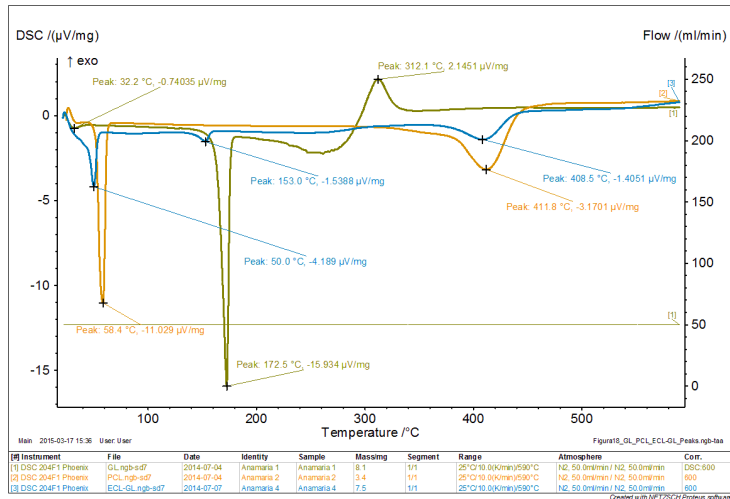


Figura 2.50 Curbele DSC corespunzătoare produsilor de reacție (albastru), PCL (portocaliu) și GL (verde)

2.5.5. Reutilizarea biocatalizatorului

Utilizarea biocatalizatorului în mai multe cicluri de reacție reprezintă unul dintre obiectivele principale ale imobilizării. Datorită rezultatelor încurajatoare obținute cu lipaza comercială Lipozyme TL precum și datorită faptului că aceasta se prezintă sub formă de particule relativ uniforme, s-a investigat posibilitatea reutilizării acestei enzime imobilizate în mai multe cicluri de reacție.

Reacțiile au fost efectuate conform metodei 3.28, la un raport molar de 2:1 (ECL:GL) între co-monomeri, iar după 24 h preparatul enzimatic a fost recuperat prin filtrare și spălat succesiv cu amestec de acetonă:MeOH și hexan. După evaporarea solventului, biocatalizatorul fost cântărit și s-a utilizat într-o nouă reacție.

Prođușii de reacție au fost analizați prin MALDI-TOF MS, iar rezultatele sunt prezentate în Tabel 2.19. Se poate observa că după 4 cicluri de reacție valorile maselor moleculare medii au fost relativ apropiate, dar s-a înregistrat o scădere ușoară (3-4%) a conținutului relativ de copolimeri și o creșterea corespunzătoare a celui de homopolimeri. De asemenea, a scăzut puțin gradul de polimerizare, ceea ce indică o scădere treptată a eficienței catalitice a biocatalizatorului după utilizări multiple. O asemenea scădere este normală, dar concluzia cea mai importantă este că lipaza poate fi utilizată cu rezultate bune în mai multe cicluri de reacție.

Tabel 2.19. Utilizarea biocatalizatorului Lipozyme TL în mai multe cicluri de reacție

Ciclu de utilizare	M_n	M_w	PDI	Conținutul relativ de produs [%]					DP_{max}
				CL	CC	CP	HL	HC	
1	652	748	1,15	29,22	14,14	43,36	56,42	0,2	15
2	694	787	1,13	31,78	13,67	45,45	53,54	1,08	15
3	712	796	1,12	28,04	11,93	39,97	59,43	0,64	12
4	690	761	1,10	26,49	14,48	38,13	58,16	0,87	10

LC – copolimer liniar; CC – copolimer ciclic; LH – homopolimer liniar; CH- homopolimer ciclic; CP- conținut relativ total de copolimeri

2.5.6. Optimizarea reacției prin elaborarea unui program experimental factorial

Deși elaborarea programelor experimentale factoriale și-a dovedit utilitatea și avantajele pentru optimizarea multor procese, atât chimice cât și fizice, ea nu a fost utilizată în sinteza poliesterilor și cu atât mai puțin în sinteza enzimatică. Dintre pachetele software disponibile în prezent pentru acest studiu s-a ales pachetul Unscrambler 9.0, datorită interfeței prietenoase și intuitive de care acesta dispune. Modelul de optimizare selectat, de tip Box Behnken [210] permite o variație a variabilelor independente pe 3 niveluri (-1, 0, 1).

Deoarece cantitatea relativă de copolimer cea mai ridicată s-a obținut cu enzima comercială Lipozyme TL, ea a fost folosită drept catalizator și în aceste experimente.

Ca și variabilă de răspuns, s-a calculat masa moleculară medie gravimetrică corespunzătoare copolimerilor (M_w_C), pe baza spectrelor MALDI colectate pentru fiecare probă. Rezultatele sunt prezentate în Tabel 2.20. În primele trei coloane sunt incluse valorile variabilelor independente selectate: temperatura, cantitatea de

2.6. Optimizare reacției de poliesterificare a β -butirolactonei cu δ -gluconolactonă 87

enzimă și raportul molar al co-monomerilor, în timp ce în ultimele două coloane se regăsesc valorile M_{w_C} determinate experimental și cele prezise de model.

Datele experimentale au fost analizate statistic, utilizând tehnica ANOVA și analiza de regresie.

Pentru analiza globală a rezultatelor a fost ales modelul polinom de ordin doi, deoarece în cele mai multe cazuri valoarea p a fost $p < 0,05$, ceea ce demonstrează că modelul este adecvat în raport cu datele experimentale din punct de vedere statistic. În alegerea modelului s-a ținut cont și de coeficientul de corelație multiplă a cărei valoare cât mai apropiată de 1 confirmă că modelul de regresie corelează satisfăcător datele din eșantion. Valorile R^2 au fost cuprinse în intervalul $[0,754 \div 0,976]$.

Tabel 2.20. Masa moleculară medie gravimetrică rezultată din programul experimental factorial și valorile experimentale determinate pe baza spectrelor MALDI-TOF, utilizând ECL și GL ca și materii prime

Nr Crt.	Temperatura	Cantitatea de enzimă	Raportul molar	M_{w_C} experimentală	M_{w_C} prezisă
1	60	20	3	638	622
2	60	20	3	631	622
3	80	20	3	730	739
4	80	20	3	738	739
5	60	60	3	830	824
6	60	60	3	830	824
7	80	60	3	882	901
8	80	60	3	896	901
9	60	40	2	725	730
10	60	40	2	730	730
11	80	40	2	728	724
12	80	40	2	749	724
13	60	40	4	664	684
14	60	40	4	674	684
15	80	40	4	889	884
16	80	40	4	886	884
17	70	20	2	605	616
18	70	20	2	607	616
19	70	60	2	939	933
20	70	60	2	923	933
21	70	20	4	798	807
22	70	20	4	821	807
23	70	60	4	898	855
24	70	60	4	831	855
25	70	40	3	744	727
26	70	40	3	738	727
27	70	40	3	699	727

Rezultatele analizei ANOVA (Tabel 2.21) sugerează ca modelul ales este adecvat.

Valoarea erorii pure determinate pentru parametrul M_{w_C} a copolimerului, măsurată în punctele centrale a fost 310,46 din trei repetări, corespunzătoare la $\sqrt{310,46} = 17,60\%$ din deviația standard, care poate fi considerată satisfăcătoare.

Valorile parametrului p pentru termenii pătratici incluși în modelul redus au fost mai mici de 0,05, cu excepția valorii corespunzătoare pentru temperatură.

Tabel 2.21. Rezultatele statistice generate de ANOVA, calculate pe baza masei moleculare gravimetrice M_w_C ca variabilă de răspuns.

	SS	DF	MS	F	p
Sumar					
Model	2,576E+05	9	2,862E+04	76,389	0,0000
Eroare	6,370E+03	17	374,718		
Total ajustat	2,640E+05	26	1,015E+04		
Variabile					
Termen constant	1,256E+05	1	1,256E+05	335,170	0,0000
Temperatură (A)	3,763E+04	1	3,763E+04	100,410	0,0000
Cantitatea de enzimă (B)	1,327E+05	1	1,327E+05	354,157	0,0000
Raport molar (C)	1,299E+04	1	1,299E+04	34,676	0,0000
AB	816,485	1	816,485	2,179	0,1582
AC	2,149E+04	1	2,149E+04	57,349	0,0000
BC	3,622E+04	1	3,622E+04	96,665	0,0000
AA	7,484	1	7,484	1,997E-02	0,8893
BB	1,196E+04	1	1,196E+04	31,904	0,0000
CC	4,975E+03	1	4,975E+03	13,278	0,0020
Verificarea modelului					
Principal	1,833E+05	3	6,111E+04		
Int	5,853E+04	3	1,951E+04	52,064	0,0000
Int + Squ	1,576E+4	3	5,254E+03	14,022	0,0001
Squ	0,000	0	0,000	0,000	0,0000
Eroare	0,000	0	0,000		
Grad de neconcordanță					
Grad de neconcordanță	2,023E+03	3	674,421	2,172	0,1369
Eroarea pură	4,347E+03	14	310,496		
Eroarea totală	6,370E+03	17	374,718		

SS-sumele de pătrate, DF-numărul gradelor de libertate; MS-media sumelor de pătrate; F-valoarea statisticii F (raportul ANOVA); p-probabilitatea critică bilaterală a testului t

2.6. Optimizare reacției de poliesterificare a β -butirolactonei cu δ -gluconolactonă 89

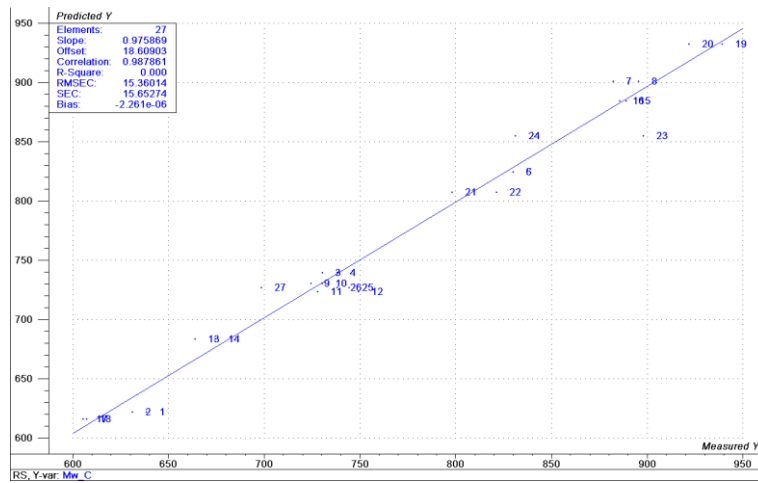


Figura 2.51 Graficul de analiză al predicțiilor modelului. Comparația între masele moleculare gravimetrice măsurate și prezise pentru copolimer

Analiza reziduurilor prezintă importanță deosebită pentru evaluarea adecvănței modelului. Pentru această analiză au fost considerate două grafice (Figura 2.51 și Figura 2.52) dintre cele mai relevante pentru analiza reziduurilor [211] și anume graficul de analiză a predicțiilor modelului, care oferă informații despre modul în care valorile experimentale sunt în concordanță cu predicțiile și graficul de analiză a reziduurilor (Figura 2.52). În graficul de analiză a predicțiilor modelului se observă o corelație globală satisfăcătoare a datelor experimentale în comparație cu datele prezise, fiind observate caracteristici de liniaritate a datelor față de diagonală cu abateri satisfăcătoare.

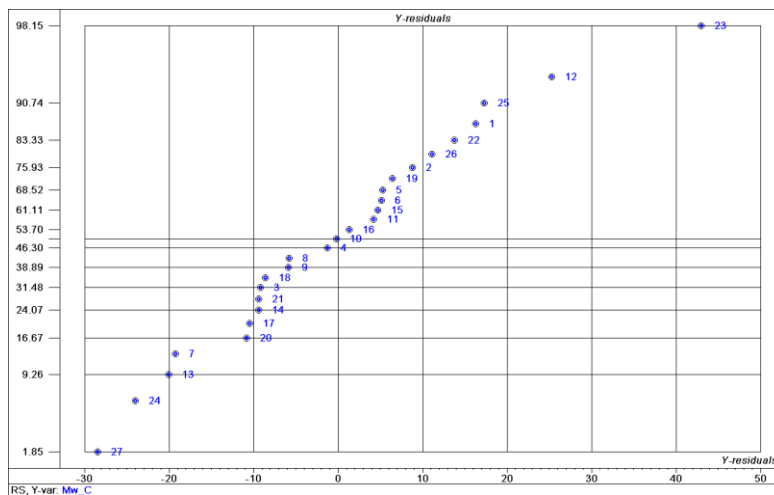


Figura 2.52 Graficul de analiză a reziduurilor pentru sistemul de reacție EC-GL

Pentru stabilirea efectelor parametrilor selectați pentru programul experimental factorial au fost calculate și cantitățile relative de copolimer, respectiv homopolimeri.

Rezultatele prezentate în Tabel 2.22 indică faptul că temperatura are cel mai semnificativ efect și este direct corelată cu formarea copolimerului liniar. Efectul global al celorlalte variabile a fost semnificativ. Cu toate că prin combinarea variabilelor temperatură și cantitatea de enzimă apare un efect global nesemnificativ, este direct corelat cu formarea homopolimerilor ciclici. Cantitatea relativă de homopolimeri este invers corelată cu efectul temperaturii și a raportului molar al reactanților, în timp ce formarea copolimerului prezintă o dependență directă față de cele două variabile menționate anterior. Acest efect se poate explica prin faptul că ECL, monomerul care se găsește în stare de agregare lichidă, este utilizat ca și mediu de reacție și cu cât raportul molar este mai scăzut solubilizarea co-monomerului GL este îngreunată, fiind astfel favorizată formarea homopolimerului. Efectul combinat al cantității de enzimă cu raportul molar este invers corelat cu valoarea masei moleculare medii a copolimerului și conținutul relativ de copolimeri liniari, confirmând astfel specificitatea mult mai ridicată a lipazei față de monomerul ECL.

Tabel 2.22. Analiza efectelor asupra compoziției produșilor de reacție (LH - homopolimer liniar, CH - homopolimer ciclic, LC - copolimer liniar, CC - copolimer ciclic, HP - homopolimer total, CP - copolimer total)

Variabilă	LH	CH	LC	CC	HP	CP	M _w _C
Temperatura (A)	NS	NS	+	NS	NS	NS	+++
Cantitatea de enzimă (B)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	+++
Raportul molar (C)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	++
AB	NS	+	NS	NS	NS	NS	NS
AC	-	NS	NS	+	-	+	+++
BC	NS	NS	-	NS	NS	NS	---

NS - nesemnificativ

2.5.7. Concluzii parțiale

Insertia δ -gluconolactonei în catena hidrofobă a poli- ϵ -caprolactonei a fost demonstrată pentru prima dată, rezultând oligomeri cu unități de acid 2,3,4,5,6-pentahidroxi-caproic inserate.

Dintre lipazele testate, lipazele din CALB imobilizată în matrici de sol-gel s-au dovedit cele mai eficiente.

Preparatul Lipozyme TL a fost reutilizat în 4 cicluri de reacție, fără a fi semnificativ afectată compoziția produșilor de reacție.

2.6. Optimizare reacției de copolimerizare a β -butirolactonei cu GL și caracterizarea produșilor de reacție [212]

2.6.1. Optimizarea reacției prin dezolvarea unui program experimental factorial

În acest subcapitol a fost studiată posibilitatea inserției unor unități de acid 2,3,4,5,6-pentahidroxi-caproic, rezultat din GL, în catena hidrofobă a unui biopolimer intens studiat, poli-hidroxi-butiratul (PHB). Ca și co-substrat a fost utilizată β -butirolactona (BL), lactona cu ciclu de 4 atomi de carbon corespunzătoare acidului 3-hidroxi butiric, care este unitatea de bază a PHB. Acest studiu de optimizare reprezintă o continuare a cercetărilor prezentate în sub-capitolul anterior.

Și în acest caz pentru optimizarea reacției și modelarea formării copolimerilor au fost selectate aceleși 3 variabile independente (temperatura, cantitatea de enzimă și raportul molar dintre co-monomeri). S-a luat în considerare posibilitatea de formare atât a copolimerilor liniari și ciclici cât și a homopolimerilor liniari și ciclici, iar produșii de reacție posibili sunt prezentați în Figura 2.53.

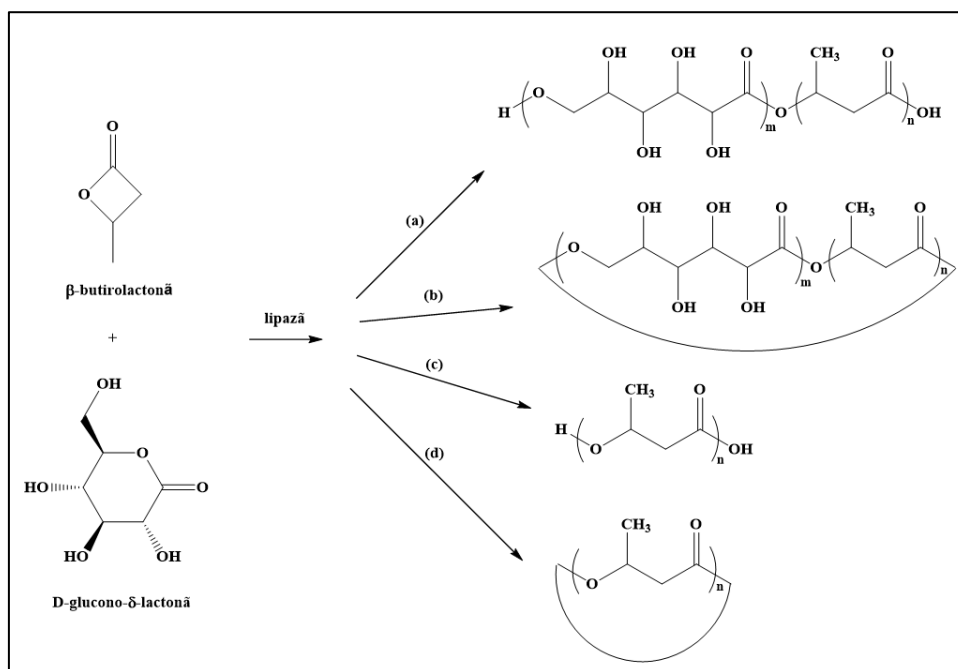


Figura 2.53 Produși de reacție posibili în reacția de copolimerizare a BL cu GL, catalizată de lipaze: copolimeri liniari (a); copolimeri ciclici (b) homopolimeri liniari (c); homopolimeri ciclici (d).

Programul de proiectare selectat pentru optimizare/stabilirea efectelor a fost Box-Behnken, disponibilă în pachetul software Unscrambler.

Deși există unele similarități între preparatele comerciale Novozyme 435 și Lipozyme-TL IM pentru acest studiu a fost utilizată lipaza Lipozyme-TL IM, datorită faptului că cercetările anterioare au stabilit că lipaza Novozyme 435 favorizează în măsură mai mare formarea homopolimerului.

Ca și variabilă de răspuns în acest studiu a fost calculată masa moleculară medie gravimetrică corespunzătoare copolimerilor (M_{w_C}), pe baza spectrelor MALDI-TOF MS colectate pentru fiecare probă. Rezultatele sunt prezentate în Tabel 2.23. În primele trei coloane sunt incluse valorile variabilelor independente, în timp ce în ultimele două coloane se regăsesc valorile M_{w_C} determinate experimental, cât și cele prezise de model.

Tabel 2.23. Parametrii obținuți din programul experimental factorial și valorile experimentale determinate pe baza spectrelor MALDI-TOF utilizând BL și GL ca și materii prime

Nr Crt.	Temperatura	Cantitatea de enzimă	Raportul molar	M_{w_C} experimental	M_{w_C} prezisă
1	60	20	4	663	672
2	60	20	4	672	672
3	80	20	4	650	638
4	80	20	4	641	638
5	60	60	4	716	720
6	60	60	4	711	720
7	80	60	4	658	665
8	80	60	4	683	665
9	60	40	3	771	761
10	60	40	3	769	761
11	80	40	3	716	702
12	80	40	3	684	702
13	60	40	5	736	732
14	60	40	5	734	732
15	80	40	5	693	703
16	80	40	5	696	703
17	70	20	3	726	734
18	70	20	3	734	734
19	70	60	3	796	799
20	70	60	3	799	799
21	70	20	5	750	748
22	70	20	5	752	748
23	70	60	5	765	757
24	70	60	5	759	757
25	70	40	4	770	769
26	70	40	4	770	769
27	70	40	4	768	769

Datele experimentale au fost analizate statistic utilizând tehnica ANOVA și analiza de regresie. Dintre modelele predefinite disponibile în soft-ul Unscrambler valoarea R^2 cea mai ridicată (96,9%) a fost obținută când a fost selectat modelul polinom de ordin II. Rezultatele analizei ANOVA (Tabel 2.24) sugerează ca modelul ales este adecvat. Eroarea pură dar și rezultatele testului t-test și valorile

2.6. Optimizare reacției de polimerizare a β -butirolactonei cu δ -gluconolactonă 93

parametrului p , pentru fiecare efect sunt incluse în Tabelul 2.24. Valorile probabilității critice bilaterale a testului t , p pentru termenii pătratici incluși în modelul redus au fost mai mici de 0,05, demonstrând că modelul este din punct de vedere statistic semnificativ și că variabilele sunt corelate.

Valoare erorii pure determinate pentru parametrul M_{w_C} a copolimerului măsurată în punctele centrale a fost 70,4 din trei repetări, corespunzătoare la $\sqrt{70,4} = 8,39\%$ din deviația standard, fiind considerată o valoare satisfăcătoare.

Tabel 2.24. Rezultatele statistice generate de ANOVA calculată pe baza masei moleculare gravimetrice M_{w_C} ca variabilă de răspuns.

	SS	DF	MS	F	p
Sumar					
Model	5,226E+04	9	5,852E+03	58,992	0,0000
Eroare	1,686E+03	17	99,194		
Total ajustat	5,435E+04	26	2,090E+03		
Variabile					
Termen					
constant	1,274E+05	1	1,274E+05	1,284E+03	0,0000
Temperatura (A)	7,700E+03	1	7,700E+03	77,627	0,0000
Cantitatea de enzimă (B)	5,588E+03	1	5,588E+03	56,330	0,0000
Raport molar (C)	756,250	1	756,250	7,624	0,0134
AB	220,500	1	220,500	2,223	0,1543
AC	435,125	1	435,125	4,387	0,0515
BC	1,596E+03	1	1,596E+03	16,091	0,0009
AA	2,398E+03	1	2,398E+04	241,763	0,0000
BB	5,054E+03	1	5,054E+03	50,952	0,0000
CC	2,422E+03	1	2,422E+03	24,413	0,0001
Verificarea modelului					
Principal	1,404E+04	3	4,681E+03		
Int	2,252E+03	3	750,585	7,557	0,0020
Int + Squ	3,637E+04	3	1,212E+04	122,216	0,0000
Squ	0,000	0	0,000	0,000	0,0000
Eroare	0,000	0	0,000		
Grad de neconcordanță					
Grad de neconcordanță	700,625	3	233,542	3,317	0,0511
Eroarea pură	985,667	14	70,405		
Eroarea Totală	1,686E+03	17	99,194		

SS-sumele de pătrate DF-numărul gradelor de libertate; MS-media sumelor de pătrate; F-valoarea statisticii F; p-probabilitatea critică bilaterală a testului t

Performanțele de fidelitate a modelului prezis sunt demonstrate în Figura 2.54, unde valorile M_{w_C} calculate au fost reprezentate grafic (sub formă de cercuri concentrice) față de cele determinate experimental.

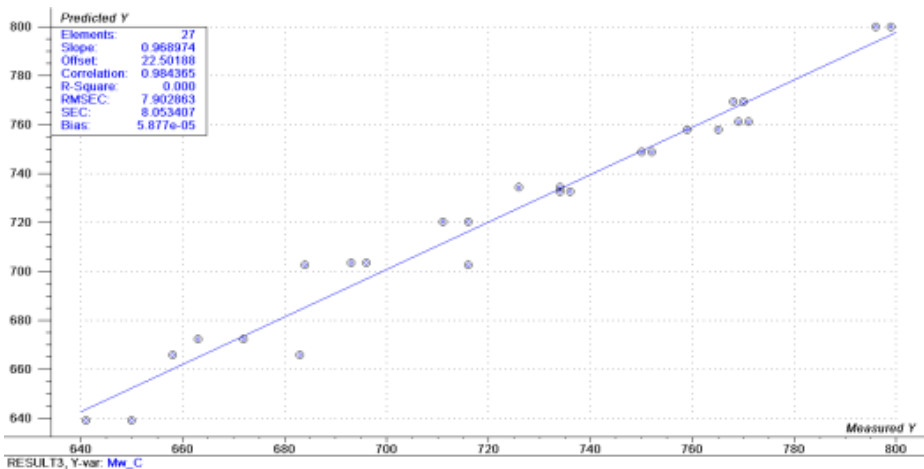


Figura 2.54 Graficul de analiză al predicțiilor modelului. Corelația dintre masele moleculare gravimetrice măsurate și prezise pentru sistemul de reacție BL-GL

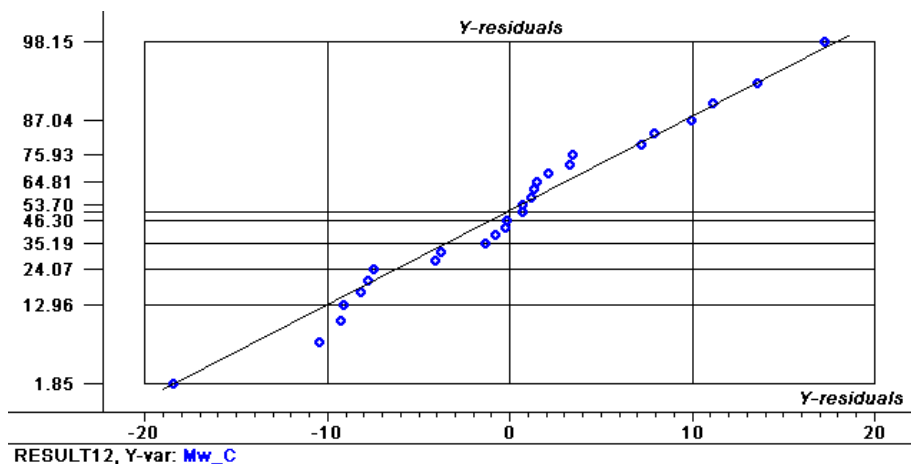


Figura 2.55 Graficul reziduurilor pe baza rezultatelor în reacția de optimizare a BL cu GL

Graficul reziduurilor (Figura 2.55) indică faptul că datele sunt normal distribuite iar corelarea este acceptabilă.

Pe baza conținutului relativ a fiecărui tip de copolimer determinat din spectrele MALDI-TOF MS a fost analizată importanța fiecărei variabile independente (temperatura, cantitatea de enzimă și raportul molar) asupra formării copolimerilor.

Rezultatele prezentate în Tabel 2.25 indică faptul că temperatura are cel mai semnificativ efect și este direct corelată cu formarea copolimerului. Efectul global al celorlalte două variabile a fost nesemnificativ. Cu toate acestea, combinarea acestor variabile (ex. temperatura cu raportul molar) poate avea efect important asupra formării polimerilor. Mai exact, cantitatea relativă de homopolimer este invers corelată cu efectul temperaturii asupra raportului molar dintre reactanți, în timp ce formarea copolimerului prezintă o dependență directă față de cele două variabile menționate anterior.

2.6. Optimizare reacției de poliesterificare a β -butirolactonei cu δ -gluconolactonă 95

Tabel 2.25. Analiza efectelor asupra compoziției a produșilor de reacție (LH - homopolimer liniar, CH - homopolimer ciclic, LC - copolimer liniar, CC - copolimer ciclic, HP - homopolimer total, CP - copolimer total)

Variabile	LH	CH	LC	CC	HP	CP	M _w _C
Temperatura (A)	NS	--	-	++	NS	+	NS
Cantitatea de enzimă (B)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Raport molar (C)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
AB	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
AC	NS	-	NS	+	-	+	NS
BC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS - nesemnificativ

Analiza suprafețelor de răspuns

Cu scopul de a stabili importanța cantității de enzimă asupra M_w_C s-a realizat reprezentarea grafică a cantității de enzimă, temperaturii și a valorii M_w_C. Deși efectul global al cantității de enzimă a fost nesemnificativ, a fost totuși posibilă determinarea unei valori optime, când M_w_C a fost reprezentată grafic în funcție de cantitatea de enzimă și temperatură, ca efect combinat.

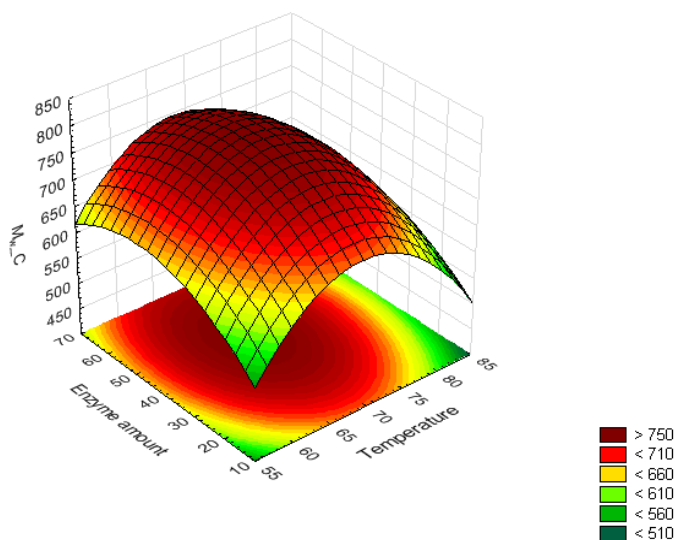


Figura 2.56 Efectul combinat al cantității de enzimă și a temperaturii asupra masei moleculare gravimetrice M_w_C, la raport molar BL:GL de 4:1

Conform Figura 2.56, valoarea cea mai ridicată a M_w_C, 774 se poate obține la 68,3°C și 46,7 mg enzimă, la un raport molar al monomerilor de 4:1. Această limitare a masei moleculare poate fi cauzată de conținutul relativ ridicat de copolimeri ciclici.

2.6.2. Caracterizarea produsilor de reacție

Pentru caracterizarea produsilor de reacție au fost colectate spectrele FT-IR atât a materiilor prime cât și a produsilor de reacție, pentru a observa modificările grupărilor funcționale care apar la sfârșitul reacției (Figura 2.57).

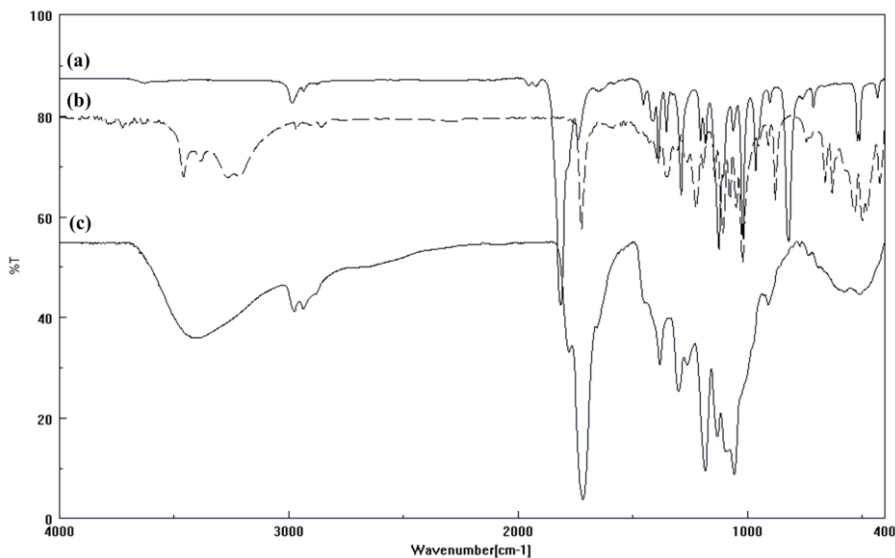


Figura 2.57 Spectrele FT-IR ale (a) BL; (b) GL; (c) produsului de reacție obținut după 24 h de reacție, fără solvent

Formarea esterului este confirmată de deplasarea benzii de vibrație corespunzătoare grupării carbonil la 1716 cm^{-1} , față de 1813 cm^{-1} în BL, respectiv 1724 cm^{-1} în GL.

Datorită complexității moleculelor sintetizate, confirmarea structurii a fost realizată pe baza spectrelor $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, HSQC și HMBC, pentru a demonstra inserția GL în catena PHB, dar și formarea legăturii esterice dintre gruparea OH primară a GL și gruparea carboxil a BL.

În spectrul $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ HMBC (Figura 2.59) cuplajul la distanță (3J) dintre protonul metinic de la 5.1 ppm (CH-13 din Figura 2.58) cu două tipuri de atomi carbonilici, de la 168.9 (C-15, Figura 2.58) și respectiv 171.4 (C-11) confirmă inserția acidului acid 2,3,4,5,6-pentahidroxi-caproic.

Legătura covalentă dintre gruparea OH primară a GL cu BL a fost confirmată de cuplajul direct $^1\text{H-}^{13}\text{C}$, observat în spectrul bidimensional HSQC, dintre protonul de la 3.58 ppm cu carbonul de la 67.2 ppm (H₂C-6).

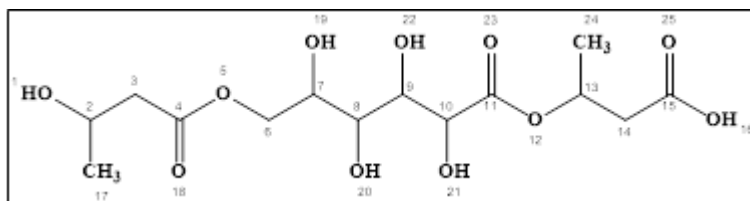


Figura 2.58 Structura generală copolimerului format din două unități de BL și o unitate de GL

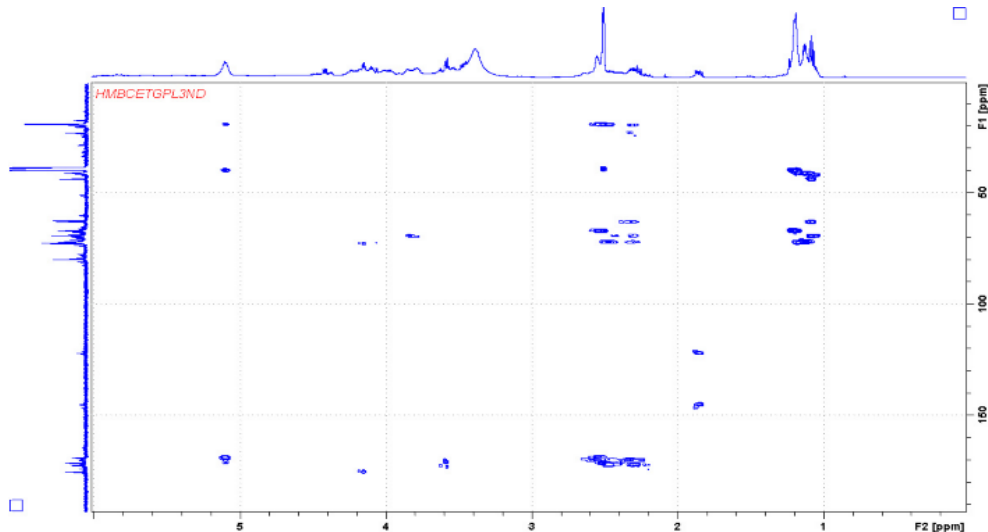


Figura 2.59 Spectrul RMN 2D, HMBC a produsului de reacție BL-GL în zona 0-6 ppm/0-200 ppm

Stabilitatea termică a copolimerilor de BL-GL a fost studiată și analizată în comparație cu homopolimerul PHB (disponibil comercial) și δ -gluconolactonă, pe baza termogramelor și a curbelor DSC.

Termograma copolimerului (Figura 2.60 albastru) indică o stabilitate mai scăzută în comparație cu termogramele homopolimerului PHB (roz) și cu a GL (verde). Pierderile de masă pe diferite intervale de temperatură sunt prezentate în Tabel 2.26.

Tabel 2.26. Pierderile de masă pe diferite intervale de temperatură pentru copolimerii BL-GL în comparație cu homopolimerul (PHB) și δ -gluconolactona

Proba	Pierderile de masă [%]			
	20°C-200°C	20°C-300°C	20°C-400°C	20°C-500°C
BL-GL	16,01	76,68	80,61	83,99
PHB	0,80	99,65	99,37	99,11
GL	0,21	53,91	77,90	82,74

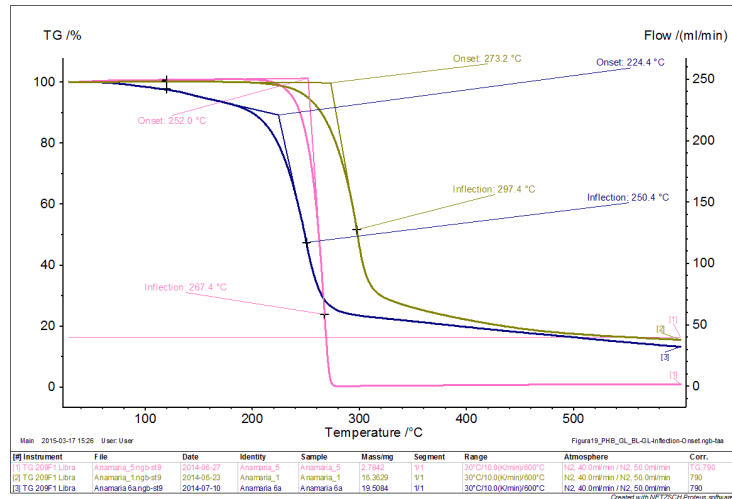


Figura 2.60 Termogramele corespunzătoare produsului de reacție BL-GL (albastru) în comparație cu homopolimerul PHB (roz) și GL (verde)

Curbele DSC (Figura 2.61) prezintă în cazul homopolimerului PHB (roz) două peak-uri endoterme, la 174,5°C și 276,5°C, probabil datorită unor tranziții interne. În cazul copolimerului (albastru) valoarea temperaturii de topire (T_m) a fost mai scăzută (~90°C). Aceeași tendință a fost observată și în cazul copolimerilor ECL-GL (Figura 2.49), fiind atribuită probabil și în acest caz lungimii mai reduse a catenelor în comparație cu PHB-ul.

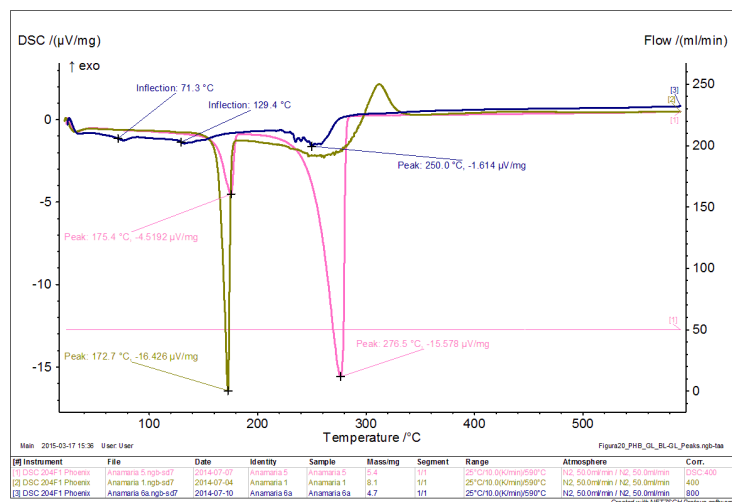


Figura 2.61 Curbele DSC corespunzătoare produsului de reacție BL-GL (albastru) în comparație cu homopolimerul PHB (roz) și GL (verde)

2.6.3. Concluzii parțiale

Sinteza copolimerilor prin deschiderea de ciclu a lactonelor BL și GL catalizată de lipaze a fost demonstrată în premieră. Optimizarea reacțiilor prin elaborarea unui program experimental factorial și evaluarea statistică nu a mai fost studiată până în prezent.

Dintre modele testate, cel quadratic a fost în concordanță cu datele experimentale demonstrând eficacitatea acestei abordări. Structura copolimerului cu unități de acid 2,3,4,5,6-pentahidroxi-caproic a fost demonstrată prin RMN. Deși gradul de polimerizare este limitat de formarea produșilor ciclici și posibilele împiedicări sterice în etapa de elongare, produșii de reacție pot prezenta aplicabilitate în domeniul farmaceutic, alimentar sau medical.

La optimizarea ambelor sisteme studiate de copolimeri s-au observat aproximativ aceleași tendințe, ceea ce confirmă validitatea modelului pentru sinteza copolimerilor.

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

Utilizarea trigliceridelor pentru sinteza bioproduselor și a biopolimerilor a fost tot mai intens studiată în ultimii ani, datorită proprietăților de biodegradabilitate a acestora și a prețului mai scăzut în comparație cu polimerii uzuali. Cele mai utilizate trigliceride provin din uleiuri vegetale, în special în, floarea soarelui, ricin, soia, palmier, rapiță, etc.

În acest capitol a fost studiată capacitatea de transformare a trioleinei în oligomeri pe cale enzimatică, prin efectul combinat a două enzime: lipază și oleat hidratază. Aceste două enzime catalizează hidroliza trigliceridelor și respectiv transformarea acizilor grași în hidroxi-acizii corespunzători, care ulterior pot reprezenta co-substraturi pentru reacția de poliesterificare, catalizată de asemenea de lipaze.

Sistemul de reacție propus este așadar constituit dintr-o succesiune de 3 reacții enzimatică (Figura 2.62):

(1) hidroliza trigliceridelor (trioleinei) catalizată de lipaze, cu formare de acizi grași și glicerină.

Deși solubilitatea în apă a trigliceridelor este foarte mică, hidroliza enzimatică a trigliceridelor (trioleinei) se realizează de obicei în soluție apoasă la 35°C, datorită capacității lipazelor de a cataliza asemenea reacții la interfața dintre soluția apoasă și faza uleioasă. Reacția este reversibilă, de aceea concentrația finală a produșilor și viteza de reacție sunt dependente de concentrația de acizi grași din faza uleioasă și de concentrația de glicerină din apă.

(2) conversia acizilor grași nesaturați în hidroxi-acizii corespunzători.

Pentru această etapă s-a propus utilizarea oleat hidratazei, enzima responsabilă pentru hidratarea acidului oleic în 10HSA (prezentată anterior, în capitolul 2.2).

(3) Conversia hidroxi-acizilor formați în etapa anterioară la estolide, de tipul celor discutate în capitolul 2.3.

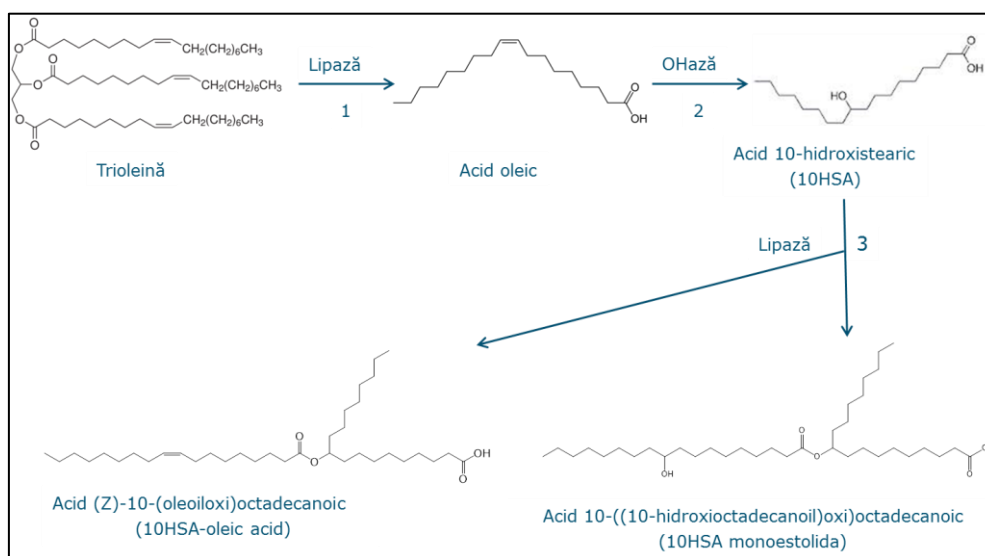


Figura 2.62 Transformarea trioleinei în estolide saturate/nesaturate în sistem „one-pot”

Deși reacțiile (1) și (2) au fost intens studiate individual, până în prezent cuplarea lor („one-pot”), propusă în acest capitol, nu a fost raportată.

Pentru hidroliza trioleinei au fost testate două lipaze, o lipază 1,3-specifică, din *Candida rugosa* și o lipază nespecifică, din *Pseudomonas fluorescens*, care s-a dovedit eficientă pentru sinteza estolidelor. Fiecare dintre aceste lipaze a fost utilizată împreună cu oleat hidratat din *E. meningoseptica*, purificată conform procedurii prezentat în capitolul 2.1. Reacțiile au fost efectuate conform metodei 3.30, iar produșii de reacție au fost extrași cu diclorometan și analizați prin GC-MS și MALDI-TOF, conform metodelor 3.15 și 3.20.

În Figura 2.63 sunt prezentate spectrele MALDI-TOF suprapuse ale amestecurilor de reacție după 24 h. În ambele cazuri se observă semnalele de la m/z 641 și 603 corespunzătoare aducțiilor de K^+ ai monoestolidei formate dintr-o moleculă de acid 10-hidroxi stearic și acid oleic. Formarea acestor produși de reacție se datorează faptului că viteza reacției de hidroliză este mult mai mare decât cea de hidratare a acidului oleic și astfel prezența acidului oleic rezultat în reacția (1) favorizează esterificarea cu acidul 10HSA format în reacția (2).

2.7. Biotransformarea trioleinei în sistem "one-pot" 101

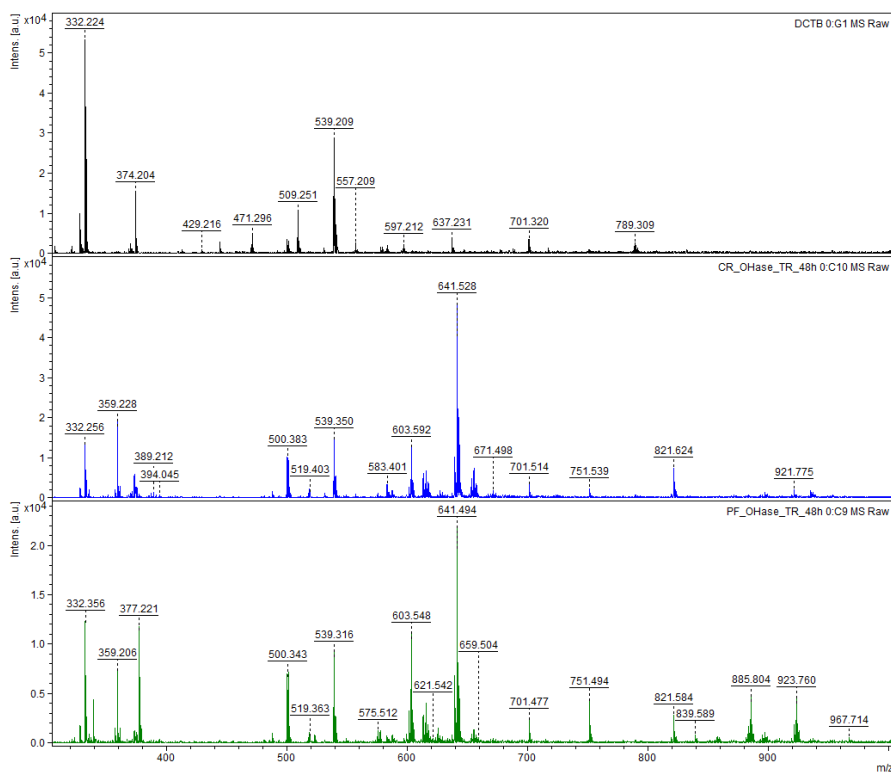


Figura 2.63 Spectrele MALDI-TOF ale amestecului de reacție cu OHază și lipază, fără OHază și a matricii DCTB

O posibilitate pentru a favoriza formarea estolidelor saturate ar putea fi utilizarea ca mediu de reacție a unui solvent organic nemiscibil cu apa, pentru a reduce viteza reacției de hidroliză. Deoarece este binecunoscut faptul că activitatea lipazelor nu este afectată în solvenți organici nepolari, a fost necesară doar determinarea activității oleat hidratatei în prezență de asemenea solvenți. Pentru aceasta au fost selectați șase solvenți organici și s-a măsurat activitatea oleat hidratatei într-un mediu de soluție tampon TRIS, pH 8,0 în amestec cu 10% solvent organic.

Rezultatele prezentate în Tabel 2.27 indică faptul că activitatea oleat hidratatei a fost drastic afectată de prezența solvenților organici. Chiar și la o concentrație de numai 10% activitatea enzimatică regăsită nu a fost mai mare de 8%.

Tabel 2.27. Activitatea OHazei în prezența solvenților organici

Solvent 10% [v/v]	Activitate regăsită [%]
hexan	3,98
hexadecan	8,06
ciclohexan	2,37
heptan	3,97
toluen	1,32
t-BuOH	7,33

Pe baza acestor rezultate, posibilitatea de utilizare a solvenților organici ca și mediu de reacție în sistemul „one-pot” a fost exclusă.

Deoarece uleiurile vegetale se găsesc la temperatura camerei în stare lichidă și sistemele de reacție fără solvent s-au dovedit eficiente în studiile anterioare de policondensare, s-a luat în considerare și această variantă. Pentru aceasta a fost necesară determinarea parametrilor cinetici ai oleat hidratatei, întrucât realizarea reacției în condițiile unui conținut redus de apă ar însemna să se lucreze la o concentrație foarte mare de substrat în faza apoasă.

Reacțiile au fost efectuate conform metodei 3.5 la zece concentrații de substrat, două valori de pH (6,5 și 8,0) și temperatura de 30°C, timp de 2 h. Reprezentarea Michaelis-Menten a vitezelor inițiale în funcție de concentrația de substrat (Figura 2.64) indică faptul că în ambele cazuri s-a observat o scădere a V_i la concentrații de substrat mai mari de 8 mM.

Parametrii cinetici calculați cu ajutorul programului SigmaPlot 11.0 (Tabel 2.28, Figura 2.64) indică faptul că la ambele pH-uri OHaza prezintă inhibiție de substrat la valori ale concentrațiilor de substrat de 8 respectiv 10 mM.

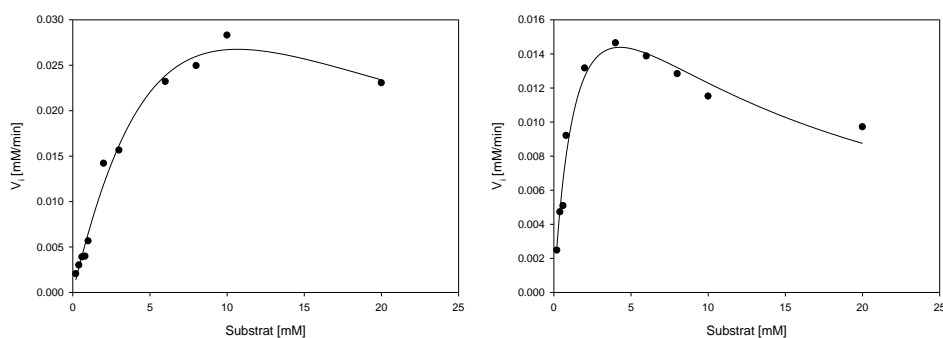


Figura 2.64 Curbele Michaelis Menten determinate pentru OHaza nativă la pH 6,5 și pH 8,0

Tabel 2.28. Parametrii cinetici ai OHazei determinați la pH 6.5 și pH 8.0.

Parametrii	pH 6,5	pH 8,0
Concentrație proteină [mg/mL]	0,06	0,06
Concentrație proteină [M]	8,76E-07	8,76E-07
Vmax [mM/min]	0,092	0,026
Vmax [M/s]	1,54E-06	4,33E-07
Km [mM]	13,090	1,720
kcat [s⁻¹]	1,756	0,495
K_i [mM]	8,72	10,6

Pe baza acestor rezultate, s-a ajuns la concluzia că efectuarea reacțiilor în sistem „one-pot” nu se poate realiza în absența mediului de reacție apos.

2.7.1. Influența pH-ului și a temperaturii asupra sintezei estolidelor în mediu apos

Deoarece în sistemul de reacție „one-pot” s-a obținut ca produs majoritar monoestolida nesaturată în acest studiu a fost testată capacitatea lipazelor de a sintetiza estolide în mediu apos. În acest sens au fost selectate două valori ale temperaturii 40°C și respectiv 60°C și trei soluții tampon cu diferite valori ale pH-ului (4,0, 6,5 și 8,0), utilizând acid 10HSA ca și substrat și lipaza din *P. fluorescens*.

Spectrele MALDI-TOF MS suprapuse din Figura 2.64 corespunzătoare produșilor de reacție obținuți la 60°C indică faptul că elongarea 10HSA este favorizată de scăderea pH-ului.

Pentru a exclude posibilitatea catalizei acide, s-au colectat și spectrele MALDI-TOF MS (Figura 2.65) ale reacțiilor de control la aceleași valori de pH, în care se poate observa doar prezența materiei prime 10HSA (aduct de K, m/z 377).

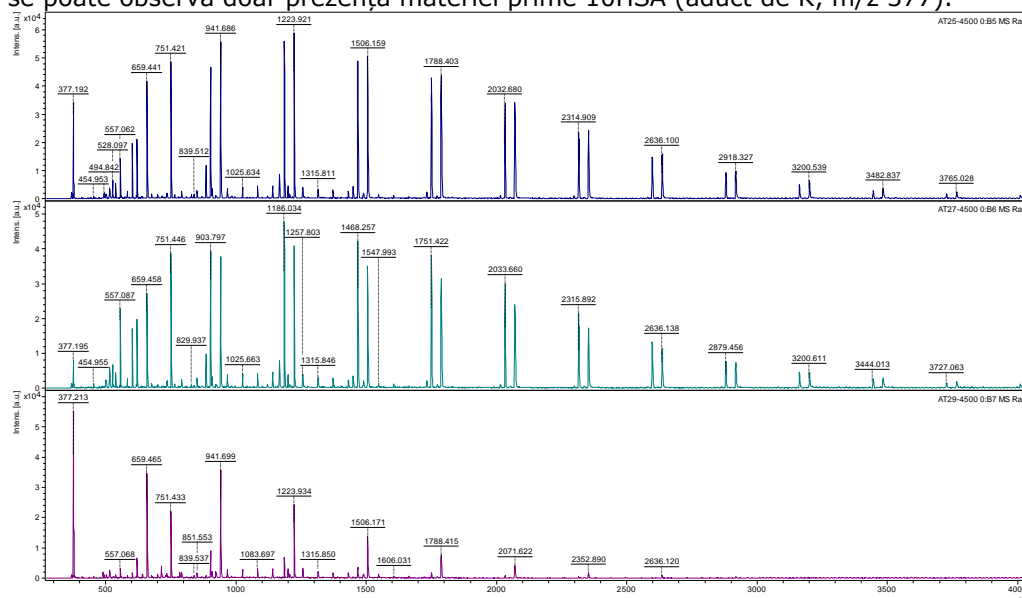


Figura 2.65 Spectrele MALDI-TOF MS ale estolidelor 10HSA sintetizate la 60°C la diferite valori ale pH-ului

2.7.2. Influența raportului concentrațiilor de enzime în sistemul „one-pot”

În cadrul acestui subcapitol s-a studiat efectul reducerii cantității de lipază în sistemul „one-pot” asupra formării estolidei nesaturate (de tipul 10HSA-OA), în condițiile existenței unui exces de OHază care să compenseze activitatea mai mare a lipazei. Concentrația de OHază (2mg/mL) și concentrația de trioleină (~15 mM) au fost menținut constante, iar influența raportului enzimelor a fost studiată la trei rapoarte lipază/OHază, de 1:1, 1:20 și 1:50. După 24 h enzimele au fost inactivate prin adăugare de HCl, iar amestecurile de reacție au fost analizate prin GC-MS și MALDI-TOF MS după extracție cu diclormetan. Spectrele MALDI-TOF MS indică o scădere a intensității semnalului corespunzător estolidei nesaturate odată cu scăderea concentrației de lipază din *C. rugosa* (Figura 2.66). În cazul lipazei din *P.*

fluorescens se observă o dependență mai pronunțată față de concentrația de lipază, confirmată de lipsa semnalului corespunzător estolidei la raport lipază/OHază de 1:50 și de prezența semnalului corespunzător trioleinei (m/z 923), care indică hidroliza incompletă după 24 h, cât și a acidului 10HSA (m/z 377) format în urma reacției catalizate de oleat hidratată. Prin urmare, realizarea reacțiilor în condițiile unui exces important de OHază poate constitui o soluție viabilă pentru a favoriza formarea estolidei.

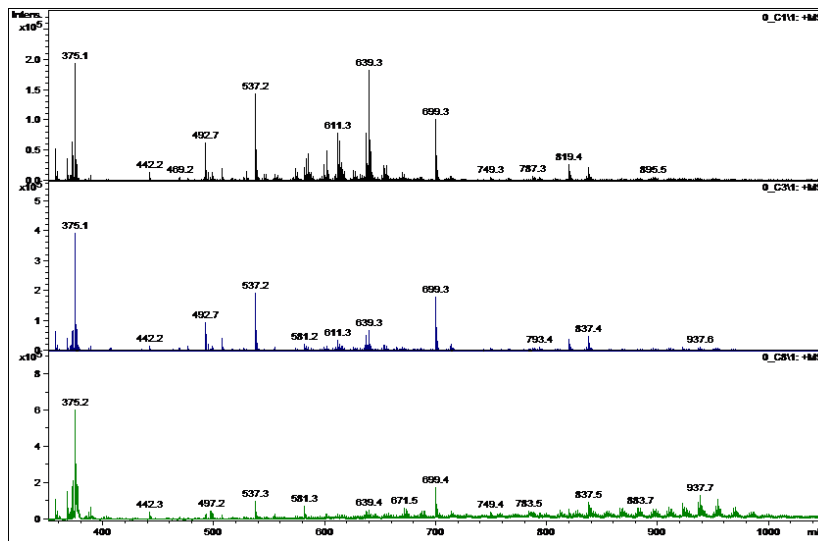


Figura 2.66 Spectrele MALDI-TOF MS corespunzătoare amestecurilor de reacție „one-pot” utilizând diferite concentrații de lipaza din *C. rugosa* (negru raport OHaza:lipaza 1:1, albastru 20:1 și verde 50:1)

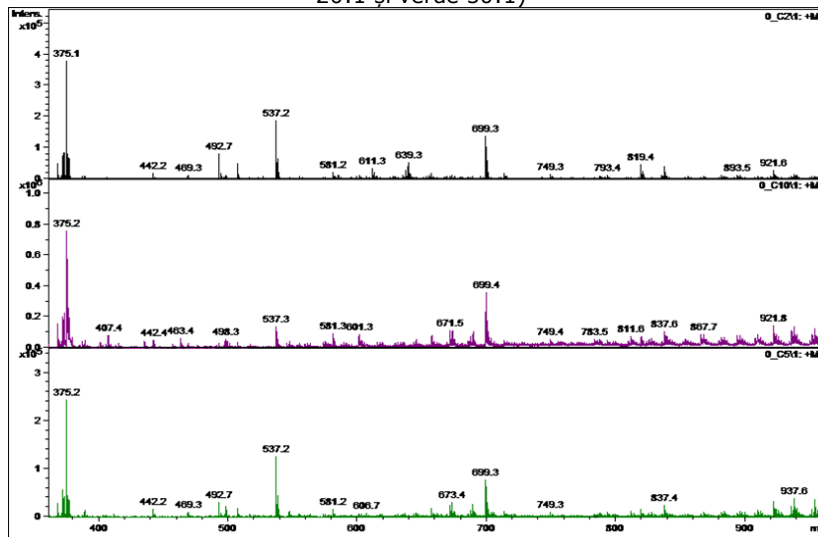


Figura 2.67 Spectrele MALDI-TOF MS corespunzătoare amestecurilor de reacție „one-pot” utilizând diferite concentrații de lipaza din *P. fluorescens* (negru raport OHaza:lipaza 1:1, albastru 20:1 și verde 50:1).

3. Partea experimentală

3.1. Materiale

Majoritatea reactivilor utilizați: acid oleic 96%, chitosan 85% deacetilat, particule magnetice funcționalizate cu grupări amino (AMP), glutaraldehidă 50%, particule magnetice funcționalizate cu grupări carboxil (CMP), izotiocianat de fluoresceină (FITC), Span 80, bis(trimetilsilil)trifluoroacetamidă/trimetil-clorosilan (BSTFA+TMCS=99:1), izobutil trimetoxisilan (iBuTMOS, 97%), (3-aminopropil)trimetoxisilan (3-NH₂PrTMOS, 97%), acid 12-hidroxistearic (99%), acid 16-hidroxihexadecanoic (98%), acid ricinoleic (98%), trans-2-[3-(4-*t*-butil-fenil)-2-metil-2-propenilidena]malononitril (DCTB), trifluoroacetat de potasiu (KTFA), ε-caprolactonă (ECL), β-butirolactonă (BL), polihidroxiobutirat (PHB), cât și lipazele Amano din *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Thermomyces lanuginosus*, lipaza din pancreas de porc și Alcalaza CLEA, au provenit de la Sigma Aldrich (Steinheim, Germania).

Particulele Sepabeads EC-EP au fost primite de la compania Resindion S.R.L. (Italia), iar rășina Ni-NTA Superflow a fost achiziționată de la Qiagen (Olanda).

Celite 545, D-glucono-δ-lactonă (GL), *t*-butanol (~99%), toluen (>99%), dimetilsulfoxid (~99.7%), au fost produse ale companiei Merck.

Pentru imobilizarea lipazelor s-au utilizat silanii precursori dimetildimetoxisilan (DMeDMeOS, 96%) și tetraetoxisilan (TEOS, 98%) de la Fluka Chemie (Buchs, Elveția), tetrametoxisilan TMOS 98%, octil-trimetoxisilan OctTMOS 95% și 3-aminopropil-trimetoxisilan 98% de la Alfa Aesar (Brunswick Chemie, Olanda).

Lipazele din *Candida rugosa*, *Aspergillus oryzae*, *Candida antarctica* A, *Rhizopus arrizus*, *Penicillium roqueforti*, *Mucor javanicus*, *Candida lipolytica* și *Thermomyces brockii* au fost obținute de la Fluka.

Lipazele imobilizate Novozyme 435, Lipozyme TL *Candida antarctica* B au fost achiziționate de la Novozymes, CLEA din *Candida antarctica* B și *Pseudomonas stutzeri* de la CLEA Technologies (Delft, Olanda), lipazele din *Alcaligenes* sp. (lipase TL), *Pseudomonas stutzeri* (Lipase TI) de la Meito Sangyo (Japonia), iar lipaza liofilizată din *Candida antarctica* B (CALB-Lecta) de la C-Lecta (Leipzig, Germania).

3.2. Purificarea oleat hidratazei

3.2.1. Obținerea extractului celular

Oleat hidrataza din *Elizabethkingia meningospetica* (EC 4.2.1.53) a fost obținută din extractul celular rezultat după ruperea peretelui celular al celulelor *E. coli* TOP 10 care au conținut plasmidul pBAD-HISA-OH. Celulele au fost obținute la 37°C utilizând ca mediu de cultură TB (Terrific Broth), care a fost preparat astfel:

- Soluția 1 (mediul Terrific Broth): 12 g de Bacto-triptonă, 24 g Drojdie-Bacto, 4 mL glicerină într-un volum final de 900 mL H₂O bidistilată, care s-a autoclavat 20 min

- Soluția 2: 11,5g KH_2PO_4 , 82 g K_2HPO_4 s-au dizolvat într-un volum final de 500 mL H_2O bidistilată;
- Soluția finală a fost obținută amestecând: 900 mL din Soluția 1, 100 mL Soluția 2 și 1mL soluție de ampicilină (100 mg/mL).

Mediul cultură a fost inoculat cu 10 mL pre-cultură, iar densitatea optică la 600 nm (OD 600) la fost determinată la diferite intervale de timp. Când valoarea absorbantei la 600 nm s-a regăsit în intervalul 0,6-0,8, celulele au fost induse cu 1 mL arabinoză 20% și au fost incubate peste noapte la 30°C, 180 rpm. Separarea celulelor s-a realizat prin centrifugare la 4°C, 10000 rpm, 30 min iar peretele celular a fost distrus cu ajutorul dispozitivului French Press (Constant Systems, IUL Instruments). Resturile de peretele celular au fost separate prin centrifugare la 4°C, 14.000 rpm, 30 min (Centrifuga Eppendorf 5810R), iar supernatantul care conținea oleat hidrataza a fost aplicat pe o coloană HisTrap-HP (GE, Healthcare), conectată la un sistem FPLC echipat cu detector UV.

3.2.2. Purificarea OHazei prin cromatografie de afinitate

Coloana ce conține matricea specifică a fost echilibrată cu 5 volume de soluție tampon W (20 mM TRIS/HCl, 50 mM NaCl, 5 mM imidazol, pH 8,0), după care a fost aplicat extractul celular. Coloana a mai fost spălată cu 5 volume de soluție tampon W pentru a îndepărta toate proteinele care nu conțineau secvența de 6 histidine în structură. Oleat hidrataza a fost eluată folosind gradient de până la 50% cu soluția tampon E (20 mM TRIS/HCl, 50 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8,0). Frațiile colectate au fost concentrate și desalinizate, utilizând tuburi de ultrafiltrare Viva Spin (10k Da cutt-off) și soluție tampon 50 mM TRIS, pH 8,0. Soluția de enzimă a fost păstrată în stare refrigerată la -20°C.

3.3. Electroforeza proteinelor pe gel de poliacrilamidă

Gradul de puritate a proteinelor se monitorizează cel mai des prin electroforeză. Această tehnică permite separarea proteinelor prezente în amestec pe baza maselor moleculare. Electroforeza în gel de poliacrilamidă, utilizată în aceste studii se realizează în condiții denaturante (în prezența dodecilsulfatului de sodiu, SDS, 0,1%). Astfel, proteinele prezente în amestec se vor separa sub formă de benzi distincte în interiorul gelului. Pentru electroforeză s-au utilizat geluri prefabricate de poliacrilamidă de tipul NuPAGE® NOVEX® Bis-Tris Mini Gels (10%) furnizate de Invitrogen™. Pentru soluția tampon utilizată pentru migrarea moleculelor s-au amestecat 40 mL tampon NuPAGE MES (acid 2-(N-morfolino)-etansulfonic) și 760 mL apă deionizată. Probele de proteine au fost preparate prin amestecarea a 6,5 μL probă, 2,5 μL tampon NuPAGE LDS (dodecilsulfat de litiu) și 1 μL NuPAGE agent reducător (2-mercaptoetanol) și au fost incubate timp de 10 minute la 95°C.

Migrarea proteinelor pe gel s-a realizat prin aplicarea unui voltaj de 200 V timp de 35 de minute. Vizualizarea proteinelor pe geluri s-a realizat prin colorare cu Coomassie Brilliant Blue R-250, timp de 30 min.

3.4. Determinarea conținutului de proteine

3.4.1. Determinarea conținutului de proteine în microplăci

Conținutul de proteine în soluția de hidratază purificată s-a realizat în microcuve utilizând Kit-ul de la BioRAD astfel: S-au pipetat 200 μL soluție de reactiv BioRad (dilat 1:5) și 25 μL de probă. Amestecul a fost incubat 30 min la 37°C, după care s-a citit absorbanta la 562 nm. Concentrația s-a determinat pe baza dreptei de etalonare obținute cu soluții de albumina serică de bovină de concentrații cunoscute, în domeniul 20-2000 $\mu\text{g/mL}$.

3.4.2. Determinarea conținutului de proteine prin metoda Bradford.

Principiul metodei

Metoda Bradford pentru determinarea conținutului de proteine din soluție se bazează pe formarea unui complex între proteină și colorantul Brilliant Blue G. Complexul format prezintă absorbție maximă în domeniul 465-595 nm. Pentru determinarea conținutului de proteine s-au pipetat 750 μL soluție de reactiv Bradford și 25 μL probă. Amestecurile au fost agitate și incubate 15 min la temperatura camerei.

Concentrația de proteină a fost determinată pe baza dreptei de etalonare (exemplu Figura 3.1) utilizând albumină bovină serică în domeniul 0,1-1,0 mg/mL dizolvate în soluție tampon fosfat sau apă.

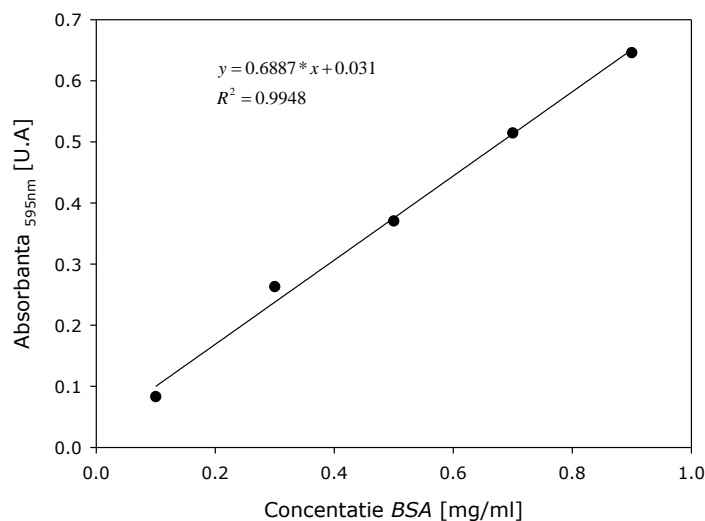


Figura 3.1. Dreapta de etalonare pentru determinarea concentrației de proteine prin metoda Bradford

3.5. Determinarea activității oleat hidratizei

Activitatea oleat hidratizei native și imobilizate a fost determinată utilizând ca substrat acid oleic (2 mM) într-un volum total de 500 μ L de soluție tampon 20 mM TRIS 150 mM NaCl, pH 8,0. Probele au fost incubate la 30°C, 1000 rpm timp de 2 h. Enzima a fost inactivată prin adăugare de 50 μ L HCl 4N, iar substratul nereacționat și produsul au fost extrase de 3 ori cu un volum de diclormetan. Solventul a fost evaporat la temperatura camerei, iar probele au fost reconstituite în toluen și derivatizate cu BSTFA la 95°C timp de 1 h, după care au fost analizate prin GC-MS. Hexadecanul a fost utilizat ca standard intern. Analiza GC-MS s-a realizat utilizând sistemul Interscience Trace GC Ultra GC+PTV, dotat cu autosampler AS 3000II și coloana Restek Rxi-5ms 30 mx0,25 mmx0.25 μ m.

Condițiile de analiză au fost:

- Temperatura în injector: 300°C
- Temperatura în detector: 300°C
- Gaz purtător: heliu, cu debitul 1 mL/min
- Program de temperatură: 100°C (2 min)-300°C (3 min) cu viteza de încălzire 10°C/min.

Calculul activității specifice s-a realizat pe baza formulei:

$$\bullet \quad \text{Activitatea specifică} = \left(\frac{\mu\text{mol } 10\text{HSA}}{\text{timp [h]} \times \text{cantitate de enzimă [g]}} \right)$$

3.6. Metode de imobilizare a oleat hidratizei

3.6.1. Imobilizarea prin adsorbție

20 mg Celite 545 au fost amestecate cu 500 μ L OHaza (2,87 mg/mL) în soluție tampon fosfat 20 mM, pH 8,0. Amestecul a fost supus agitării la 4°C timp de 48 ore. OHaza adsorbită a fost separată prin centrifugare și spălată de cinci ori cu soluție tampon fosfat 20 mM pH 8,0 și de două ori cu 20 mM tampon TRIS. Concentrația de proteină a fost determinată în fiecare etapă de spălare (cu excepția spălării cu tampon TRIS), prin utilizarea metodei Bradford. Celite-OHaza a fost menținută în soluție tampon 20 mM TRIS, pH 8,0 la 4°C până la utilizarea ulterioară. Imobilizarea în prezența unui emulgator a fost efectuată prin aceeași procedură, adăugând 30 μ L emulgator (Span 80) în soluția de imobilizare.

3.6.2. Imobilizarea prin afinitate

1 mL soluție de OHază (2,5 mg/mL) în soluție tampon TRIS, 20 mM, pH 8,0 a fost adăugată peste 200 μ L suspensie de rășină Ni-NTA Superflow. Amestecul a fost agitat peste noapte timp de 1,5 h, la 100 rpm. La finalul imobilizării rășina a fost spălată de 3 ori cu soluție tampon TRIS pH 8,0 și păstrată la 4°C până la utilizarea ulterioară.

3.6.3. Imobilizarea prin interacțiuni ionice pe chitosan

500 μ L soluție tampon fosfat 20 mM, pH 6,5, s-au adăugat peste 25 mg chitosan, iar suspensia a fost menținută la temperatura camerei timp de 3 ore sub agitare la 100 rpm. Chitosanul umed a fost separat de soluția tampon prin centrifugare la 14.000 rpm timp de 10 min, s-au adăugat 500 μ L soluție OHază în 20 mM tampon fosfat pH 6,5 (2,5 mg/mL) și amestecul a fost agitat la 4°C, 100 rpm timp de 24 ore. Etapa de spălare a fost realizată conform descrierii din secțiunea 3.6.1.

3.6.4. Imobilizarea prin legare covalentă pe diferite suporturi

- **Imobilizarea pe Epoxy-sepabeads la 25°C/4°C**

900 μ L soluție OHază (1,5 mg/mL) în tampon fosfat 50 mM pH 8,0 s-au adăugat la 100 mg de suport activat cu grupări epoxi. Amestecul a fost incubat 24 h la 100 rpm, la 4°C și respectiv la 25°C. S-a efectuat și un set de experimente prin tratarea cu soluție de glicină 3 M în 20 mM tampon fosfat pH 6,5, 24 h la 4°C, 100 rpm, cu scopul de a bloca jumătate din grupările epoxi libere. OHaza imobilizată a fost separată prin filtrare, a fost spălată conform metodei 2.4.1 și depozitată la 4°C până la utilizarea ulterioară.

Imobilizarea OHazei în trei etape a fost realizată la pH 7,0 în fosfat de sodiu 1 M timp de 24 ore, urmată de incubarea enzimei imobilizate în fosfat de sodiu 100 mM pH 9,0 timp de 72 ore și hidrofilizarea suprafeței suportului prin incubarea derivatului timp de 24 ore la pH 8,5, în prezență de glicină 3 M (sau alți aminoacizi).

- **Particule magnetice funcționalizate cu grupări amino (AMP)**

200 μ L suspensie de particule AMP au fost activate de trei ori folosind soluție tampon de cuplare (0,01 M piridină în apă distilată pH 6,0 ajustat cu HCl 2N) la un volum final de 1 mL și agitare puternică. Supernatantul a fost aspirat și s-au adăugat 400 μ L soluție de glutaraldehidă 5%. Particulele au fost re-suspendate și supuse agitării ușoare la temperatura camerei, timp de 3 ore. Supernatantul a fost aspirat, iar particulele umede au fost spălate de trei ori pentru a elimina glutaraldehida nereacționată. 300 μ L soluție OHază (5,74 mg/mL în 20 mM tampon fosfat, pH 8,0) au fost adăugate la particulele activate, iar amestecul a fost supus agitării ușoare la 4°C, timp de 48 h. Particulele au fost apoi separate magnetic și resuspendate în 500 μ L soluție cu glicină (1 M în apă distilată, pH 8,0, ajustat cu NaOH 2 N), urmată de agitare 100 rpm timp de 30 min, la temperatura camerei. În final, s-a spălat de trei ori cu soluție tampon de spălare (0,01 M TRIS bază conținând 0,15 M NaCl, 0,1% (m/v) albumină serică de bovină, 0,001 M EDTA sare de sodiu și 0,1% (w/v) azidă de sodiu) și de trei ori cu soluție tampon TRIS 20 mM, pH 8,0. Enzima imobilizată s-a stocat la 4°C în 20 mM tampon TRIS, pH 8,0.

- **Particule magnetice cu grupări carboxil terminale (CMP)**

250 μ L suspensie CMP au fost activate de 3 ori folosind tampon de cuplare (0,01 M tampon fosfat cu 150 mM NaCl în apă distilată, pH 5,5, ajustat cu HCl 2 N) la un volum final de 0,5 mL și agitare puternică. Particulele au fost re-suspendate în tampon de cuplare 250 μ L, s-au adăugat 100 μ L agent de cuplare (1-etil-3(3-

dimetilaminopropil) carbodiimidă EDCI, ~0,6 mg/mL) și 250 μ L soluție OHază în tampon fosfat (5,74 mg/mL), iar amestecul a fost agitat ușor la 4°C timp de 48 de ore. În final s-a spălat de trei ori folosind tampon de spălare (0,01 M TRIS bază conținând 0,15 M NaCl, 0,1% (w/v) albumină serică de bovină, 0,001 M EDTA sare de sodiu și 0,1% (w/v) azidă de sodiu) și de trei ori cu soluție tampon TRIS 20 mM, pH 8,0. OHaza imobilizată a fost păstrată la 4°C în 20 mM TRIS tampon pH 8,0 până la utilizarea ulterioară.

- **Legare covalentă pe chitosan pre-activat (CHT-GL)**

400 μ L glutaraldehidă 25% s-au adăugat la 25 mg chitosan în 1,6 mL tampon fosfat 20 mM, pH 6,5. Suspensia a fost agitată la temperatura camerei timp de 3 ore, la 100 rpm. Chitosanul activat cu glutaraldehidă a fost spălat de trei ori cu câte 2 mL tampon fosfat 20 mM, pH 7,0. S-au adăugat 500 μ L soluție OHază (2,5 mg/mL) și amestecul a fost agitat la 4°C, 100 rpm, timp de 24 ore. Etapa de spălare a fost realizată conform descrierii din secțiunea 3.6.1.

3.6.5. Legarea covalentă pe macroparticule magnetice de chitosan (AMP-CHT)

Compozitele magnetice de chitosan conținând particule magnetice funcționalizate cu grupări amino (AMP) dispersate au fost obținute conform unei metode descrise în literatură [213] Soluția de chitosan 2% în acid acetic (2%) a fost adăugată peste 187,5 mg AMP umede, în raport 5:1 (w/w). Amestecul a fost agitat intens și apoi menținut timp de 1 oră în baia de sonicare, pentru omogenizare completă. Macroparticulele au fost precipitate în soluție de hidroxid de sodiu 1 M conținând 26% etanol, așa cum este descris în altă lucrare [198], apoi au fost spălate cu apă distilată și stocate la 4°C până la utilizarea ulterioară. Înainte de imobilizare, particulele au fost activate prin adăugarea a 5% glutaraldehidă timp de 4 ore la 10°C, în soluție tampon fosfat 20 mM. 250 μ L soluție OHază (2,5 mg/mL) s-au adăugat la 150 mg macroparticule umede apoi amestecul a fost adus la un volum final de 1 mL cu tampon fosfat 20 mM pH 7,0 și menținut sub agitare ușoară peste noapte la 10°C. Enzima imobilizată a fost spălată conform descrierii din secțiunea 3.6.1 și s-a păstrat la 4°C în soluție tampon TRIS 20 mM, pH 8,0.

3.6.6. Imobilizarea OHazei prin înrețelare (CLEA)

250 μ L soluție OHază (2,3 mg/mL) au fost amestecate cu 750 μ L soluție saturată de sulfat de amoniu, ajustată la pH 8,0 cu NaOH. Amestecul a fost agitat la 500 rpm la 4°C timp de 1 oră. 12,5 μ L (0,3%, m/v) de glutaraldehidă 25% (m/v) au fost adăugați în picături și amestecul a fost agitat la 4°C, 500 rpm timp de 3 ore. Enzima tip CLEA a fost centrifugată (14.000 rpm, 30 min), spălată de trei ori cu tampon fosfat 20 mM pH 8,0 și de două ori cu tampon de 20 mM TRIS, iar în final depozitată în aceeași soluție tampon până la utilizarea ulterioară.

3.6.7. Imobilizarea prin entrapare în matrici de sol-gel

Entraparea în matrici de sol-gel a OHazei a fost realizată în esență conform metodei descrise anterior pentru subtilizină [192]. Într-o sticlă de 4 mL s-au adăugat soluție OHază (195 μ L, conținând 5,87 mg/mL), în soluție tampon TRIS 20 mM pH 8,0, 25 μ L NaF 1 M, 25 μ L soluție 4% PEG 20.000 și 50 μ L alcool izopropilic, sub agitare magnetică la 600 rpm. 1,5 mmoli silani precursori au fost adăugați în diferite rapoarte molare și amestecarea a continuat la temperatura camerei până a început gelifierea. Gelul a fost menținut 24 ore la 4°C pentru polimerizare completă și a fost spălat pentru a elimina monomerii și aditivii nereacționați cu apă Milli-Q (2,5 mL), alcool izopropilic (1,25 mL) și n-hexan (1,25 mL), apoi uscat la 25°C timp de 24 ore. Sol-gelul care conține enzima încapsulată a fost zdrobit într-un mojar și păstrat la 4°C până la utilizarea ulterioară.

3.7. Influența pH-ului asupra activității oleat hidratazei

Efectul pH-ului asupra activității OHazei native și imobilizate a fost evaluat în intervalul de pH 4,0-9,0 prin utilizarea unei soluții tampon pentru domeniu larg de pH care conține acid citric, acid boric și soluție tampon de fosfat trisodic [187]. Testarea activității a fost realizată așa cum este descrisă în secțiunea 3.5.

3.8. Efectul temperaturii asupra activității enzimei

Incubarea enzimei native/imobilizate a fost realizată timp de 2 ore în absența substratului la diferite temperaturi, în intervalul 30°C-50°C, urmată de răcirea pe gheață timp de 10 min. Activitatea reziduală a enzimei a fost determinată conform metodei 3.5.

3.9. Studiul reutilizării biocatalizatorului

Activitatea OHazei imobilizate a fost determinată după utilizarea repetată a biocatalizatorului la 30°C timp de 2 ore. După fiecare ciclu enzima imobilizată a fost separată magnetic și spălată cu soluție tampon TRIS 20 mM conținând 150 mM NaCl, pH 8,0 de 3 ori. Un ciclu nou de reacție a fost realizat prin adăugarea soluției tampon și a substratului, activitatea biocatalizatorului reutilizat a fost testată conform metodei 3.5, iar valoarea rezultată a fost comparată cu valoarea primului ciclu de utilizare (definită ca 100%).

3.10. Influența aditivului asupra stabilității de depozitare

Stabilitatea la depozitare a OHazei a fost testată la 4°C, în absența și în prezența a cinci aditivi, sorbitol, trehaloză, maltodextrină, PEG 8000 și alcool polivinilic. Activitatea reziduală a enzimei native și imobilizate a fost determinată conform metodei 3.5. folosind acid oleic ca substrat, la diferite intervale de timp, până la 7 zile.

3.11. Caracterizarea morfologică a oleat hidratatei imobilizate

Marcarea proteinelor cu FITC

Reacția de cuplare a OHaza cu FITC a fost inițiată prin adăugarea în picături a 600 μL FITC (1 mg/mL, dizolvat în dimetilformamidă) în soluția OHazei (5,87 mg/mL în tampon fosfat 20 mM, pH 8,0). Amestecul a fost incubat timp de 1 oră la temperatura camerei (bazat pe PIERCE EZ-Label TM FITC etichetare Kit).

Numărul de mmoli FITC fost calculat pe baza ecuației de mai jos:

$$n_{\text{FITC}} = V \times c \times 10 \times \frac{1}{M} [\text{mmol}]$$

unde:

n_{FITC} : reprezintă numărul de mol FITC [mmol];
 V: reprezintă volumul de soluție de enzimă [mL];
 c: este concentrația soluției de enzimă [mg/mL];
 10: este excesul molar de FITC;
 M: reprezintă greutatea moleculară a proteinei [mg/mmol].

Volumul FITC a fost determinat din ecuația următoare:

$$V_{\text{FITC}} = n_{\text{FITC}} \times M_{\text{FITC}} \times 100 [\mu\text{L}]$$

unde:

V_{FITC} : reprezintă volumul de FITC [μL];
 n_{FITC} : numărul de mol de FITC [mmol];
 M_{FITC} : greutate moleculară de FITC [mg/mmol];

OHaza marcată a fost separată de FITC nereacționat prin mai multe spălări cu soluție tampon fosfat 20 mM pH 8,0 cu ajutorul unui filtru centrifugal (Centricon PL-30, cu o membrană cu limită de excludere de 30.000 Da). Spectrele UV-VIS au fost colectate după fiecare etapă de spălare, până când absorbanta de la 493 nm (valori caracteristice ale FITC) a scăzut în intensitate până la 0,1 unități de absorbție. Concentrația proteinei a fost determinată prin testul Bradford. Proteina marcată cu FITC a fost imobilizată pe baza metodei descrisă pentru legarea covalentă a macroparticulelor magnetice de chitosan (AMP-CHT, secțiunea 3.6.3), iar imaginile de fluorescență au fost colectate cu microscopul de fluorescență Leica True Confocal Scanner (Leica TCS SPE), la magnitudine de 10.

3.12. Analiza acidului 10HSA și acidului oleic prin HPLC

Pentru monitorizarea conversiei acidului oleic în 10HSA prin cromatografie de lichide de înaltă performanță, probele au fost acidificate cu HCl iar substratul și produsul de reacție s-au obținut prin 3 extracții succesive cu diclormetan timp de 5 min la 1400 rpm. 50 μL din faza organică s-au colectat după fiecare extracție, după

care solventul a fost evaporat folosind concentratorul SpeedVac (Thermo). Pentru derivatizare, peste probele evaporate s-au adăugat 25 μ L soluție de 2-bromoacetofenonă (10 mg/mL, în acetonă) și 25 μ L soluție de trietil amină (10 mg/mL, în acetonă). Probele au fost incubate la 96°C timp de 15 min, după care în fiecare probă s-au adăugat 3,5 μ L acid acetic și s-au incubat încă 5 min. La sfârșitul derivatizării, probele au fost evaporate și reconstituite în 100 μ L acetonitril.

Separarea s-a realizat folosind coloana Merck Chromolith 4,6 x 50 SpeedROD RP 18e, termostată la 50°C, utilizând ca fază mobilă acetonitril:H₂O cu gradient (A: H₂O cu 0,1% v/v acid trifloracetic, B: acetonitril): 50% B (3 min), 50-80% B (2 min) și izocratic 80% B (7 min) cu un debit de 1 mL/min, detecția fiind realizată la 242 nm.

3.13. Sinteza acidului 10-hidroxistearic

Acidul 10-hidroxistearic a fost sintetizat utilizând 0,5 mL extract celular (concentrație de proteine 48 mg/mL obținut din celulele *E. coli* TOP 10 care au conținut pBAD-HISA-OH utilizând acid oleic (0,6% v/v) ca și substrat în soluție tampon 50 mM TRIS-HCl, pH 8,0 la 30°C, 200 rpm, 12 h.

3.14. Analiza hidroxi-acizilor prin GC-MS

Conversia HFA a fost determinată pe baza analizei GC-MS, după derivatizare cu BSTFA+TMCS (99:1), la un raport reactiv:probă de 2:1 (w/w), timp de 1 oră la 95°C, așa cum a fost descris anterior [214]. Hexadecanul a fost utilizat ca standard intern. Analiza a fost realizată utilizând un sistem Interscience Trace GC Ultra GC + instrument PTV, echipat cu autosampler AS3000 II iar pentru separare s-a utilizat o coloană capilară Restek RxI-5ms 30m x 0,25mm x 0,25mm. Condițiile de analiză au fost:

- temperatura cuptorului 100°C-300°C cu viteza de încălzire 10°C/min;
- temperatura injectorului 300°C;
- gaz purtător heliu, debit 1,0 mL/min.

Spectrele de masă au fost obținute cu ajutorul detectorului de masă Interscience Trace DSQ II XL cuadropol (EI, domeniu de masă 35-500 Dalton, 150 ms viteză de scanare), la o energie de emisie de 70 eV.

3.15. Determinarea purității enantiomerice a 10HSA

Puritatea stereochimică a 10HSA fost determinată pe baza metodei descrise anterior de Yang ș.a. [201]. Această metodă implică sinteza esterilor (S)-(+)-O-acetilmandelic ai metil-10-hidroxistearatului, urmată de analiza RMN. Acidul 10-hidroxistearic izolat a fost prima dată metilat prin utilizarea de HCl metanolic. La 36 mg 10HSA s-au adăugat 9 mL soluție HCl metanolic 0,5 N. Amestecul a fost incubat timp de 1 oră la 50°C, iar 10HSA metilat obținut după evaporarea rotativă a reacționat cu acidul (S)-(+)-O-acetilmandelic. Pentru această reacție 30 mg de 10HSA metilat și 10 mg de diciohexilcarbodiimidă au fost dizolvate în 2 mL de CH₂Cl₂. Amestecul a fost adăugat în soluție de acid (S)-(+)-O-acetilmandelic obținut din 18,4 mg acid (S)-(+)-O-acetilmandelic și 2 mg de 4-(N,N-dimetilamino)-piridină,

în 2 mL de CH_2Cl_2 . După 5 ore de agitare la 300 rpm pe baie de gheață, amestecul de reacție a fost filtrat pentru a îndepărta precipitatul alb, iar filtratul a fost evaporat la sec și analizat prin RMN.

3.16. Analiza FT-IR

Spectrele acidului 10-hidroxistearic și ai derivaților acestuia au fost obținute prin spectrofotometrie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), utilizând modul atenuat de reflexie totală (ATR), pe un spectrometru Varian Scimitar 1000ft-IR echipat cu un DTSG-detector PIKE și ATR echipat cu un diamant cu lentilă w/ZnSe cu singură placă de reflexie. Spectrele au fost colectate în domeniul $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ cu o rezoluție de 4 cm^{-1} și cu 64 de scanări co-adăugate.

3.17. Analiza RMN

Spectrele RMN au fost înregistrate pe un spectrometru BrukerAvance III operând la 500,0 MHz (1H) și 125,0 MHz (13C). Probele au fost dizolvate în CDCl_3 , DMSO- d_6 sau piridină- d_5 și deplasările chimice δ sunt date în ppm față de TMS.

3.18. Determinarea activității hidrolitice a lipazelor utilizând *p*-nitro-fenil palmitat

3.18.1. Determinarea activității hidrolitice a lipazelor native

Activitatea hidrolitică a lipazelor a fost determinată utilizând ca substrat *p*-nitro-fenil palmitatul, la 37°C și timp de reacție de 10 min. Formarea *p*-nitrofenolului a fost monitorizată spectrofotometric la 410 nm. Substratul a fost dizolvat în izopropanol la o concentrație de 0,75 mM, iar reacțiile au fost efectuate în soluție tampon Sorensen preparată astfel: la 90 mL soluție tampon fosfat 0,2 M, pH 8,0 s-au adăugat 207 mg deoxicolat de sodiu și 100 mg gumă arabică. Amestecul de reacție a fost preparat în cuve de 2 mL în care s-au pipetat: 800 μL soluție tampon Sorensen și 100 μL soluție substrat care au fost menținute 2 min la 37°C după care s-a adăugat 100 μL soluție de lipază, moment în care a fost inițiată reacția.

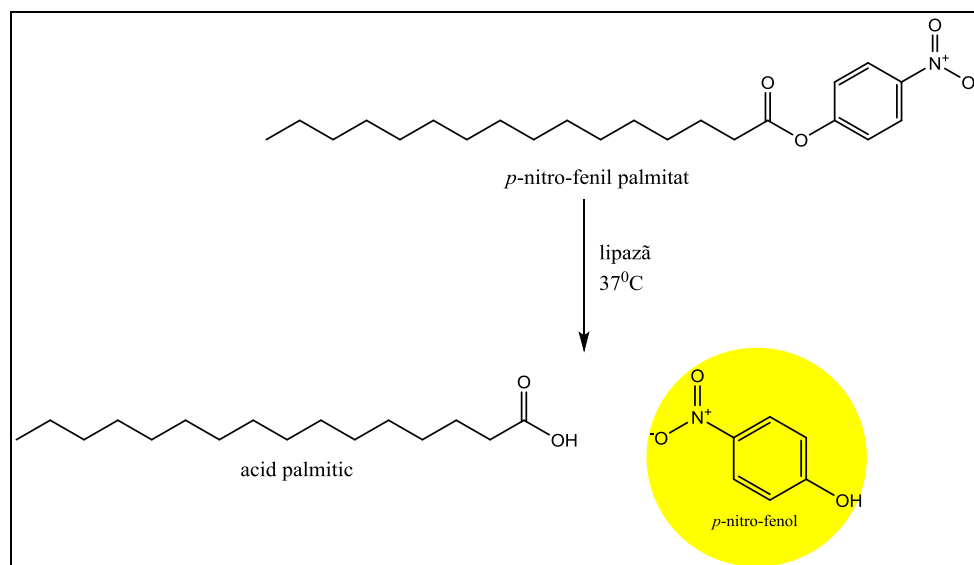


Figura 3.2. Hidroliza enzimatică a *p*-nitro-fenil palmitatului

Activitatea hidrolitică a fost determinată pe baza formulei.

$$A [U] = \frac{\Delta A \times V_{total} \times d}{t \times \varepsilon \times V_{enzimă} \times l}$$

unde:

A - activitatea

ΔA - diferența dintre absorbanța finală și inițială la 410 nm

V_{total} - volumul total de probă (1 mL)

d - diluția

t - timpul (min)

ε - coeficientul molar de extincție $18 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

$V_{enzimă}$ - volumul de soluție de enzimă (0,1 mL)

L - lungimea cuvei (cm)

3.18.2. Determinarea activității hidrolitice a lipazelor imobilizate

Pentru determinarea activității hidrolitice a lipazelor imobilizate s-au cântărit cu exactitate (1-5 mg) preparatele imobilizate, iar reacțiile s-au efectuat în tuburi Eppendorf de 2 mL la 37°C, timp de 10 min, sub agitare la 800 rpm (Thermomixer Confort, Eppendorf). Enzima a fost separată prin filtrare, iar absorbanta soluției a fost măsurată la 410 nm. Activitatea a fost determinată pe baza concentrației *p*-nitro-fenolului format în reacție.

Concentrația de *p*-nitro-fenol a fost determinată pe baza dreptei de etalonare prezentată în Figura 3.2, în domeniul de concentrații 0,005-0,2 mM.

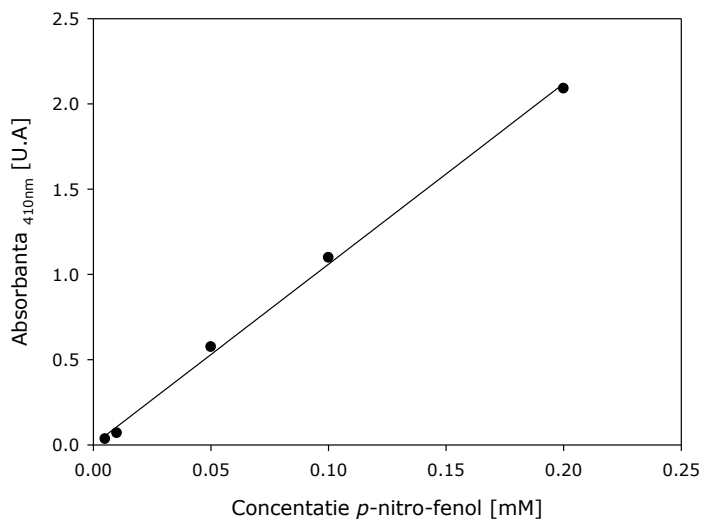


Figura 3.3. Dreapta de etalonare a *p*-nitro-fenolului

3.19. Sinteza biocatalitică a estolidelor

Reacțiile au fost efectuate utilizând lipaze native și imobilizate, la un raport enzimă/substrat de 50 U/mmol, la concentrații date de substrat (în intervalul 1-5 mM), într-un volum final de 1 mL. Reacțiile au fost efectuate la temperaturi cuprinse în intervalul 40°C-75°C, sub agitare la 350 rpm, timp de 24 ore. La sfârșitul reacției enzima a fost îndepărtată prin centrifugare (13.000 rpm, 3 min), iar amestecul de reacție a fost analizat prin GC-MS și MALDI-TOF MS.

3.20. Analiza MALDI-TOF MS

3.20.1. Analiza MALDI-TOF MS a estolidelor

Analiza prin spectrometrie de masă (MALDI-TOF MS) a estolidelor a fost efectuată cu modulul Ultraflex Workstation cu Flex Control și Flex Analysis (Bruker Daltonics, Germania), tensiune de 25 kV, folosind *trans*-2-[3-(4-*t*-butil-fenil)-2-metil-2-propenilidena]malononitril (DCTB) ca matrice și trifluoroacetat de potasiu (KTFA) ca agent de ionizare. 10 μL de probă au fost amestecate cu 10 μL de soluție matrice (40 mg/mL DCTB solubilizat în THF) și 3 μL de KTFA (5 mg/mL). Aproximativ 0,3 μL de amestec au fost aplicate pe placă și măsurate în modul pozitiv. Calibrarea s-a realizat cu soluții de polietilenglicol de diferite mase moleculare (600, 1000, 2000), iar datele au fost procesate cu pachetele software FlexControl și Flex Analysis (Bruker Daltonics, Germania).

3.20.1. Analiza MALDI-TOF MS a copolimerilor cu GL

Analiza prin spectrometrie de masă (MALDI-TOF MS) a copolimerilor ECL-GL și ECL-BL a fost efectuată utilizând sistemul Bruker BIFLEX III (Bruker Daltonik GmbH, Germany) la o tensiune de 20 kV, folosind acid dihidroxibenzoic (DHB) ca matrice și trifluoroacetat de sodiu (NaTFA) ca agent de ionizare. 10 μ L de probă (10 mg/mL) a fost amestecată cu 50 μ L de soluție matrice (20 mg/mL DHB solubilizat în MeOH/THF) și 5 μ L soluție de NaTFA (5 mg/mL). Aproximativ 0,3 μ L de amestec au fost aplicate pe placă și măsurate în modul pozitiv.

3.21. Sinteza enzimatică a copolimerilor hidroxi-acizilor grași cu ϵ -caprolactonă

Sinteza copolimerilor hidroxi-acizilor grași (HFA) cu ϵ -caprolactonă (ECL) s-a realizat la un raport molar ECL/HFA de 1:1, în domeniul de concentrație 30-100 mM, la un volum final de 2 mL, utilizând toluen ca și solvent și diferite lipaze, la un raport enzimă/substrat de 50 U/mmol. Reacțiile au fost efectuate în domeniul de temperatură 45°C-85°C, sub agitare magnetică la 350 rpm, timp de 24 h. La sfârșitul reacției enzima a fost separată prin centrifugare (13.000 rpm, 3 min) sau filtrare, iar amestecurile de reacție au fost analizate prin GC-MS și MALDI-TOF MS.

3.22. Polimerizarea în solvenți organici

ECL (0,445 mL, 4 mmol) și lipază din *Candida antarctica* B (50 mg, Novozyme 435) au fost adăugate peste gluconolactonă GL (0,356 g, 2 mmol) dizolvată în 1 mL solvent organic. Reacțiile au fost efectuate în sticlute de 4 mL, sub atmosferă de argon, agitare magnetică la 300 rpm și 80°C. Reacțiile au fost oprite prin filtrarea enzimei.

3.23. Polimerizarea fără solvent organic

La 0,356 g GL și 0,445 mL ECL, au fost adăugate lipaze imobilizate prin diferite metode, în cantități cuprinse între 50 și 100 mg. Reacțiile au fost efectuate în sticlute de 4 mL la 80°C, în atmosferă de argon. La sfârșitul reacției s-a adăugat 1 mL de tetrahidrofuran, iar enzima imobilizată și GL nereacționată au fost îndepărtate prin filtrare. Polimerul a fost obținut prin evaporarea solventului și uscare în vid la 60°C, peste noapte.

3.24. Pre-echilibrare la diferite valori ale activității apei

Materiile prime și lipaza imobilizată (Novozyme 435) au fost echilibrate cu soluții de sare saturate la temperatura de 25°C, în recipiente separate. Sărurile alese pentru acest studiu au fost MgCl_2 (a_w 0,225), K_2CO_3 (a_w 0,432), Na_2SO_4 (a_w 0,95) și K_2SO_4 (a_w 0,973). Echilibrarea s-a realizat peste noapte, înainte de începerea reacției.

3.25. Imobilizarea lipazei prin entrapare în matrici de sol-gel

Lipaza provenită din *Ca/B* a fost imobilizată prin metoda entrapării în sol-gel așa cum a fost descris anterior [189]. Într-o sticlă de 4 mL s-au introdus, 780 μ L soluție lipază, 200 μ L PEG 20000 (4%), 100 μ L NaF (1 M) și 200 μ L alcool izopropilic (agitare magnetică, 600 rpm), apoi s-au adăugat 6 mmol silani precursori. Amestecul rezultat a fost omogenizat la temperatura ambiantă până s-a observat formarea unui gel, care a fost menținut 24 ore la 4°C pentru polimerizare completă. Gelul vrac a fost spălat și uscat la temperatura camerei, așa cum este descris în altă parte [100] și s-a păstrat la 4°C până la utilizare.

3.26. Pre-solubilizarea δ -gluconolactonei

Pre-solubilizarea GL în co-monomerul ECL sau BL a fost efectuat pentru a crește conținutul de copolimer și pentru a diminua formarea homopolimerului în experimentele fără solvent. Amestecurile ECL:GL și BL:GL, la raporturi molare de la 1:1 până la 5:1, au fost preparate și incubate la 80°C sub agitare la 350 rpm. După 24 de ore s-a format o soluție limpede, în condițiile în care rapoartele molare au fost mai mari de 2:1 în cazul sistemului ECL:GL, respectiv 3:1 în cazul sistemului BL:GL. În toate experimentele de optimizare (prin elaborarea unui program experimental factorial) a fost realizată și această etapă de pre-solubilizare, iar reacțiile au fost inițiate prin adăugarea unei cantități adecvate de lipază.

3.27. Elaborarea unui program experimental factorial și evaluarea datelor

Pentru a evalua efectul a 3 variabile independente: temperatura, cantitatea de enzimă și raportul molar între monomeri asupra conținutului de copolimeri, a gradului de copolimerizare și asupra maselor moleculare medii M_w și M_n , s-a elaborat un program experimental factorial folosind pachetul Unscrambler 9.2 (CAMO Software AS) și metoda Box-Behnken (BBD). Amestecurile de reacție au fost analizate prin tehnica MALDI-TOF MS după separarea biocatalizatorului, iar parametrii au fost determinați pe baza spectrelor MALDI-TOF. Valorile calculate ale maselor moleculare medii M_w , au fost folosite ca și variabilă de răspuns pentru analiza ANOVA, pentru a stabili efectul celor trei variabile independente asupra M_w .

3.28. Analiza termică

3.28.1. Analiza termogravimetrică (TG)

Măsurătorile termogravimetrice s-au realizat utilizând sistemul TG 209 F1 Libra thermogravimetric analyzer (Netzsch, Germany), sub atmosferă de azot, cu viteză de încălzire de 10°C/min, în domeniul de temperatură 20°C-590°C.

3.28.2. Analiza de calorimetrie diferențială de baleiaj (DSC)

Analizele DSC au fost realizate utilizând aparatul DSC 204 F1 Phoenix differential scanning calorimeter (Netzsch, Germany), în atmosferă de azot, în domeniul de temperatură 20°C-600°C, cu viteză de încălzire de 10K/min.

3.29. Studiul reutilizării biocatalizatorului în reacțiile de copolimerizare a ϵ -caprolactonei cu δ -gluconolactonă

Activitatea lipazelor în cicluri repetate de sinteză a copolimerilor ECL cu GL a fost studiată la 80°C timp de 24h, la un raport molar ECL:GL=2:1. După fiecare ciclu de reacție, enzima imobilizată a fost separată prin filtrare și spălată cu amestec acetona:MeOH =1:1 și tetrahidrofuran, succesiv de 3 ori. După evaporarea solventului, enzima a fost utilizată într-un nou ciclu de reacție timp de 24 h. Producții de reacție au fost analizați prin spectrometrie MALDI-TOF MS.

3.30. Sinteza enzimatică a estolidelor utilizând o combinație de lipază și hidratază în sistem „one-pot”

Pentru reacțiile în sistem „one-pot” au fost utilizate două lipaze, din *Candida rugosa* (0,04-10 mg/mL), respectiv din *Pseudomonas fluorescens* (0,04-5 mg/mL), cât și OHază (0,2-2 mg/mL) și trioleină ca substrat (10 mM), iar ca mediu de reacție soluție tampon fosfat 20 mM 150 mM NaCl, pH 6,5. Amestecurile au fost incubate la 30°C, sub agitare la 1000 rpm timp de 24 h, respectiv 48 h. Reacțiile au fost oprite prin adăugare de HCl 2 N, iar producții de reacție au fost extrași de 3 ori cu un volum de diclormetan. Solventul a fost evaporat la 40°C iar substratul și producții de reacție au fost analizați prin GC-MS și MALDI-TOF MS.

3.31. Studiul influenței pH-ului asupra formării estolidelor acidului 10HSA

Pentru studiul influenței pH-ului reacțiile s-au efectuat utilizând două lipaze, din *P. fluorescens* (10 mg/mL), respectiv din *P. stutzeri* (15 mg/mL), și 10HSA ca și substrat (15 mM). Ca mediu de reacție s-au utilizat soluții tampon fosfat 20 mM, 150 mM NaCl, pH 4,0 și 6,5, respectiv soluție tampon 20 mM TRIS, 150 mM NaCl pH 8,0. Amestecurile de reacție au fost incubate la 40°C, respectiv 60°C, sub agitare la 1000 rpm timp de 24 h, respectiv 96 h. Reacțiile au fost oprite prin adăugare de HCl 2 N, iar producții de reacție au fost extrași de 3 ori cu un volum de diclormetan. Solventul a fost evaporat la 40°C iar substratul și producții de reacție au fost analizați prin GC-MS și MALDI-TOF MS.

4. Concluzii finale și contribuții originale

Teza de doctorat conține rezultatele cercetărilor experimentale privind sinteza enzimatică a unor noi biomateriale poliesterice utilizând substraturi naturale și sintetice în diferite combinații, caracterizarea în detaliu a acestora și evaluarea proprietăților termice. În cadrul studiilor realizate s-a urmărit evaluarea capacității lipazelor de a utiliza substraturile propuse și combinațiile acestora, dar și optimizarea reacțiilor investigate în vederea obținerii unor biomateriale noi, cu funcționalități diferite de cele ale materialelor cunoscute și utilizate în prezent.

Soluționarea obiectivelor tezei de doctorat prin cercetările experimentale realizate a condus la următoarele concluzii:

1. Stadiul actual al cunoașterii, prezentat în prima parte a tezei, a evidențiat următoarele aspecte legate de obținerea pe cale enzimatică a poliesterilor și stabilizarea enzimelor:

- Utilizarea polimerilor naturali sau sintetici funcționalizați prin inserarea unor noi segmente polimerice reprezintă o metodă promițătoare pentru obținerea de noi biomateriale cu aplicabilitate în domeniul medical.
- Resursele regenerabile reprezintă o sursă importantă de monomeri, care pot fi valorificați și pentru sinteza unor noi biomateriale.
- Există o necesitate evidentă pentru a dezvolta biocatalizatori mai robusți și mai stabili prin imobilizare pe suporturi solide, cu eficiență mărită în sinteza poliesterilor.
- Hidroxi-acizii reprezintă materii prime valoroase pentru sinteza enzimatică a estolidelor, cu aplicații în industria farmaceutică și alimentară.

2. Oleat hidratata din *Elizabethkingia meningoseptica* a fost stabilizată prin utilizarea unor aditivi polihidroxilici și prin imobilizare. Imobilizarea acestei enzime s-a realizat în premieră, prin selectarea metodei de imobilizare optime, compatibilă cu caracteristicile structurale ale enzimei și care a permis retenția cea mai bună a activității catalitice. S-a determinat profilul de temperatură și pH al celor mai eficiente preparate enzimatică și stabilitatea operațională în mai multe cicluri de reacție.

2.1. Oleat hidratata obținută din culturi de *Elizabethkingia meningoseptica* a fost purificată prin cromatografie de afinitate la un grad de puritate ridicat, demonstrat prin electroforeză pe gel de poliacrilamidă.

2.2. Dintre aditivii polihidroxilici testați, sorbitolul a avut cel mai important efect activator și stabilizator asupra oleat hidratatei.

2.3. Legarea covalentă s-a dovedit cea mai eficientă metodă de imobilizare, iar dintre suporturile testate utilizarea microparticulelor magnetice de chitosan a permis obținerea enzimei imobilizate cu cea mai mare activitate.

2.4. Oleat hidratataza imobilizată prin legare covalentă a fost mai stabilă pe un domeniu mai larg de pH și temperatură în comparație cu enzima nativă.

2.5. Preparatul imobilizat pentru care s-a utilizat un suport de macrocompozite magnetice de chitosan a avut o stabilitate termică remarcabilă, 65% din activitate fiind regăsită după incubare la 50°C, în condițiile în care enzima nativă a fost total inactivată.

2.6. Oleat hidratataza legată covalent a dovedit stabilitate operațională foarte bună, demonstrată de menținerea a 75% din valoarea inițială a activității după 6 cicluri de reacție, care va permite dezvoltarea unor procese biocatalitice la scară mai mare.

3. S-a realizat biotransformarea a patru hidroxiacizi grași: acidul 10-hidroxistearic, acidul 12-hidroxistearic, acidul 16-hidroxihexadecanoic și acidul ricinoleic în estolidele corespunzătoare, utilizând lipaze libere și imobilizate și a fost determinată specificitatea de substrat și selectivitatea diferitelor tipuri de lipaze pentru această reacție. Însemnătatea științifică a acestor rezultate rezidă atât în demonstrarea capacității lipazelor de a cataliza transformarea unui substrat neinvestigat până acum, acidul 10-hidroxistearic, cât și în posibilitatea de a dirija aceste direcții în sensul obținerii lactonelor sau estolidelor cu grad de polimerizare diferit.

3.1. Acidul 10-hidroxistearic a fost sintetizat prin biocataliză cu oleat hidratată și caracterizat prin metode spectroscopice care au confirmat structura și puritatea ridicată a compusului. Puritatea enantiomerică a fost demonstrată pe baza reacției de derivatizare cu acid (S)-mandelic combinată cu analiza RMN de înaltă performanță.

3.2. Hidroxi-acizii studiați au fost utilizați ca substraturi pentru 15 lipaze din diferite surse microbiene și animale. În mediu de toluen, conversiile cele mai ridicate (mai mari de 90%) s-au obținut pentru substratul C16, în timp ce pentru substraturile C18 conversiile nu au depășit 55%. Cu excepția lipazelor din *Pseudomonas*, care au favorizat formarea monolactonelor dar și a estolidelor cu grad de polimerizare de cel mult 4, produșii de reacție formați au fost de tipul monoestolidei sau dilactonei.

3.3. Structura produșilor de reacție a fost demonstrată prin spectroscopie ¹³C-RMN, demonstrându-se formarea legăturii esterice prin apariția unui semnal nou, corespunzător atomului de C din gruparea carbonil esterice.

3.4. Utilizarea solvenților organici ca mediu de reacție pentru sinteza estolidelor, completată de analiza MALDI-TOF MS a amestecurilor de reacție după 24 h, a permis identificarea estolidelor de tip pentamer și hexamer în cazul în care mediul de reacție utilizat a fost heptanul. Pe lângă efectul pozitiv asupra elongării catenei, solvenții mai nepolari au favorizat și obținerea unor valori mai ridicate ale conversiei.

3.5. Evaluarea mai multor enzime imobilizate disponibile comercial, care au prezentat activitate pentru toate cele 4 substraturi, a arătat că lipaza din *P. stutzeri* imobilizată prin înrețelare a avut eficiența catalitică cea mai mare.

3.6. Studiile de reutilizare a lipazelor imobilizate CLEA *P. stutzeri* și Novozyme 435, folosind ca substrat acidul 10-hidroxistearic, au demonstrat eficiența acestor preparate în mai multe cicluri de reacție, cu formarea monoestolidei ca produs unic în cazul preparatului Novozyme 435, respectiv a tetramerului/pentamerului în cazul CLEA *P. stutzeri*.

3.7. Stabilitatea termică a estolidelor a fost studiată prin termogravimetrie. Dintre cele 4 tipuri de estolide sintetizate, cel mai stabil s-a dovedit a fi derivatul acidului 16-hidroxihexadecanoic.

4. O nouă gamă de compuși oligomerici a fost obținută pe cale biocatalitică din hidroxi-acizi grași și ϵ -caprolactonă. Toți cei patru hidroxi-acizi studiați anteriori pentru sinteza estolidelor au fost utilizați cu succes în calitate de co-monomeri și s-au investigat principalii parametri care influențează reacția de copolimerizare. Analizele structurale MALDI-TOF MS și 2D RMN au demonstrat formarea produșilor urmăriți, care au fost caracterizați prin analiză termică.

4.1. Cei patru hidroxiacizi grași au fost utilizați cu succes ca și co-substrat în reacțiile de poliesterificare cu ϵ -caprolactonă. Analizele MALDI-TOF MS au demonstrat în toate cazurile formarea oligomerilor de ϵ -caprolactonă cu unități de hidroxiacid gras inserate.

4.2. Dintre cele 5 lipaze testate în toluen ca mediu de reacție (solvent în care toate materiile prime au fost solubile), cea mai eficientă a fost lipaza comercială Novozyme 435.

4.3. Analizele 2D RMN de tipul HMBC au permis confirmarea structurii de tip ABAB (conținând segmente alternante provenite din cei doi co-monomeri).

4.4. Stabilitatea termică a derivaților sintetizați a fost studiată prin termogravimetrie, iar rezultatele au indicat o stabilitate superioară a acestora în comparație cu estolidele corespunzătoare.

4.5. În cazul reacției dintre acidul 16-hidroxihexadecanoic și ϵ -caprolactonă s-a demonstrat că odată cu creșterea temperaturii de reacție cresc atât valorile maselor moleculare medii cât și conținutul relativ de copolimeri.

4.6. La reutilizarea biocatalizatorului Novozyme 435 în 4 cicluri de reacție au crescut valorile maselor moleculare medii, iar conținutul relativ de copolimer în produsul de reacție a fost în toate cazurile peste 80%.

5. Noi oligomeri având inserate segmente provenite dintr-un derivat de hidrat de carbon au fost sintetizați pe cale biocatalitică, prin copolimerizarea cu deschidere de ciclu a ϵ -caprolactonei și δ -gluconolactonei catalizată de lipaze. Poliesterii liniari și ciclici obținuți au fost analizați prin MALDI-TOF MS și RMN. Procesul a fost optimizat prin utilizarea unui program experimental factorial, care a arătat că cel mai important parametru este temperatura de reacție.

5.1. A fost demonstrată pentru prima dată posibilitatea de utilizare a δ -gluconolactonei ca și co-substrat alături de ϵ -caprolactonă, pentru obținerea pe cale enzimatică a unor copoliesteri liniari și ciclici.

5.2. Au fost studiați 7 solvenți organici sau combinații ale acestora cu intenția de a crește solubilizarea δ -gluconolactonei, care este un element cheie al procesului. Mediul de reacție optim pentru a favoriza creșterea maselor moleculare medii a fost amestecul toluen:piridină=10:1, iar cel mai ridicat conținut relativ de copolimer a fost obținut la utilizarea sistemului de solvenți DMSO:t-BuOH=1:4.

5.3. Studiul influenței conținutului de apă asupra formării produșilor de reacție a demonstrat că prezența apei în concentrații controlate favorizează formarea produșilor de tip copolimer, valoarea optimă a activității apei în sistemul de reacție inițial fiind 0,95.

5.4. Au fost testate 5 lipaze, cei mai eficienți biocatalizatori pentru această reacție fiind lipaza comercială Lipozyme TL și preparatul obținut în laborator prin entraparea în sol-gel a lipazei din *Candida antarctica* B, utilizând silanii precursori TMOS:3-NH₂PrTMOS în raport molar 1:1.

5.5. Formarea legăturii esterice dintre acidul 6-hidroxihexanoic (provenit din ϵ -caprolactonă) și acidul 2,3,4,5,6-pentahidroxi-caproic (provenit din δ -gluconolactonă) a fost demonstrată prin spectroscopie ¹H-¹H-COSY RMN.

5.6. Stabilitatea termică a produșilor de reacție a fost evaluată în comparație cu homopolimerul poli(ϵ -caprolactonă), observându-se pierderi de masă mai mari de 35% în domeniul 200°C-300°C, ceea ce indică o stabilitate mai scăzută a noului derivat.

5.7. Biocatalizatorul a fost reutilizat de 4 ori cu rezultate bune și pentru acest sistem de reacție, observându-se doar o ușoară scădere a maselor moleculare medii și a conținutului relativ de copoliesteri.

5.8. Efectul a 3 variabile independente (temperatura, cantitatea de enzimă și raportul molar al co-monomerilor) asupra masei moleculare gravimetrice a copolimerului a fost optimizat folosind un program experimental factorial, iar pe baza rezultatelor statistice s-a demonstrat că efectul global al celor 3 variabile alese este semnificativ și direct corelat.

6. Copolimerizarea cu deschidere de ciclu a β -butirolactonei și δ -gluconolactonei a condus la formarea unor oligomeri noi, liniari și ciclici, cu mase moleculare mai scăzute decât în cazul copolimerilor ϵ -caprolactonei. Procesul a fost și în acest caz optimizat cu ajutorul unui program experimental factorial, rezultatele demonstrând că influențele principalilor parametri ai reacției se manifestă în mod similar la diferite poliesterificări catalizate de lipaze

6.1. Au fost realizate primele sinteze care au demonstrat formarea de copoliesteri ai β -butirolactonei și δ -gluconolactonei pe cale enzimatică.

6.2. Reactivitatea ridicată a β -butirolactonei a fost confirmată prin conținutul mai mic de copolimer față de homopolimer și valorile mai scăzute ale maselor moleculare, datorate și reacțiilor de ciclizare ale speciilor prezente în amestecul de reacție.

6.3. Rezultatele indicate de parametrii statistici sunt în complementaritate cu rezultatele obținute pentru sistemul de reacție ϵ -caprolactonă/ δ -gluconolactonă și confirmă validitatea modelului factorial Box-Behnken Design pentru evaluarea efectelor parametrilor de reacție asupra maselor moleculare medii și compoziției relative a produsului de reacție.

6.4. Efectul inserării segmentelor de acid 2,3,4,5,6-pentahidroxi-caproic în catena hidrofobă a polihidroxibutiratului asupra stabilității termice a fost demonstrată prin analiză termică (TG și DSC), care au indicat o stabilitate mai scăzută a noilor poliesteri în comparație cu homopolimerul disponibil comercial.

6.5. Deși gradul de polimerizare este limitat de formarea produșilor ciclici și posibilele împiedicări sterice în etapa de elongare, produșii de reacție pot prezenta aplicabilitate în domeniul farmaceutic, alimentar sau medical.

7. Sinteza estolidelor a fost realizată în premieră din trioleină, printr-o succesiune de reacții enzimatică în sistem „one-pot”, folosind o combinație de lipază și oleat hidratat.

7.1. S-a demonstrat posibilitatea utilizării trioleinei ca substrat pentru lipază și oleat hidratat, în vederea sintezei estolidelor.

7.2. Cea de-a treia etapă a procesului combinat, sinteza estolidelor din acid 10-hidroxistearic catalizată de lipază, se poate realiza și în mediu apos și este favorizată de valori acide ale pH-ului și temperatură de reacție mai ridicată.

7.3. În sistemul „one-pot” studiat, formarea ca produs secundar a mono-estolidei nesaturate prin esterificarea acidului oleic cu acid 10-hidroxistearic este limitată de stabilitatea termică scăzută a oleat hidratatei.

7.4. Sistemul de reacție propus are eficiență de biotransformare ridicată și poate fi fezabil pentru valorificarea superioară a trioleinei din uleiurile vegetale.

CONTRIBUȚIILE ORIGINALE (REZULTATELE ȘTIINȚIFICE NOI)

I. Stabilizarea oleat hidratatei din *Elizabethkingia meningoseptica* prin două proceduri diferite, folosirea unor aditivi de tipul polioliilor, respectiv imobilizare.

1. Stabilirea celei mai eficiente metode de imobilizare oleat hidratat, legarea covalentă pe compozitul magnetic cu chitosan.

2. Demonstrarea creșterii stabilității oleat hidratatei pe un domeniu mai larg de pH și temperatură în urma imobilizării.

3. Realizarea unei stabilități operaționale foarte bune, regăsindu-se 75% din activitatea enzimei imobilizate după 6 cicluri de reacție.

II. Sintetiza și caracterizarea de noi estolide pe cale biocatalitică, utilizând hidroxiacizi grași naturali și sintetici și lipaze native și imobilizate din diferite surse.

4. Sinteza acidului 10-hidroxistearic din acid oleic, caracterizarea sa în detaliu prin metode spectroscopice și demonstrarea purității enantiomerice a produsului obținut pe cale enzimatică prin spectroscopie RMN.

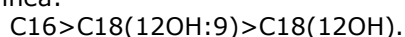
5. Demonstrarea posibilității de a utiliza acidul 10-hidroxistearic, acidul 12-hidroxistearic, acidul 16-hidroxihexadecanoic și acidul ricinoleic ca substraturi pentru lipaze pentru sinteza unor estolide noi și confirmarea structurii acestora pe baza spectrelor MALDI-TOF, RMN și FT-IR.

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

7. Demonstrarea favorizării sintezei mono- și macrolactonelor de lipazele din *Ps. fluorescens*, *Ps. stutzeri*, *Th. lanuginosus*.

8. Stabilirea condițiilor în care reacția este orientată spre elongare vs. lactonizare în funcție de temperatură, concentrația de substrat și valoarea log P a solventului.

9. Demonstrarea descreșterii selectivității lipazelor față de substraturile studiate în ordinea:



III. Sintetiza prin biocataliză și caracterizarea unor noi copoliesteri pe bază de ϵ -caprolactonă și hidroxi-acizi grași.

10. Demonstrarea eficienței catalitice a lipazelor libere și immobilizate pentru sinteza a 4 noi tipuri de copolimeri ai ϵ -caprolactonei cu hidroxi-acizi grași.

11. Selectarea preparatelor comerciale Lipozyme TL și Novozyme 435 ca cele mai eficiente lipaze pentru a obține creșterea maselor moleculare medii ai copolimerilor.

12. Stabilirea selectivității superioare a lipazelor față de co-substratul C16: OH(16) comparativ cu ceilalți hidroxi-acizi studiați, demonstrată de valorile maselor moleculare medii și de tipurile de produși formați.

13. Demonstrarea structurii produșilor de reacție prin spectrometrie MALDI-TOF MS și spectroscopie RMN.

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

IV. Sintetiza pe cale enzimatică și caracterizarea unor noi poliesteri obținuți din ϵ -caprolactonă/ β -butirolactonă și δ -gluconolactonă, prin deschidere de ciclu.

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

16. Demonstrarea prin RMN a structurii copolimerului conținând segmente inserate provenite din acidul 2,3,4,5,6-pentahidroxi-caproic.

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

17. Transformarea în premieră a trioleinei în monoestolidă nesaturată într-un sistem „one-pot” utilizând o combinație de lipază și oleat hidratază.

18. Stabilirea posibilității de realizare a reacțiilor individuale de sinteză a estolidelor prin cataliză cu lipază în mediu apos și a favorizării reacțiilor de elongare la valori acide de pH și temperaturi de reacție mai ridicate.

Rezultatele obținute în cadrul acestei teze au fost valorificate prin publicarea a 4 articole în reviste internaționale de prestigiu și impact ridicat în domeniu (Pure and Applied Chemistry, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Acta Biochimica Polonica), însumând un factor de impact cumulativ de 10.358 (considerând doar lucrările ca prim autor și publicate/acceptate spre publicare la data susținerii tezei) și au fost prezentate în cadrul a 8 conferințe internaționale în domeniul Biocatalizei și Biotehnologiilor industriale.

5. Bibliografie

- [1] K. Loos, *Biocatalysis in Polymer Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2011**.
- [2] H. Langeveld, J. Sanders, and M. Meeusen, *The biobased economy: biofuels, materials and chemicals in the post-oil Era*, *Routledge Repr. Ed.*, **2012**.
- [3] E. Scott, F. Peter, and Sanders, *Biomass in the manufacture of industrial products-the use of proteins and amino acids* *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2007**, 75(4), 751–62.
- [4] R. L. Reis, N. M. Neves, J. F. Mano, M. E. Gomes, A. P. Marques, and H. S. Azevedo, *Natural-based polymers for biomedical applications*, *Woodhead*, **2008**.
- [5] K. C. Nicolaou and H. J. Mitchell, *Adventures in carbohydrate chemistry: new synthetic technologies, chemical synthesis, molecular design, and chemical biology*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2001**, 40(3), 1576–1624.
- [6] S. Kakasi-Zsurka, **A. Todea**, A. But, C. Paul, C. G. Boeriu, C. Davidescu, L. Nagy, Á. Kuki, S. Kéki, and F. Péter, *Biocatalytic synthesis of new copolymers from 3-hydroxybutyric acid and a carbohydrate lactone*, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2011**, 71, 22–28.
- [7] R. Höfer, M. Selig, *Green Chemistry and Green Polymer Chemistry*, *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, Elsevier, **2012**, 10, 5-14, ISBN: 978-0-08-087862-1.
- [8] P. Anastas and N. Eghbali, *Green chemistry: principles and practice*, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39 (1), 301–312.
- [9] T. Iwata, *Biodegradable and bio-based polymers: future prospects of eco-friendly plastics*, *Angew Chem Int Ed Engl.*, **2015**, 54(11), 3210–3215.
- [10] A. K. Mohanty, M. Misra, and L. T. Drzal, *Sustainable Bio-Composites from renewable resources: Opportunities and challenges in the green materials world*, *J. Polym. Environ.*, **2002**, 10(1/2), 19–26.
- [11] L. Yu, K. Deanand, L. Li, *Polymer blends and composites from renewable resources*, *Prog. Polym. Sci.*, **2006**, 31(6), 576–602.
- [12] I. Vroman and L. Tighzert, *Biodegradable polymers*, *Materials (Basel)*, **2009**, 2(2), 307–344.
- [13] C. S. K. Reddy, R. Ghai, Rashmi, and V. C. Kalia, *Polyhydroxyalkanoates: an overview.*, *Bioresour. Technol.*, **2003**, 87(2), 137–146.
- [14] R. P. Babu, K. O'Connor, and R. Seeram, *Current progress on bio-based polymers and their future trends*, *Prog. Biomater.*, **2013**, 2(8), 1-16.
- [15] J. Becker and C. Wittmann, *Advanced biotechnology: metabolically engineered cells for the bio-based production of chemicals and fuels, materials, and health-care products*, *Angew. Rev.*, **2015**, 54(11), 3328–3350.
- [16] S. Khanna and A. K. Srivastava, *Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates*, *Process Biochem.*, **2005**, 40(2), 607–619.
- [17] J. M. Luengo, B. García, A. Sandoval, G. Naharro, and E. R. Olivera, *Bioplastics from microorganisms*, *Curr. Opin. Microbiol.*, **2003**, 6(3), 251–260.

- [18] J. K. Winkler, Applied biochemistry and biotechnology news, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **1981**, 6(3), 263–264.
- [19] L. Moire, E. Rezzonico, and Y. Poirier, Synthesis of novel biomaterials in plants, *J. Plant Physiol.*, **2003**, 160(7), 831–839.
- [20] J.A. Tao, R. J. Kazlauskas, Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2011**.
- [21] A. But, **A. Todea**, F. Peter, M. Medeleanu, Theoretical studies on modified polyhydroxycaprolactones *Ann. West Univ. Timișoara*, **2003**, 12(4), 1169–1176.
- [22] M. R. Calil, F. Gaboardi, M. A. G. Bardi, M. L. Rezende, and D. S. Rosa, Enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone) and cellulose acetate blends by lipase and α -amylase, *Polym. Test.*, **2007**, 26(2), 257–261.
- [23] S. Hermanová, R. Bálková, S. Voběrková, I. Chamradová, J. Omelková, L. Richtera, L. Mravcová, and J. Jančář, Biodegradation study on poly(ϵ -caprolactone) with bimodal molecular weight distribution, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2013**, 127, 4726–4735.
- [24] E. Stavila, G. O. R. Alberda van Ekenstein, A. J. J. Woortman, and K. Loos, Lipase-catalyzed ring opening copolymerization of ϵ -caprolactone and β -lactam, *Biomacromolecules*, **2014**, 15(1), 234–241.
- [25] D. N. Bikiaris, G. Z. Papageorgiou, D. S. Achilias, E. Pavlidou, and A. Stergiou, Miscibility and enzymatic degradation studies of poly(ϵ -caprolactone)/poly(propylene succinate) blends, *Eur. Polym. J.*, **2007**, 43(6), 2491–2503.
- [26] X. Cao, P. R. Chang, and M. a. Huneault, Preparation and properties of plasticized starch modified with poly(ϵ -caprolactone) based waterborne polyurethane, *Carbohydr. Polym.*, **2008**, 71(1), 119–125.
- [27] L. Chen, Y. Ni, X. Bian, X. Qiu, X. Zhuang, X. Chen, and X. Jing, A novel approach to grafting polymerization of ϵ -caprolactone onto starch granules, *Carbohydr. Polym.*, **2005**, 60(1), 103–109.
- [28] T. Gädda, J. Kylvä, J. Tuominen, H. Mikkonen, A. Laine, S. Peltonen, and J. Seppälä, Poly(ϵ -caprolactone)-grafted acetylated anhydroglucose oligomer by ring-opening polymerization-synthesis and characterization, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2006**, 100, 1633–1641.
- [29] N. Stanley, G. Bucataru, Y. Miao, A. Favrelle, M. Bria, F. Stoffelbach, P. Woisel, and P. Zinck, Bronsted acid-catalyzed polymerization of ϵ -caprolactone in water: A mild and straightforward route to poly(ϵ -caprolactone)-graft-water-soluble polysaccharides, *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, **2014**, 52(15), 2139–2145.
- [30] P. Dijkstra and J. Feijen, Synthesis of biodegradable polyesteramides with pendant functional groups, *Die Makromol. Chemie*, **1992**, 193(11), 2713–2730.
- [31] T. H. Anh Nguyen and V. C. Nguyen, Formation of nanoparticles in aqueous solution from poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone), *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, **2010**, 1, 1–5.
- [32] L. Li, F. Meng, Z. Zhong, D. Byelov, W. H. De Jeu, and J. Feijen, Morphology of a highly asymmetric double crystallizable poly(ϵ -caprolactone-*b*-ethylene oxide) block copolymer, *J. Chem. Phys.*, **2007**, 126, 1–7.
- [33] H. Bramfeldt, P. Sarazin, and P. Vermette, Bone tissue engineering with novel rhBMP2-PLLA composite scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2007**, 81(4), 771–780.

- [34] L. Tan, S. Maji, C. Mattheis, Y. Chen, and S. Agarwal, Antimicrobial Hydantoin-grafted Poly(ϵ -caprolactone) by Ring-opening Polymerization and Click Chemistry, *Macromol. Biosci.*, **2012**, 12, 1721–1730.
- [35] Z. Zhao, L. Yang, Y. Hu, Y. He, J. Wei, and S. Li, Enzymatic degradation of block copolymers obtained by sequential ring opening polymerization of L-lactide and ϵ -caprolactone, *Polym. Degrad. Stab.*, **2007**, 92(10), 1769–1777.
- [36] S. Lenglet, S. Li, and M. Vert, Lipase-catalysed degradation of copolymers prepared from ϵ -caprolactone, *Polym. Degrad. Stab.*, **2009**, 94(4), 688–692.
- [37] M. H. Huang, S. Li, and M. Vert, Synthesis and degradation of PLA–PCL–PLA triblock copolymer prepared by successive polymerization of ϵ -caprolactone and dl-lactide, *Polymer (Guildf.)*, **2004**, 45(26), 8675–8681.
- [38] T. Jiang, F. He, and R. X. Zhuo, Synthesis, characterization and enzymatic degradation of novel biodegradable copolymers of 5-allyloxy-1,3-dioxan-2-one with ϵ -caprolactone, *Polym. Degrad. Stab.*, **2013**, 98(1), 325–330.
- [39] S. Zhou, X. Deng, and H. Yang, Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) block copolymers: Characterization and their use as drug carriers for a controlled delivery system, *Biomaterials*, **2003**, 24, 3563–3570.
- [40] F. Majoum-Mbe, E. Smolensky, P. Lönnecke, D. Shpasser, M. S. Eisen, and E. Hey-Hawkins, Polymerisations of ϵ -caprolactone and β -butyrolactone with Zn-, Al- and Mg-based organometallic complexes, *J. Mol. Catal. A Chem.*, **2005**, 240, 91–98.
- [41] F. Barbato, M. I. La Rotonda, G. Maglio, R. Palumbo, and F. Quaglia, Biodegradable microspheres of novel segmented poly(ether-ester-amide)s based on poly(ϵ -caprolactone) for the delivery of bioactive compounds, *Biomaterials*, **2001**, 22(11), 1371–1378.
- [42] L. Liu, Y. Li, Y. E. Fang, and L. Chen, Microwave-assisted graft copolymerization of ϵ -caprolactone onto chitosan via the phthaloyl protection method, *Carbohydr. Polym.*, **2005**, 60(3), 351–356.
- [43] C. Liu, Z. Qian, Y. Gu, L. Fan, J. Li, G. Chao, W. Jia, and M. Tu, Synthesis, characterization, and thermal properties of biodegradable aliphatic copolyester based on ϵ -caprolactone, adipic acid, and 1,6-hexanediol, *Mater. Lett.*, **2006**, 60(1), 31–38.
- [44] A. Cretu, R. Gattin, L. Brachais, and D. Barbier-Baudry, Synthesis and degradation of poly (2-hydroxyethyl methacrylate)-graft-poly(ϵ -caprolactone) copolymers, *Polym. Degrad. Stab.*, **2004**, 83, 399–404.
- [45] H. Cho, D. Chung, and A. Jeongho, Poly(D,L-lactide-ran-epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide-ran-epsilon-caprolactone) as parenteral drug-delivery systems, *Biomaterials*, **2004**, 25(17), 3733–3742.
- [46] R. Shi and H. M. Burt, Amphiphilic dextran-graft-poly(ϵ -caprolactone) films for the controlled release of paclitaxel, *Int. J. Pharm.*, **2004**, 271(1–2), 167–179.
- [47] K. Kanawung, K. Panitchanapan, S. Puangmalee, W. Utok, N. Kreuaongarjnukool, R. Rangkupan, C. Meechaisue, and P. Supaphol, Preparation and Characterization of Polycaprolactone/Diclofenac Sodium and Poly(vinyl alcohol)/Tetracycline Hydrochloride Fiber Mats and Their Release of the Model Drugs, *Polym. J.*, **2007**, 39, 369–378.
- [48] C. Damgé, P. Maincent, and N. Ubrich, Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats, *J. Control. Release*, **2007**, 117(2), 163–70.

- [49] S. Papadimitriou and D. Bikiaris, Novel self-assembled core-shell nanoparticles based on crystalline amorphous moieties of aliphatic copolyesters for efficient controlled drug release, *J. Control. Release*, **2009**, 138(2), 177–184.
- [50] S. Sahoo, A. Sasmal, D. Sahoo, and P. Nayak, Synthesis and Characterization of Chitosan- Polycaprolactone Blended with Organoclay for Control Release of Doxycycline, *J. of Applied Polymer Sci.*, **2010**, 118(6), 3167–3175.
- [51] D. Vijaya Ramesh, Comparison of oil-in-oil, water-in-oil-in-water and melt encapsulation techniques for the preparation of controlled release B12 poly(ϵ -caprolactone) microparticles, *Trends Biomater. Artif. Organs*, **2009**, 23, 21–33.
- [52] M. Petitti, A. A. Barresi, and M. Vanni, Controlled release of vancomycin from PCL microcapsules for an ophthalmic application, *Chem. Eng. Res. Des.*, **2009**, 87(6), 859–866.
- [53] J. C. Jeong, J. Lee, and K. Cho, Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres, *J. Control. Release*, **2003**, 92(3), 249–258.
- [54] H. W. Kim, J. C. Knowles, and H. E. Kim, Hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery, *Biomaterials*, **2004**, 25(7–8), 1279–1287.
- [55] D. B. Shenoy and M. M. Amiji, Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer, *Int. J. Pharm.*, **2005**, 293(1–2), 261–270.
- [56] E. Luong-Van, L. Grondahl, K. N. Chua, K. W. Leong, V. Nurcombe, and S. M. Cool, Controlled release of heparin from poly(epsilon-caprolactone) electrospun fibers, *Biomaterials*, **2006**, 27(9), 2042–2050.
- [57] H. I. Chang, Y. C. Lau, C. Yan, and A. G. A. Coombes, Controlled release of an antibiotic, gentamicin sulphate, from gravity spun polycaprolactone fibers, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2008**, 84(1), 230–237.
- [58] M. R. Williamson, H. I. Chang, and A. G. A. Coombes, Gravity spun polycaprolactone fibres: controlling release of a hydrophilic macromolecule (ovalbumin) and a lipophilic drug (progesterone), *Biomaterials*, **2004**, 25(20), 5053–5060.
- [59] S. Kobayashi, Recent developments in lipase-catalyzed synthesis of polyesters, *Macromol. Rapid Commun.*, **2009**, 30, 237–266.
- [60] J. Zhang, H. Shi, D. Wu, Z. Xing, A. Zhang, Y. Yang, and Q. Li, Recent developments in lipase-catalyzed synthesis of polymeric materials, *Process Biochem.*, **2014**, 49(14), 797–806.
- [61] R. A. Gross, A. Kumar, and B. Kalra, Polymer synthesis by in vitro enzyme catalysis, *Chem. Rev.*, **2001**, 101(7), 2097–2124.
- [62] M. Kapoor and M. N. Gupta, Lipase promiscuity and its biochemical applications, *Process Biochem.*, **2012**, 47(4), 555–569.
- [63] M. B. Ansorge-Schumacher and O. Thum, Immobilised lipases in the cosmetics industry, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42(15), 6475–6490.
- [64] M. Matori, T. Asahara, and Y. Ota, Reaction conditions influencing positional specificity index (PSI) of microbial lipases, *J. Ferment. Bioeng.*, **1991**, 72(6), 413–415.
- [65] J. Pleiss, M. Fischer, and R. D. Schmid, Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site, *Chem. Phys. Lipids*, **1998**, 93(1–2), 67–80.

- [66] L. Ragupathy, U. Ziener, R. Dyllick-Brenzinger, B. Von Vacano, and K. Landfester, Enzyme-catalyzed polymerizations at higher temperatures: Synthetic methods to produce polyamides and new poly(amide-co-ester)s, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2012**, 76, 94–105.
- [67] A. Halldorsson, B. Kristinsson, and G. G. Haraldsson, Lipase selectivity toward fatty acids commonly found in fish oil, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2004**, 106(2), 79–87.
- [68] C. H. Lee and K. L. Parkin, Comparative fatty acid selectivity of lipases in esterification reactions with glycerol and diol analogues in organic media *Biotechnol. Prog.*, **2000**, 16(3), 372–377.
- [69] P. Tielmann, H. Kierkels, A. Zonta, A. Ilie, and M. T. Reetz, Increasing the activity and enantioselectivity of lipases by sol-gel immobilization: further advancements of practical interest, *Nanoscale*, **2014**, 6, 6220–6228.
- [70] I. Chang, I. Kim, S. Kang, C. T. Hou, and H. Kim, Production of 7,10-dihydroxy-8 (E)-octadecenoic acid from triolein via lipase induction by *Pseudomonas aeruginosa PR3*, *Appl Microbiol Biotechnol*, **2007**, 8, 301–306.
- [71] J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, and T. A. Jones, The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*, *Structure*, **1994**, 2(4), 293–308.
- [72] P. S. Kobayashi, H. Uyama, Enzymatic Polymerization to Polyesters, **2011**, 373–379.
- [73] E. Rubio, A. Fernandez-Mayorales, and A. M. Klibanov, Effect of the solvent on enzyme regioselectivity, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113(2), 695–696.
- [74] F. Terradas, M. Teston-Henry, P. A. Fitzpatrick, and A. M. Klibanov, Marked dependence of enzyme prochiral selectivity on the solvent, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115(2), 390–396.
- [75] D. Spickermann, S. Kara, I. Barackov, F. Hollmann, U. Schwaneberg, P. Duenkelmann, and C. Leggewie, Alcohol dehydrogenase stabilization by additives under industrially relevant reaction conditions, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2014**, 103,24–28.
- [76] C. Ó'Fágáin, Enzyme stabilization—recent experimental progress, *Enzyme Microb. Technol.*, **2003**, 33(2–3), 137–149.
- [77] T. Jesionowski, J. Zdarta, and B. Krajewska, Enzyme immobilization by adsorption: A review, *Adsorption*, **2014**, 20, 801–821.
- [78] W. hua Yu, M. Fang, D. shen Tong, P. Shao, T. ning Xu, and C. hui Zhou, Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hexagonal mesoporous silicas and selective esterification in nonaqueous medium, *Biochem. Eng. J.*, **2013**, 70, 97–105.
- [79] H. Gustafsson, E. M. Johansson, A. Barrabino, M. Odén, and K. Holmberg, Immobilization of lipase from *Mucor miehei* and *Rhizopus oryzae* into mesoporous silica--the effect of varied particle size and morphology, *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **2012**, 100, 22–30.
- [80] A. Salis, M. F. Casula, M. S. Bhattacharyya, M. Pinna, V. Solinas, and M. Monduzzi, Physical and Chemical Lipase Adsorption on SBA-15: Effect of Different Interactions on Enzyme Loading and Catalytic Performance *ChemCatChem*, **2010**, 2(3), 322–329.
- [81] P. Torres, D. Reyes-Duarte, N. López-Cortés, M. Ferrer, A. Ballesteros, and F. J. Plou, Acetylation of vitamin E by *Candida antarctica* lipase B immobilized on different carriers, *Process Biochem.*, **2008**, 43(2), 145–153.

- [82] D. T. Tran, C. L. Chen, and J. S. Chang, Immobilization of *Burkholderia sp.* lipase on a ferric silica nanocomposite for biodiesel production, *J. Biotechnol.*, **2012**, 158(3), 112–119.
- [83] J. Brem, M. C. Turcu, C. Paizs, K. Lundell, M. Tos, F. Irimie, and L. T. Kanerva, Immobilization to improve the properties of *Pseudomonas fluorescens* lipase for the kinetic resolution of 3-aryl-3-hydroxy esters, *Process Biochem.*, **2012**, 47(1), 119–126.
- [84] M. Ashjari, M. Mohammadi, and R. Badri, Chemical amination of *Rhizopus oryzae* lipase for multipoint covalent immobilization on epoxy-functionalized supports: Modulation of stability and selectivity, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2015**, 115, 128–134.
- [85] X. Y. Wang, X. P. Jiang, Y. Li, S. Zeng, and Y. W. Zhang, Preparation Fe₃O₄@chitosan magnetic particles for covalent immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2015**, 75, 44–50.
- [86] A. Bukhari, A. Idris, M. Atta, and T. C. Loong, Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on nanopolystyrene and its application to microwave-assisted esterification" *Chinese J. Catal.*, **2014**, 35(9), 1555–1564.
- [87] Y. T. Zhu, X. Y. Ren, Y. M. Liu, Y. Wei, L. Sen Qing, and X. Liao, Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on carboxyl-activated magnetic nanoparticles: Characterization and application for enzymatic inhibition assays, *Mater. Sci. Eng. C*, **2014**, 38, 278–285.
- [88] S. Ghasemi, M. Heidary, M. A. Faramarzi, and Z. Habibi, Immobilization of lipase on Fe₃O₄/ZnO core/shell magnetic nanoparticles and catalysis of Michael-type addition to chalcone derivatives, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2014**, 100, 121–128.
- [89] D. S. Rodrigues, A. A. Mendes, W. S. Adriano, L. R. B. Gonçalves, and R. L. C. Giordano, Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2008**, 51, 100–109.
- [90] J. C. Santos, A. V. Paula, G. F. M. Nunes, and H. F. de Castro, *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilization on polysiloxane-polyvinyl alcohol composite chemically modified with epichlorohydrin, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2008**, 52–53, 49–57.
- [91] A. Aires-Trapote, P. Hoyos, A. R. Alcántara, A. Tamayo, J. Rubio, A. Rumero, and M. J. Hernáiz, Covalent Immobilization of *Pseudomonas stutzeri* Lipase on a Porous Polymer: An Efficient Biocatalyst for a Scalable Production of Enantiopure Benzoin Esters under Sustainable Conditions" *Org. Process Res. Dev.*, **2015**, p. DOI: 10.1021/op500326k.
- [92] S. W. Chang, J. F. Shaw, K. H. Yang, S. F. Chang, and C. J. Shieh, Studies of optimum conditions for covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(gamma-glutamic acid) by RSM, *Bioresour. Technol.*, **2008**, 99(8), 2800–2805.
- [93] J. Wang, G. Zhao, L. Jing, X. Peng, and Y. Li, Facile self-assembly of magnetite nanoparticles on three-dimensional graphene oxide–chitosan composite for lipase immobilization, *Biochem. Eng. J.*, **2015**, 98, 75–83.
- [94] G. Cai, H. Jiang, Z. Chen, K. Tu, L. Wang, and K. Zhu, Synthesis, characterization and self-assemble behavior of chitosan-O-poly(ϵ -caprolactone), *Eur. Polym. J.*, **2009**, 45(6), 1674–1680.
- [95] E. Górecka and M. Jastrzębska, Immobilization Techniques And Biopolymer Carriers–A Review, *Biotechnol. Food Sci.*, **2011**, 75(1), 65 –86.

- [96] B. Krajewska, Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme Microb. Technol.*, **2004**, 35(2-3), 126-139.
- [97] Y. Asanomi, H. Yamaguchi, M. Miyazaki, and H. Maeda, Enzyme-immobilized microfluidic process reactors, *Molecules*, **2011**, 16, 6041-6059.
- [98] D. Brady and J. Jordaan, Advances in enzyme immobilisation, *Biotechnol. Lett.*, **2009**, 31(11), 1639-1650.
- [99] D. H. Zhang, L. X. Yuwen, and L. J. Peng, Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme, *J. Chem.*, **2013**, 2013, 1-7.
- [100] A. Ursoiu, C. Paul, T. Kurtán, and F. Péter, Sol-gel entrapped *Candida antarctica* lipase B - A biocatalyst with excellent stability for kinetic resolution of secondary alcohols, *Molecules*, **2012**, 17(11), 13045-13061.
- [101] R. A. Sheldon and S. van Pelt, Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42(15), 6223-6235.
- [102] M. B. Frampton, T. R. B. Jones, and P. M. Zelisko, Cyclotetrasiloxane frameworks for the chemoenzymatic synthesis of oligoesters, *RSC Adv.*, **2015**, 5(3), 1999-2008.
- [103] H. Öztürk Düşkünkörür, E. Pollet, V. Phalip, Y. Güvenilir, and L. Avérous, Lipase catalyzed synthesis of polycaprolactone and clay-based nanohybrids, *Polym. (United Kingdom)*, **2014**, 55(7), 1648-1655.
- [104] S. Ortega, M. F. Máximo, M. C. Montiel, M. D. Murcia, G. Arnold, and J. Bastida, Esterification of polyglycerol with polycondensed ricinoleic acid catalysed by immobilised *Rhizopus oryzae* lipase, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **2013**, 36(9), 1291-1302.
- [105] D. Omay and Y. Guvenilir, Synthesis and characterization of poly(d,l-lactic acid) via enzymatic ring opening polymerization by using free and immobilized lipase, *Biocatal. Biotransformation*, **2013**, 31(3), 132-140.
- [106] Y. Poojari, J. S. Beemat, and S. J. Clarson, Thermal properties, recovery, and reuse of lipase B from *Candida antarctica* immobilized on macroporous acrylic resin particles, *Polym. Bull.*, **2013**, 70, 1543-1552.
- [107] M. Mena, A. López-Luna, K. Shirai, A. Tecante, M. Gimeno, and E. Bárzana, Lipase-catalyzed synthesis of hyperbranched poly-l-lactide in an ionic liquid, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **2013**, 36, 383-387.
- [108] K. A. Barrera-Rivera and A. Martínez-Richa, Syntheses and Characterization of Aliphatic Polyesters via *Yarrowia lipolytica* Lipase Biocatalysis, *Green Polym. Chem. Biocatal. Mater. II*, **2013**, chapter 5, 59-68.
- [109] A. Kazariya and S. Matsumura, Enzymatic synthesis and crosslinking of novel high molecular weight polyepoxyricinoleate, *Polymers (Basel)*, **2012**, 4(1), 486-500.
- [110] Y. Yang, Y. Ge, H. Zhao, W. Shi, and Q. Li, Lipase-catalyzed synthesis of poly(ϵ -caprolactone) and characterization of its solid-state properties, *Biocat. and Biotransf.*, **2011**, 29(6), 337-343.
- [111] S. Bhatia, A. Mohr, D. Mathur, V. S. Parmar, R. Haag, and A. K. Prasad, Biocatalytic route to sugar-PEG-based polymers for drug delivery applications, *Biomacromolecules*, **2011**, 12(10), 3487-3498.
- [112] G. Sandoval, I. Rivera, K. A. Barrera-Rivera, and A. Martínez-Richa, Biopolymer synthesis catalyzed by tailored lipases, *Macromol. Symp.*, **2010**, 289, 135-139.
- [113] R. García-Arrazola, D. A. López-Guerrero, M. Gimeno, and E. Bárzana, Lipase-catalyzed synthesis of poly-l-lactide using supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids*, **2009**, 51(2), 197-201.

- [114] Y. Poojari and S. J. Clarson, Lipase-Catalyzed Synthesis and Properties of Silicone Aromatic Polyesters and Silicone Aromatic Polyamides, *Macromolecules*, **2010**, 43(10), 4616–4622.
- [115] Hou Jingwen and Guo Shengrong, Lipase-catalysed synthesis and properties of thiol end-functionalized polycaprolactone and poly(ethylen glycol)-b-polycaprolactone, *Acta Polym. Sin.*, **2009**, 8, 796–802.
- [116] M. Hans, H. Keul, and M. Moeller, Ring-opening polymerization of DD-lactide catalyzed by Novozyme 435, *Macromol. Biosci.*, **2009**, 9(3), 239–247.
- [117] Y. Poojari, A. S. Palsule, M. Cai, S. J. Clarson, and R. A. Gross, Synthesis of organosiloxane copolymers using enzymatic polyesterification, *Eur. Polym. J.*, **2008**, 44(12), 4139–4145.
- [118] Bodalo, J. Bastida, M. F. Máximo, M. C. Montiel, M. Gómez, and M. D. Murcia, Production of ricinoleic acid estolide with free and immobilized lipase from *Candida rugosa*, *Biochem. Eng. J.*, **2008**, 39(3), 450–456.
- [119] H. Ebata, K. Toshima, and S. Matsumura, Lipase-catalyzed synthesis and curing of high-molecular-weight polyricinoleate, *Macromol. Biosci.*, **2007**, 7(6), 798–803.
- [120] K. A. Distel, G. Zhu, and P. Wang, Biocatalysis using an organic-soluble enzyme for the preparation of poly(lactic acid) in organic solvents, *Bioresour. Technol.*, **2005**, 96(5), 617–623.
- [121] S. Skaria, M. Smet, and H. Frey, Enzyme-catalyzed synthesis of hyperbranched aliphatic polyesters, *Macromol. Rapid Commun.*, **2002**, 23(4), 292–296.
- [122] Y. Yu, D. Wu, C. Liu, Z. Zhao, Y. Yang, and Q. Li, Lipase / esterase-catalyzed synthesis of aliphatic polyesters via polycondensation: A review, **2012**, 47(7), 1027–1036.
- [123] S. Kobayashi and A. Makino, Enzymatic polymer synthesis: an opportunity for green polymer chemistry, *Chem. Rev.*, **2009**, 109(11), 5288–5353.
- [124] W. Liu, F. Wang, T. Tan, and B. Chen, Lipase-catalyzed synthesis and characterization of polymers by cyclodextrin as support architecture, *Carbohydr. Polym.*, **2013**, 92(1), 633–640.
- [125] S. Kobayashi, Lipase-catalyzed polyester synthesis- a green polymer chemistry, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.*, **2010**, 86(4), 338–365.
- [126] G. Ceccorulli, M. Scandola, A. Kumar, B. Kalra, and R. A. Gross, Cocrystallization of random copolymers of omega-pentadecalactone and epsilon-caprolactone synthesized by lipase catalysis, *Biomacromolecules*, **2005**, 6(2), 902–907.
- [127] A. Kumar, B. Kalra, A. Dekhterman, and R. A. Gross, efficient ring-opening polymerization and copolymerization of ϵ -caprolactone and ω -pentadecalactone catalyzed by *Candida antarctica* lipase B, *Macromolecules*, **2000**, 33, 6303–6309.
- [128] S. Kobayashi, H. Uyama, S. Namekawa, and H. Hayakawa, enzymatic ring-opening polymerization and copolymerization of 8-octanolide by lipase catalyst, *Macromolecules*, **1998**, 31(17), 5655–5659.
- [129] H. Kikuchi, H. Uyama, and S. Kobayashi, Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of substituted lactones, *Polym. J.*, **2002**, 34(11), 835–840.
- [130] H. Uyama, K. Takeya, and S. Kobayashi, Synthesis of polyesters by enzymatic ring-opening copolymerization using lipase catalyst, *Proc. Japan Acad. Ser. B-Physical Biol. Sci.*, **1993**, 69(8), 203–207.

- [131] A. Kumar and R. A. Gross, *Candida antartica* lipase B catalyzed polycaprolactone synthesis: effects of organic media and temperature, *Biomacromolecules*, **2000**, 1(1), 133–138.
- [132] J. Hu, W. Gao, A. Kulshrestha, R. A. Gross, V. Re, M. Recei, and V. August, Weet polyesters: lipase-catalyzed condensation-polymerizations of alditols, *Macromolecules*, **2006**, 39 (20), 6789–6792.
- [133] H. Dong, H. D. Wang, S. G. Cao, and J. C. Shen, Lipase-catalyzed polymerization of lactones and linear hydroxyesters, *Biotechnol. Lett.*, **1998**, 20(10), 905–908.
- [134] J. Wahlberg, P. V. Persson, T. Olsson, E. Hedenstro, and T. Iversen, Structural characterization of a lipase-catalyzed copolymerization of ϵ -caprolactone and D,L-lactide, *Biomacromolecules*, **2003**, 4, 1068–1071.
- [135] Y. Waché, M. Aguedo, A. Choquet, L. Ian, J. Nicaud, J. Belin, and I. A. N. L. Gatfield, Role of β -oxidation enzymes in γ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*, **2001**, 67(12), 5700–5704.
- [136] J. H. Hong, H. J. Jeon, J. H. Yoo, W. R. Yu, and J. H. Youk, Synthesis and characterization of biodegradable poly(ϵ -caprolactone-co- β -butyrolactone)-based polyurethane, *Polym. Degrad. Stab.*, **2007**, 92(7), 1186–1192.
- [137] S. Li, M. Pignol, F. Gasc, and M. Vert, Synthesis, Characterization, and Enzymatic Degradation of Copolymers Prepared from ϵ -caprolactone and β -butyrolactone, *Macromolecules*, **2004**, 37, 9798–9803.
- [138] F. Faÿ, E. Renard, V. Langlois, I. Linossier, and K. Vallée-Rehel, Development of poly(ϵ -caprolactone-co-l-lactide) and poly(ϵ -caprolactone-co- δ -valerolactone) as new degradable binder used for antifouling paint, *Eur. Polym. J.*, **2007**, 43(11), 4800–4813.
- [139] R. Marcilla, M. Degeus, D. Mecerreyes, C. Duxbury, C. Koning, and a Heise, Enzymatic polyester synthesis in ionic liquids, *Eur. Polym. J.*, **2006**, 42(6), 1215–1221.
- [140] K. A. Barrera-Rivera, A. Martinez-Richa, One-Pot biocatalytic synthesis of sugar based poly (ϵ -caprolactone), *Macromol. Symp.*, **2009**, 283–284, 144–151.
- [141] K. S. Bisht, F. Deng, R. A. Gross, D. L. Kaplan, G. Swift, T. U. V, C. Street, H. Company, S. House, and V. Pennsylv, Ethyl glucoside as a multifunctional initiator for enzyme-catalyzed regioselective lactone ring-opening polymerization, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120(7), 1363–1367.
- [142] H. K. H. Kim and C. T. Hou, Biodegradable photo-crosslinked thin polymer networks based on vegetable oil hydroxy fatty acids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2010**, 87, 1451–1459.
- [143] J. O. Metzger and U. Bornscheuer, Lipids as renewable resources: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2006**, 71(1), 13–22.
- [144] K. Kim and D. Oh, Production of hydroxy fatty acids by microbial fatty acid-hydroxylation enzymes, *Biotechnol. Adv.*, **2013**, 31(8), 1473–1485.
- [145] M. Firdaus, M. A. R. Meier, U. Biermann, and J. O. Metzger, Renewable copolymers derived from castor oil and limonene, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2014**, 116(1), 31–36.
- [146] B. S. Kim, H. R. Kim, and C. T. Hou, Effect of surfactant on the production of oxygenated unsaturated fatty acids by *Bacillus megaterium* ALA2, *N. Biotechnol.*, **2010**, 27(1), 33–37.

- [147] V. K. Bajpai, H. R. Kim, C. T. Hou, and S. C. Kang, Bioconverted products of essential fatty acids as potential antimicrobial agents, *N. Biotechnol.*, **2009**, 26(3-4), 122–130.
- [148] C. T. Hou, Biotechnology for fats and oils: new oxygenated fatty acids, *N. Biotechnol.*, **2009**, 26(1-2), 1–10.
- [149] G. A. Burdock, I. G. Carabin, and J. C. Griffiths, Toxicology and pharmacology of sodium ricinoleate, *Food Chem. Toxicol.*, **2006**, 44(10), 1689–1698.
- [150] N. Santhanam, M. Balu, and S. Sreevatsan, Comprehensive Castor Oil Report **2008**, <http://www.castoroil.in/>, accesat în 12.02.2013.
- [151] U. Biermann, U. Bornscheuer, M. A. R. Meier, J. O. Metzger, and H. J. Schäfer, Oils and fats as renewable raw materials in chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2011**, 50(17), 3854–3871.
- [152] T. Itoh, L. Fairall, K. Amin, Y. Inaba, A. Szanto, B. L. Balint, L. Nagy, K. Yamamoto, and J. W. R. Schwabe, Structural basis for the activation of PPAR γ by oxidized fatty acids, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2008**, 15(9), 924–931.
- [153] I. Shureiqi, W. Jiang, X. Zuo, Y. Wu, J. B. Stimmel, L. M. Leesnitzer, J. S. Morris, H. Z. Fan, S. M. Fischer, and S. M. Lippman, The 15-lipoxygenase-1 product 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid down-regulates PPAR- δ to induce apoptosis in colorectal cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2003**, 100(17), 9968–9973.
- [154] J. Vidal-Mas, M. Busquets, and A. Manresa, Cloning and expression of a lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* 42A2, *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.*, **2005**, 87(3), 245–251.
- [155] S. Kandel, V. Sauveplane, A. Olry, L. Diss, I. Benveniste, and F. Pinot, Cytochrome P450-dependent fatty acid hydroxylases in plants, *Phytochem. Rev.*, **2006**, 5, 359–372.
- [156] S. H. Heo, C. T. Hou, and B. S. Kim, Production of oxygenated fatty acids from vegetable oils by *Flavobacterium* sp. strain DS5, *N. Biotechnol.*, **2009**, 26(1-2), 105–108.
- [157] K. Y. Baek, H. R. Sohn, C. T. Hou, and H. R. Kim, Production of a novel 9,12-dihydroxy-10(E)-eicosenoic acid from eicosenoic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3., *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, 59(17), 9652–9657.
- [158] M. J. Suh, K. Y. Baek, B. S. Kim, C. T. Hou, and H. R. Kim, Production of 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid from olive oil by *Pseudomonas aeruginosa* PR3, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2011**, 89(6), 1721–1727.
- [159] J. H. Bae, M. J. Suh, B. S. Kim, C. T. Hou, I. J. Lee, I. H. Kim, and H. R. Kim, Optimal production of 7,10-dihydroxy-8(E)-hexadecenoic acid from palmitoleic acid by *Pseudomonas aeruginosa* PR3, *N. Biotechnol.*, **2010**, 27(4), 352–357.
- [160] T. M. Kuo and A. C. Lanser, Factors influencing the production of a novel compound, 7,10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid, by *Pseudomonas aeruginosa* PR3 (NRRL B-18602) in batch cultures, *Curr. Microbiol.*, **2003**, 47(3), 186–191.
- [161] R. Holic, H. Yazawa, H. Kumagai, and H. Uemura, Engineered high content of ricinoleic acid in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2012**, 95(1), 179–187.
- [162] A. Hiseni, I. W. C. E. Arends, and L. G. Otten, New cofactor-independent hydration biocatalysts: structural, biochemical, and biocatalytic characteristics of carotenoid and oleate hydratases, *ChemCatChem*, **2015**, 7(1), 29–37.

- [163] A. Volkov, S. Khoshnevis, P. Neumann, C. Herrfurth, D. Wohlwend, R. Ficner, and I. Feussner, Crystal structure analysis of a fatty acid double-bond hydratase from *Lactobacillus acidophilus*, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **2013**, 69, 648–657.
- [164] Y. Joo, K. Jeong, S. Yeom, Y. Kim, Y. Kim, and D. Oh, Biochemical characterization and FAD-binding analysis of oleate hydratase from *Macrococcus caseolyticus*, *Biochimie*, **2012**, 94(3), 907–915.
- [165] A. Volkov, A. Liavonchanka, O. Kamneva, T. Fiedler, C. Goebel, and B. Kreikemeyer, Myosin cross-reactive antigen of streptococcus pyogenes m49 encodes a fatty acid double bond hydratase that plays a role in oleic acid detoxification and bacterial virulence, *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285(14), 10353–10361.
- [166] E. Rosberg-Cody, A. Liavonchanka, C. Göbel, R. P. Ross, O. O’Sullivan, G. F. Fitzgerald, I. Feussner, and C. Stanton, Myosin-cross-reactive antigen (MCRA) protein from *Bifidobacterium breve* is a FAD-dependent fatty acid hydratase which has a function in stress protection, *BMC Biochem.*, **2011**, 12:9.
- [167] Y. Joo, E. Seo, Y. Kim, K. Kim, J. Park, and D. Oh, Production of 10-hydroxystearic acid from oleic acid by whole cells of recombinant *Escherichia coli* containing oleate hydratase from *Stenotrophomonas maltophilia*, *J. Biotechnol.*, **2012**, 158(1–2), 17–23.
- [168] B. N. Kim, Y. C. Joo, Y. S. Kim, K. R. Kim, and D. K. Oh, Production of 10-hydroxystearic acid from oleic acid and olive oil hydrolyzate by an oleate hydratase from *Lysinibacillus fusiformis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2012**, 95(4), 929–937.
- [169] M. H. Seo, K. R. Kim, and D. K. Oh, Production of a novel compound, 10,12-dihydroxystearic acid from ricinoleic acid by an oleate hydratase from *Lysinibacillus fusiformis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2013**, 97(20), 8987–8995.
- [170] H. Mutlu and M. A. R. Meier, Castor oil as a renewable resource for the chemical industry, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2010**, 112(1), 10–30.
- [171] A. Bódalo, J. Bastida, M. F. Máximo, M. C. Montiel, M. D. Murcia, and S. Ortega, Influence of the operating conditions on lipase-catalysed synthesis of ricinoleic acid estolides in solvent-free systems, *Biochem. Eng. J.*, **2009**, 44(2–3), 214–219.
- [172] I. Martin-Arjola, M. Busquetsb, and A. Manresa, Production of 10(S)-hydroxy-8(E)-octadecenoic acid mono-estolides by lipases in non-aqueous media, *Process Biochem.*, **2013**, 48(2), 224–230.
- [173] T. A. Isbell, Chemistry and physical properties of estolides, *Grasas y Aceites*, **2011**, 62(1), 8–20.
- [174] D. G. Hayes, The catalytic activity of lipases toward hydroxy fatty acid a review, *J. Oil & Fat Industr.*, **1996**, 3(5), 543–549.
- [175] T. A. Isbell, M. R. Edgcomb, and B. A. Lowery, Physical properties of estolides and their ester derivatives, *Ind. Crops Prod.*, **2001**, 13(1), 11–20.
- [176] S. C. Cermak and T. A. Isbell, Synthesis of estolides from oleic and saturated fatty acids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2001**, 78(6), 557–565.
- [177] H. Horchani, A. Bouaziz, Y. Gargouri, and A. Sayari, Immobilized *Staphylococcus xylosus* lipase-catalysed synthesis of ricinoleic acid esters, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2012**, 75, 35–42.
- [178] Z. S. Petrović, I. Javni, and M. Ionescu, Biological Oils as Precursors to Novel Polymeric Materials, *J. Renew. Mater.*, **2013**, 1(3), 167–186.

- [179] M. J. L. Tschan, E. Brulé, P. Haquette, and C. M. Thomas, Synthesis of biodegradable polymers from renewable resources, *Polym. Chem.*, **2012**, 3, 836–851.
- [180] J. C. Ronda, G. Lligadas, M. Galià, and V. Cádiz, Vegetable oils as platform chemicals for polymer synthesis, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2011**, 113(1), 46–58.
- [181] S. Miao, P. Wang, Z. Su, and S. Zhang, Vegetable-oil-based polymers as future polymeric biomaterials, *Acta Biomater.*, **2014**, 10(4), 1692–1704.
- [182] S. Rengasamy and V. Mannari, Development of soy-based UV-curable acrylate oligomers and study of their film properties, *Prog. Org. Coatings*, **2013**, 76(1), 78–85.
- [183] V. Kavitha, N. Radhakrishnan, E. Madhavacharyulu, G. Sailakshmi, G. Sekaran, B. S. R. Reddy, G. S. Rajkumar, and A. Gnanamani, Biopolymer from microbial assisted in situ hydrolysis of triglycerides and dimerization of fatty acids, *Bioresour. Technol.*, **2010**, 101(1), 337–343.
- [184] G. Lligadas, J. C. Ronda, M. Galià, and V. Cádiz, Renewable polymeric materials from vegetable oils: A perspective, *Mater. Today*, **2013**, 16(9), 337–343.
- [185] S. Cantone, V. Ferrario, L. Corici, C. Ebert, D. Fattor, P. Spizzo, and L. Gardossi, Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, 42(15), 6262–6276.
- [186] I. Kuan, R. Liao, H. Hsieh, K. Chen, and C. Yu, Properties of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase immobilized on magnetic beads through his-tag, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2008**, 105(2), 110–115.
- [187] W. R. Carmody, Easily prepared wide range buffer series, *J. Chem. Educ.*, **1961**, 38(11), 559.
- [188] E. Krieger, G. Koraimann, and G. Vriend, Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA—a self-parameterizing force field, *Proteins*, **2002**, 47(3), 393–402.
- [189] C. Zarcu, L. Corici, R. Croitoru, A. Ursoiu, and F. Peter, Preparation and properties of xerogels obtained by ionic liquid incorporation during the immobilization of lipase by the sol-gel method, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2010**, 65(1-4), 79–86.
- [190] R. A. Sheldon, Enzyme immobilization: the quest for optimum performance, *Adv Synth. Catalysis.*, **2007**, 349(8-9), 1289–1307.
- [191] J. G. Sampedro and S. Uribe, Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity, *Mol. Cell. Biochem.*, **2004**, 256–257, 319–327.
- [192] L. N. Corici, A. E. Frissen, D. J. Van Zoelen, I. F. Eggen, F. Peter, C. M. Davidescu, and C. G. Boeriu, Sol-gel immobilization of Alcalase from *Bacillus licheniformis* for application in the synthesis of C-terminal peptide amides, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **2011**, 73(1-4), 90–97.
- [193] M. Salette, L. K. James, R. C. Holz, and T. E. Elgren, Acrylamide production using encapsulated nitrile hydratase from *Pseudonocardia thermophila* in a sol-gel matrix, *Journal Mol. Catal. B, Enzym.*, **2014**, 100, 19–24.
- [194] C. Pizarro, M. C. Brañes, A. Markovits, G. Fernández-Lorente, J. M. Guisán, R. Chamy, and L. Wilson, Influence of different immobilization techniques for *Candida cylindracea* lipase on its stability and fish oil hydrolysis, *Journal. Mol. Catal. B Enzym.*, **2012**, 78, 111–118.

- [195] J. M. Bolivar, J. Rocha-Martín, C. Mateo, and J. M. Guisan, Stabilization of a highly active but unstable alcohol dehydrogenase from yeast using immobilization and post-immobilization techniques, *Process Biochem.*, **2012**, 47(5), 679–686.
- [196] S. Salentinig, L. Sagalowicz, and O. Glatter, Self-assembled structures and pK a value of oleic acid in systems of biological relevance, *Langmuir*, **2010**, 26(14), 11670–11679.
- [197] S. C. Chen, D. C. Sheu, and K. J. Duan, Production of fructooligosaccharides using β -fructofuranosidase immobilized onto chitosan-coated magnetic nanoparticles, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, **2014**, 45(4), 1105–1110.
- [198] E. Biró, A. S. Németh, C. Sisak, T. Feczko, and J. Gyenis, Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization., *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2008**, 70, 1240–1246.
- [199] **A. Todea**, L. G. Otten, A. E. Frissen, I. W. C. E. Arends, F. Peter, and C. G. Boeriu, Selectivity of lipases for estolides synthesis, *Pure Appl. Chem.*, **2015**, 87(1), 51–58.
- [200] C. Ebert, F. Felluga, C. Forzato, M. Foscatto, L. Gardossi, P. Nitti, G. Pitacco, C. Boga, P. Caruana, G. Micheletti, N. Calonghi, and L. Masotti, Enzymatic kinetic resolution of hydroxystearic acids: A combined experimental and molecular modelling investigation, *Journal Mol. Catal. B, Enzym.*, **2012**, 83, 38–45.
- [201] W. E. I. Yang, L. Dostal, and J. P. N. Rosazza, Stereospecificity of Microbial Hydrations of Oleic Acid to 10-Hydroxystearic Acid, **1993**, 59 (1), 281–284.
- [202] **A. Todea**, V. Badea, L. Nagy, S. Kéki, C. G. Boeriu, and F. Péter, Biocatalytic synthesis of δ -gluconolactone and ϵ -caprolactone copolymers, *Acta Biochim. Pol.*, **2014**, 61(2), 205–210.
- [203] L. Van Der Mee, F. Helmich, R. De Bruijn, J. M. Vekemans, A. R. A. Palmans, and E. W. Meijer, Investigation of lipase-catalyzed ring-opening polymerizations of lactones with various ring sizes: Kinetic evaluation, *Macromolecules*, **2006**, 39, 5021–5027.
- [204] J. F. Kennedy, H. Kumar, P. S. Panesar, S. S. Marwaha, R. Goyal, A. Parmar, and S. Kaur, Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of sugar esters and related compounds, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **2006**, 81, 866–876.
- [205] R. Croitoru, F. Fițigău, L. A. M. Van Den Broek, A. E. Frissen, C. M. Davidescu, C. G. Boeriu, and F. Peter, Biocatalytic acylation of sugar alcohols by 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid, *Process Biochem.*, **2012**, 47, 1894–1902.
- [206] C. M. Du, K. Valko, C. Bevan, D. Reynolds, and M. H. Abraham, Characterizing the selectivity of stationary phases and organic modifiers in reversed-phase high-performance liquid chromatographic systems by a general solvation equation using gradient elution, *J. Chromatogr. Sci.*, **2000**, 38, 503–511.
- [207] A. Zaks and A. M. Klibanov, Enzyme-catalyzed processes in organic solvents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 3192–3196.
- [208] J. Ma, Q. Li, B. Song, D. Liu, B. Zheng, Z. Zhang, and Y. Feng, Enzymatic ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone catalyzed by a novel thermophilic esterase from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **2009**, 56, 151–157.
- [209] P. Adlercreutz, Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2008**.

- [210] N. Miletic, A. Nasyasovic, and K. Loos, Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities , advantages , applications, *Bioresour. Technol.*, **2012**, 115, 126–135.
- [211] G. Maria, Analiza datelor statistice si corelarea datelor experimentale (bio)chimice. Repartitii si estimatori statistici, Ed. Printech, Bucuresti, **2008**.
- [212] **A. Todea**, E. Biro, V. Badea, C. Paul, A. Cimporescu, L. Nagy, S. Kéki, G. Bandur, C. Boeriu, and F. Péter, Optimization of enzymatic ring-opening copolymerizations involving δ -gluconolactone as monomer by experimental design, *Pure Appl. Chem.*, **2014**, 86(11), 1781–1792.
- [213] V. Kumar, F. Jahan, S. Raghuwanshi, R. V. Mahajan, and R. K. Saxena, Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on magnetic Fe₃O₄-chitosan beads and its potential in phenolic acids ester synthesis, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **2013**, 18, 787–795.
- [214] J. A. Hudson, C. A. M. Mackenzie, and K. N. Joblin, Conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid by two species of ruminal bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1995**, 44, 1-6.

ANEXE

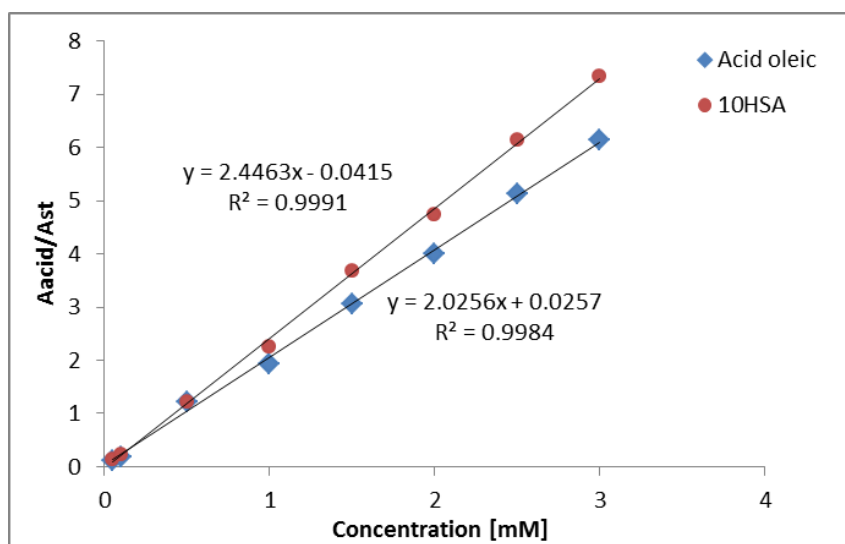


Figura A1 Dreptele de etalonare ale acidului oleic și 10HSA

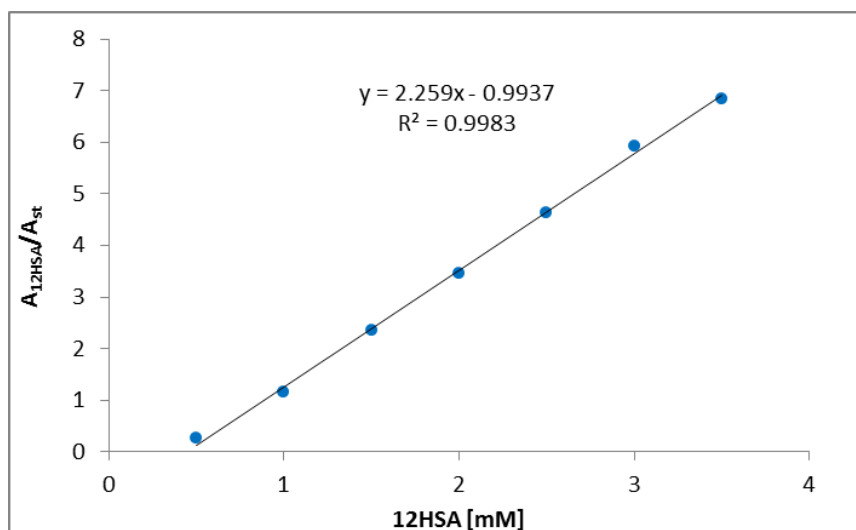


Figura A2 Dreapta de etalonare a acidului 12HSA

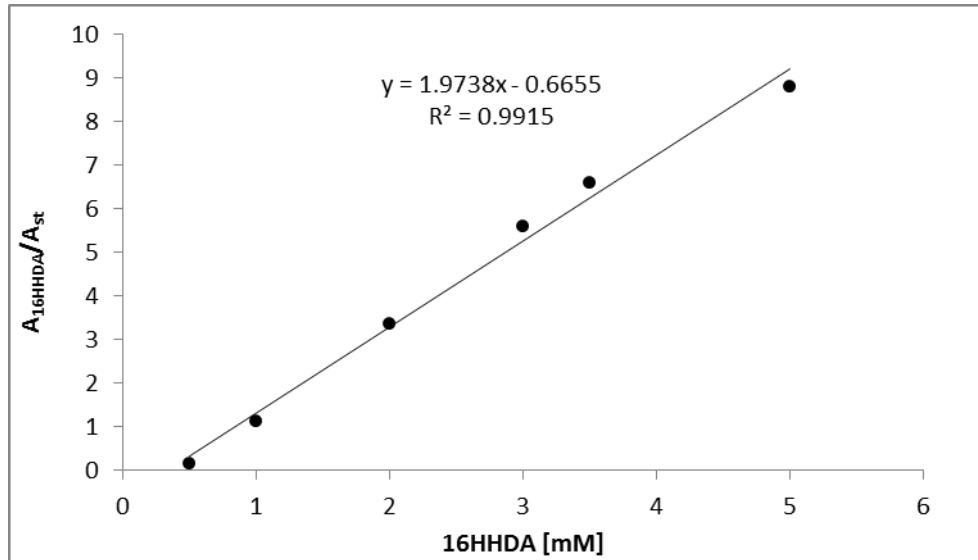


Figura A3 Dreapta de etalonare a acidului 16HHDA

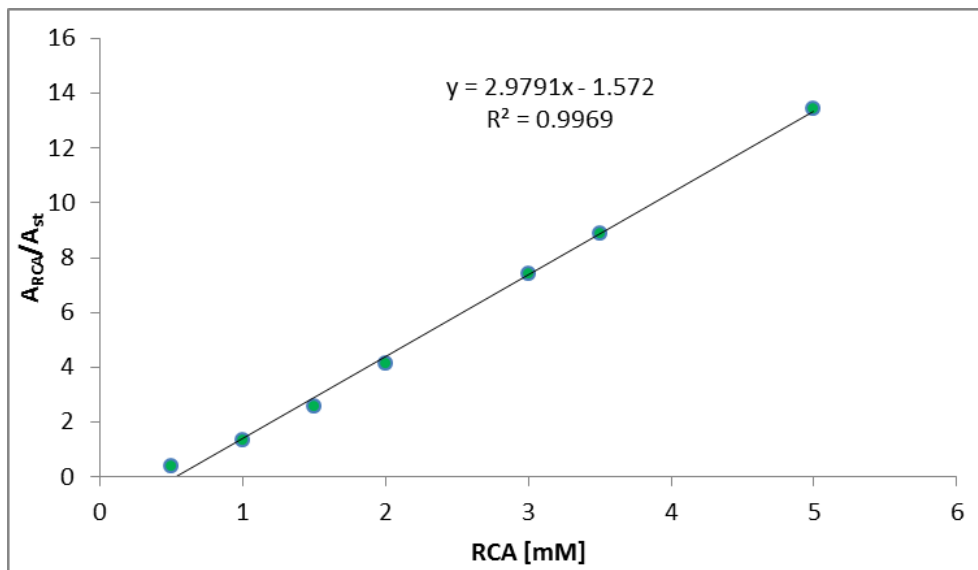


Figura A4 Dreapta de etalonare a acidului RCA

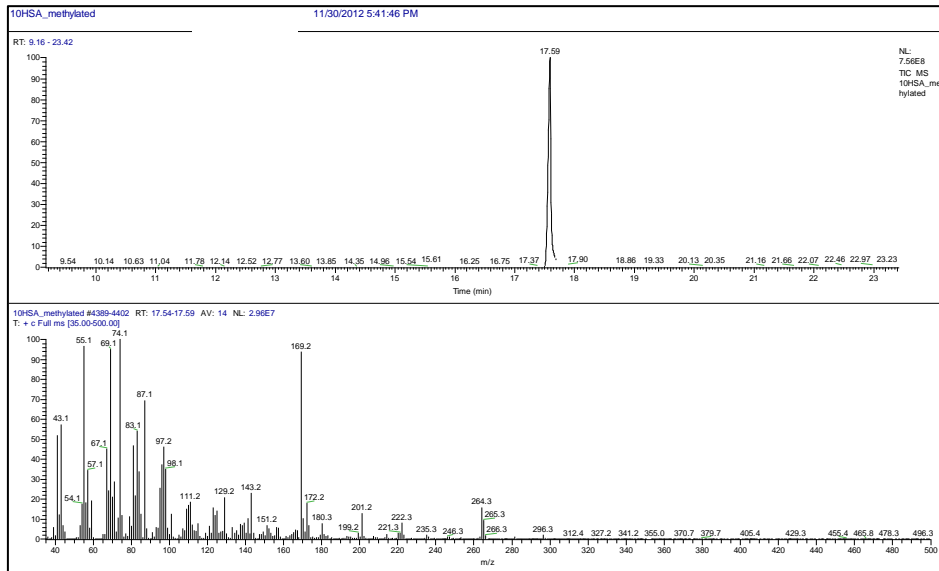


Figura A5 Cromatograma GC-MS a metil esterului 10HSA

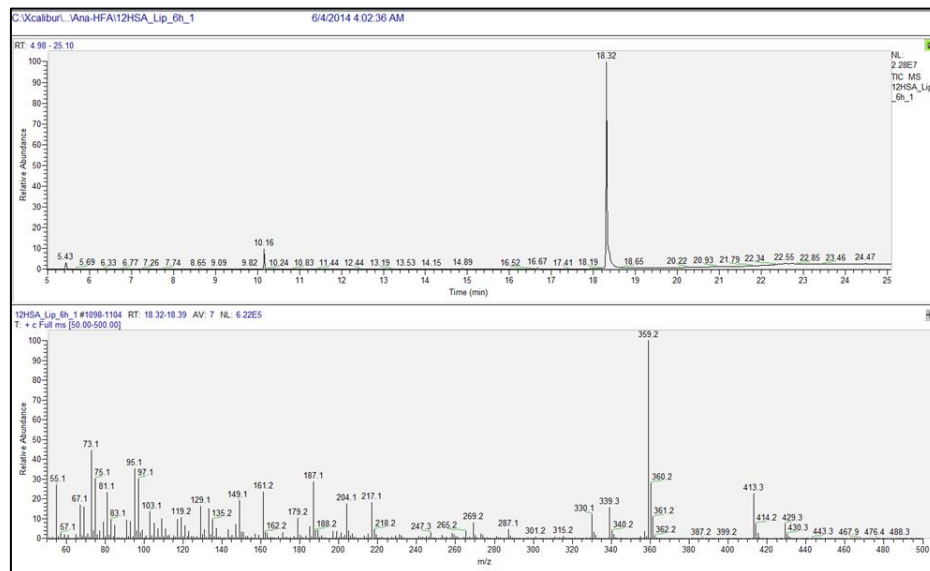


Figura A6 Cromatograma GC-MS a acidului 12HSA

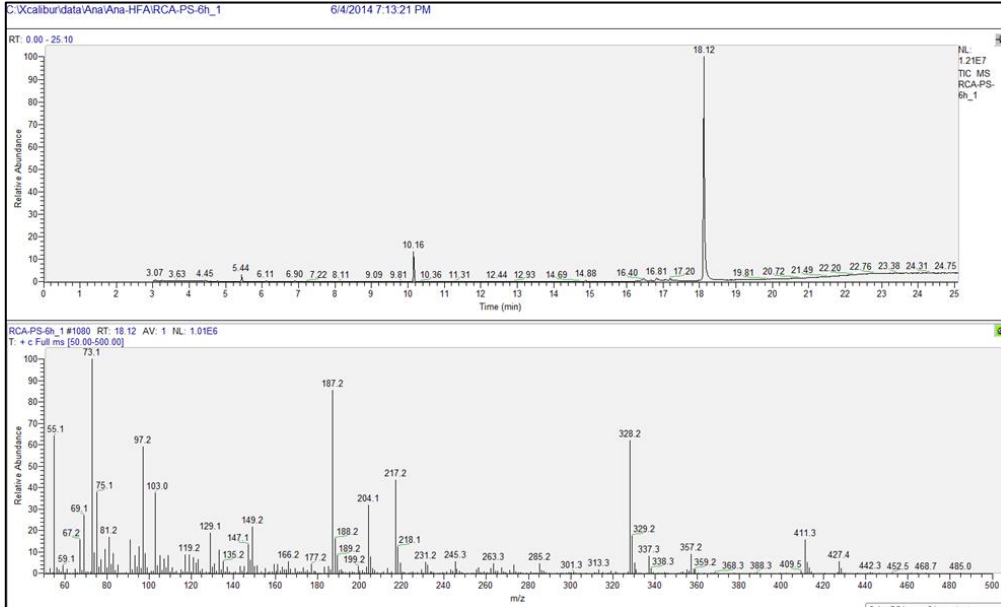


Figura A7 Cromatograma GC-MS a acidului RCA

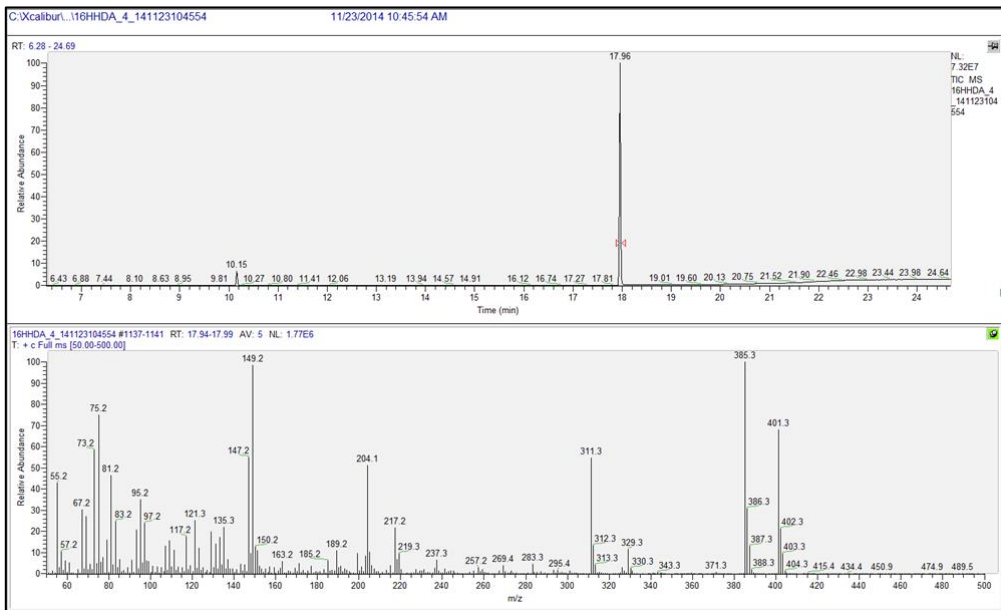


Figura A8 Cromatograma GC-MS a acidului 16HHDA

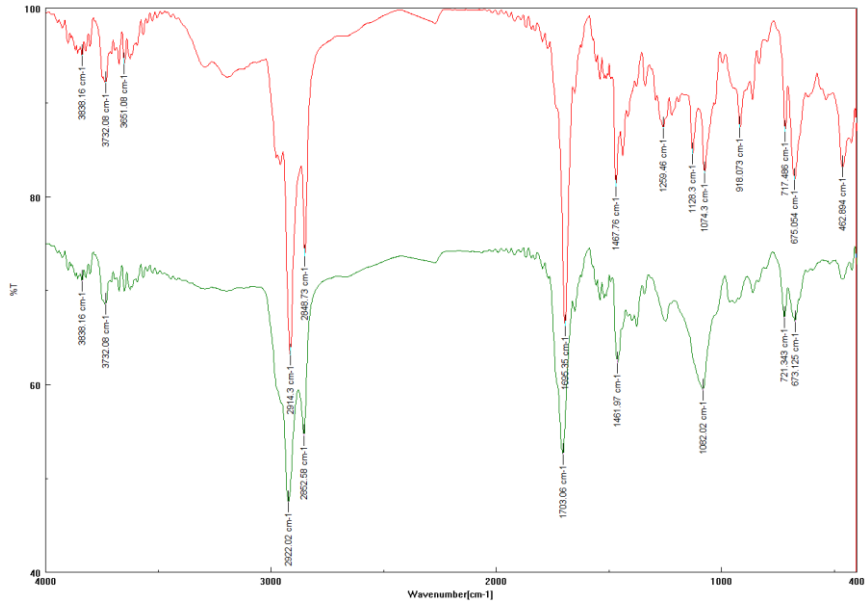


Figura A11 Spectrul FT IR al 12HSA (roșu) și a estolidei corespunzătoare (verde)

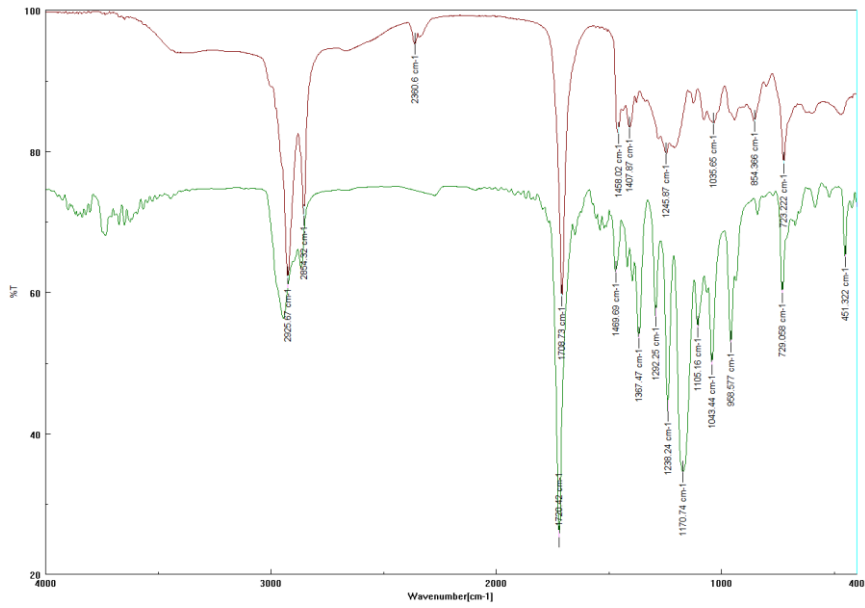


Figura A12 Spectrul FT IR al RCA (maro) și a estolidei corespunzătoare (verde)

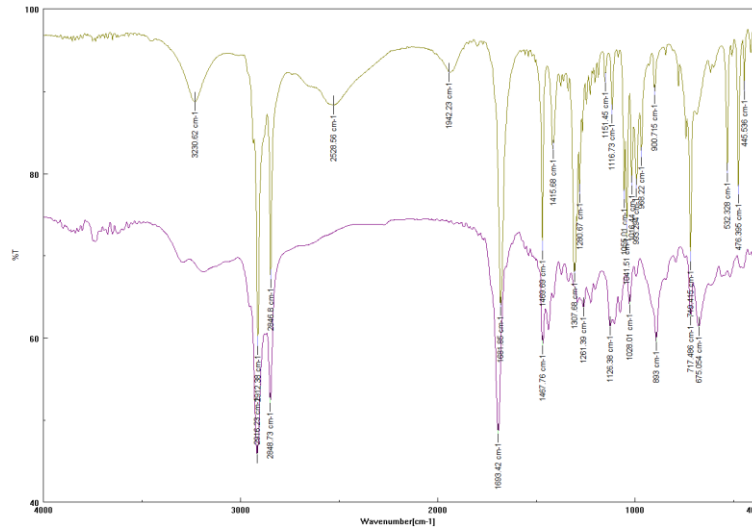


Figura A13 Spectrul FT IR al 16HHDA (galben) și a estolidei corespunzătoare (violet)

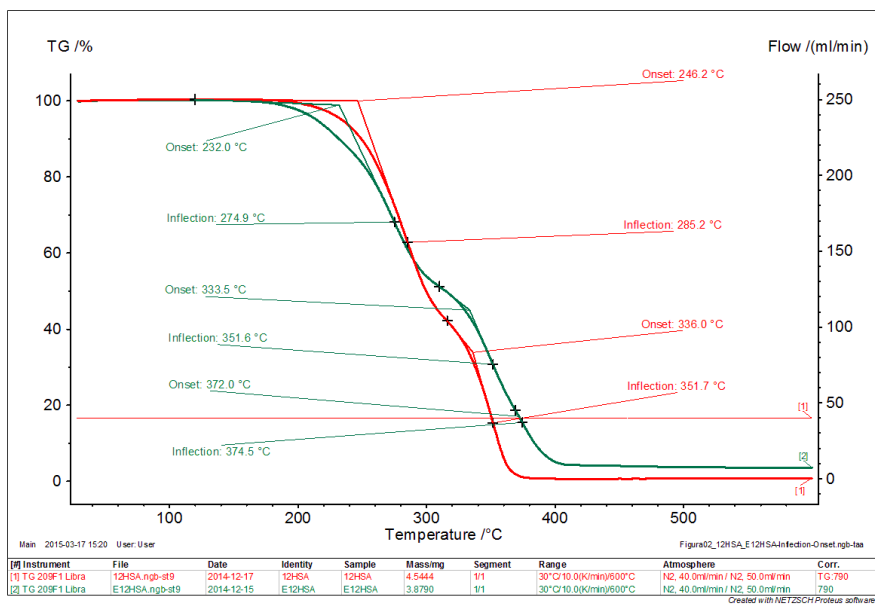


Figura A14 Termogramele 12HSA și a estolidei corespunzătoare

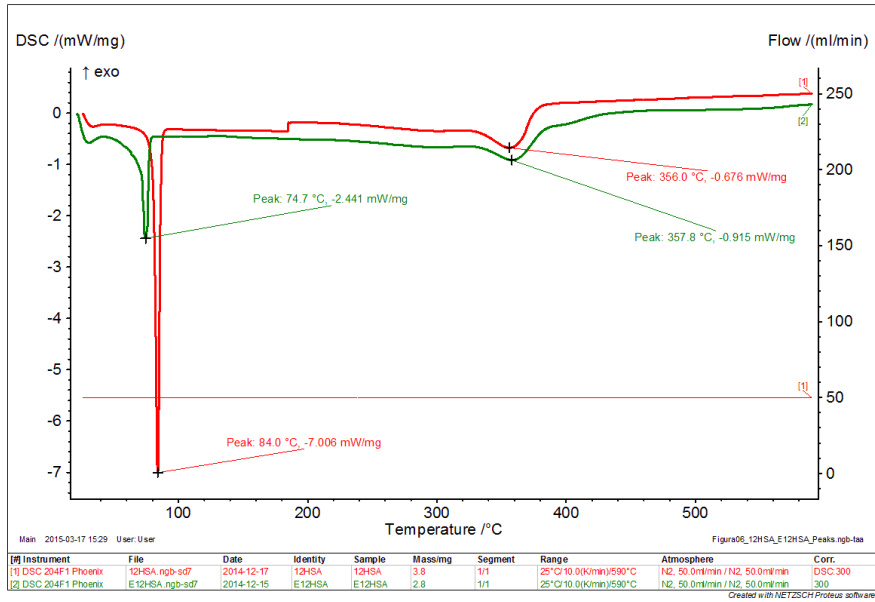


Figura A15 Curbele DSC ale 12HSA și a estolidelor corespunzătoare

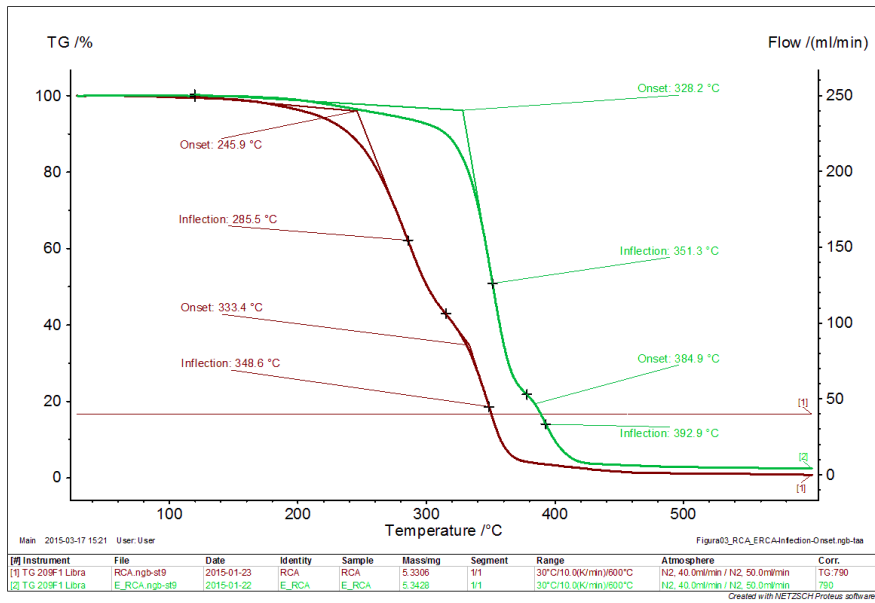


Figura A16 Termogramele RCA și a estolidei corespunzătoare

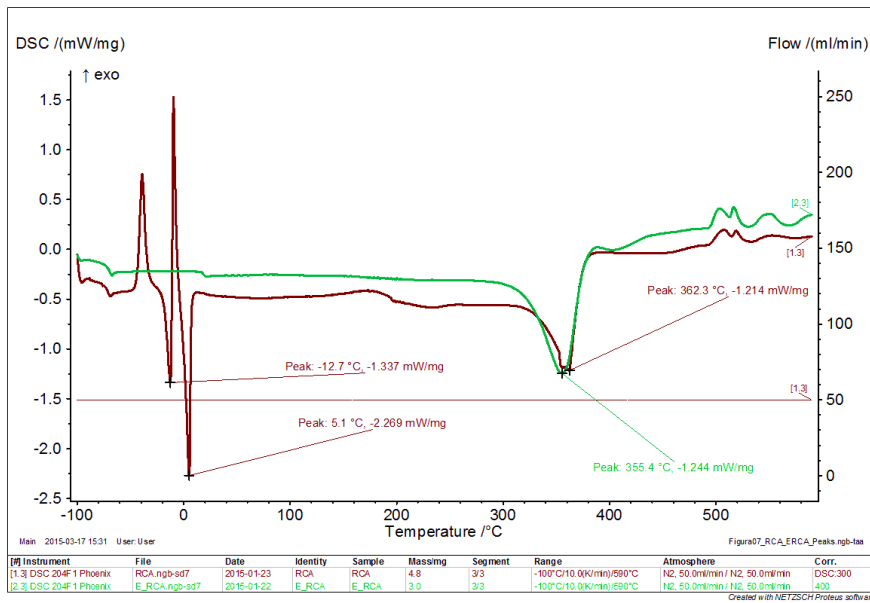


Figura A17 Curbele DSC ale RCA și a estolidelor corespunzătoare

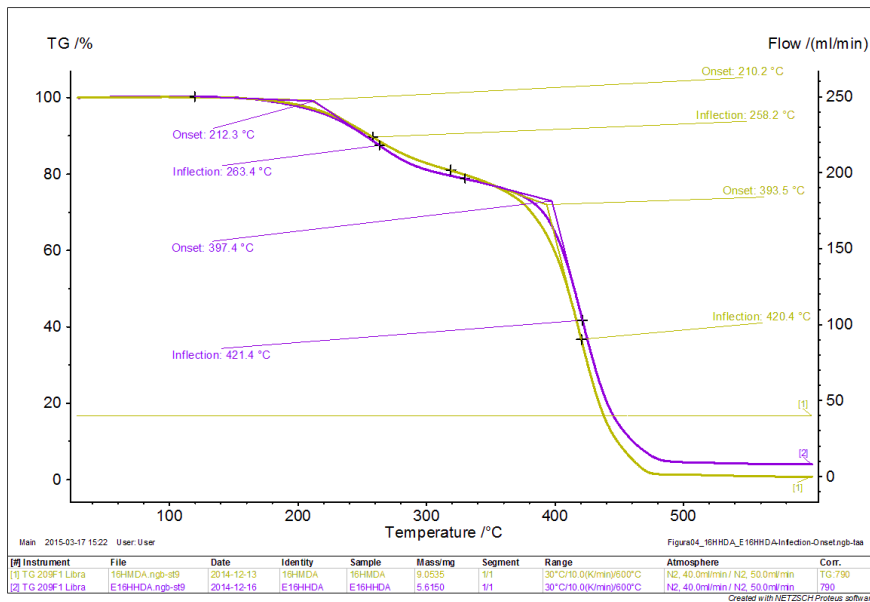


Figura A 18 Termogramele 16HHDA și a estolidei corespunzătoare

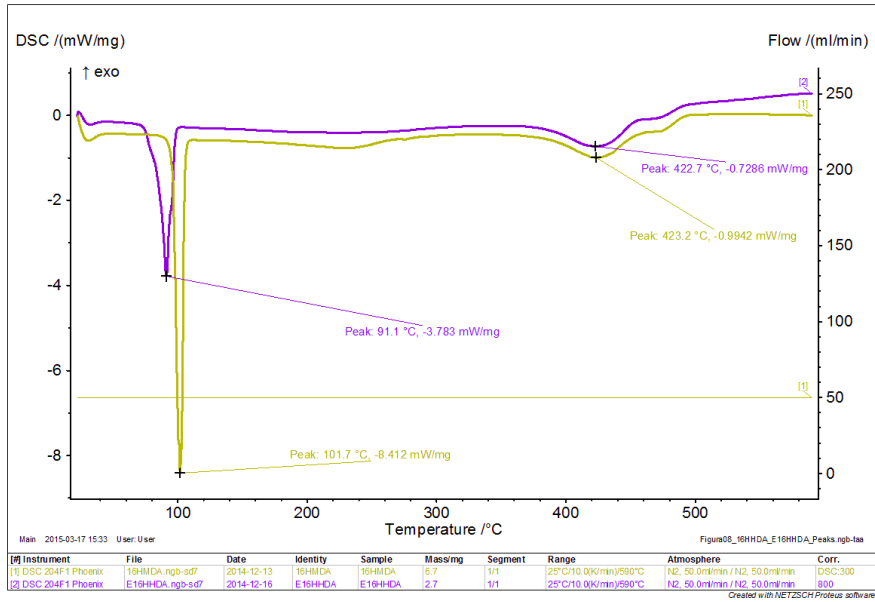


Figura A19 Curbele DSC ale 16HHDA și a estolidei corespunzătoare

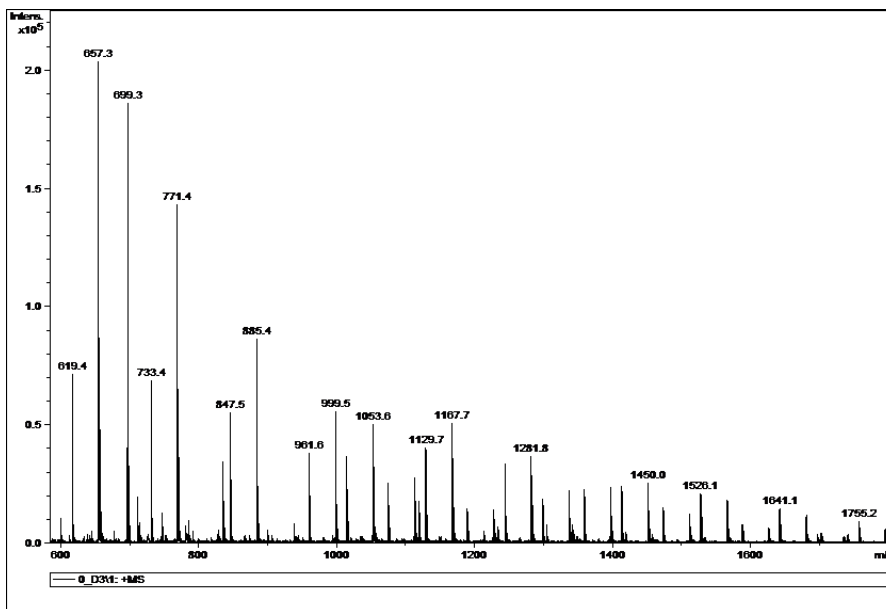


Figura A20 Spectrul MALDI-TOF MS al produsului de reacție 10ECL sintetizat în toluen la 75°C, în prezența lipazei LIPOZYME TL.

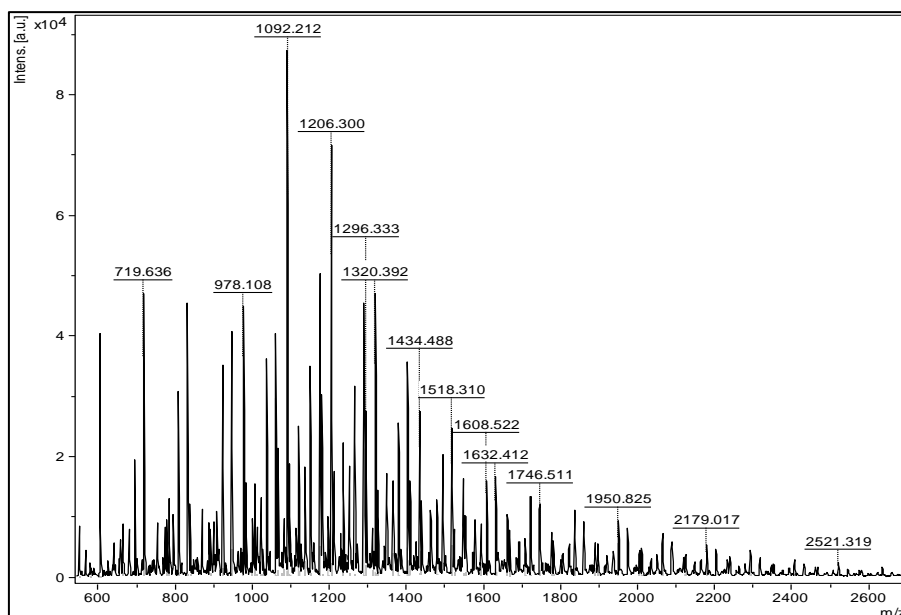


Figura A21 Spectrul MALDI-TOF MS corespunzător produsului de reacție dintre 12HDA și ECL utilizând Novozyme 435 ca și biocatalizator

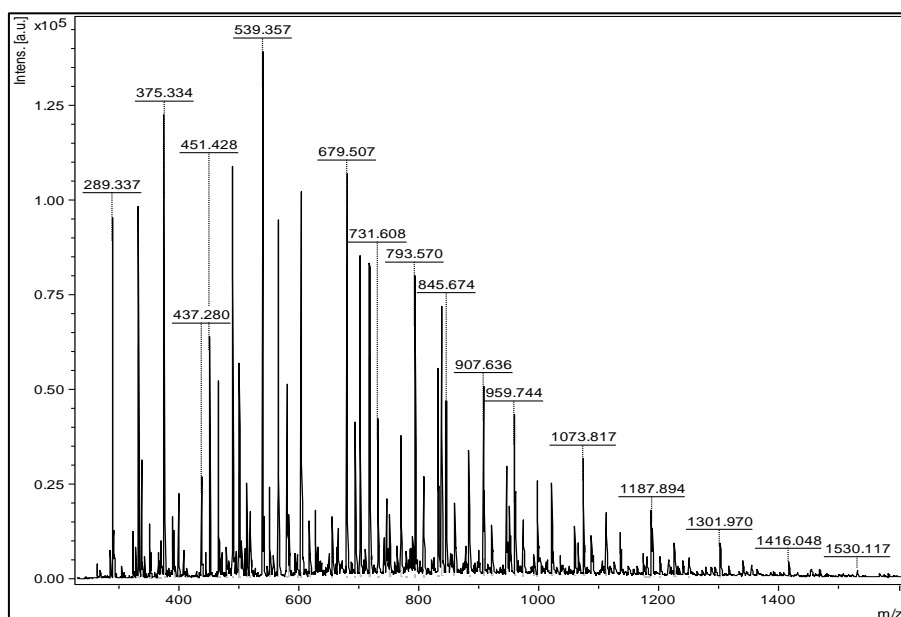


Figura A22 Spectrul MALDI-TOF MS corespunzător produsului de reacție dintre 12HDA și ECL utilizând Novozyme 435 ca și biocatalizator

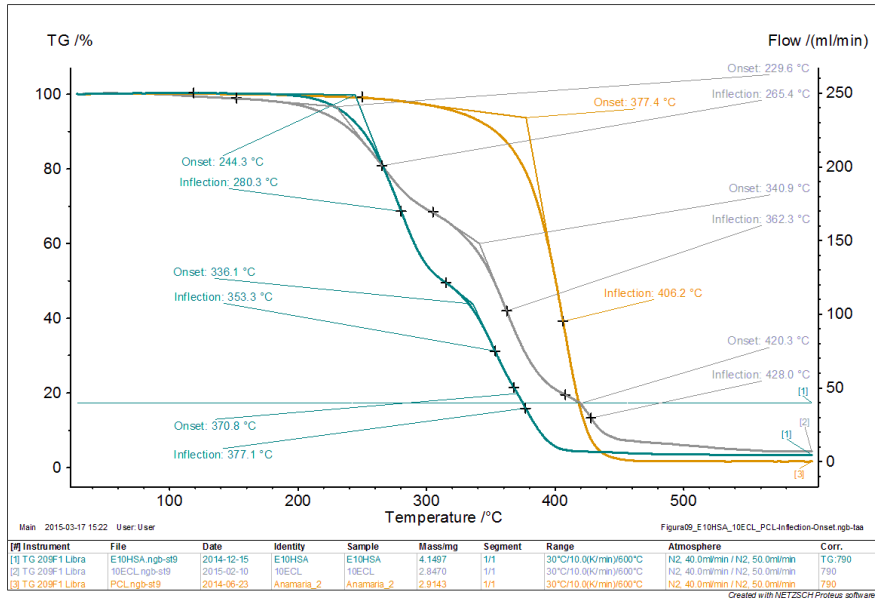


Figura A23 Termogramele copolimerilor 10ECL și a homopolimerilor corespunzători

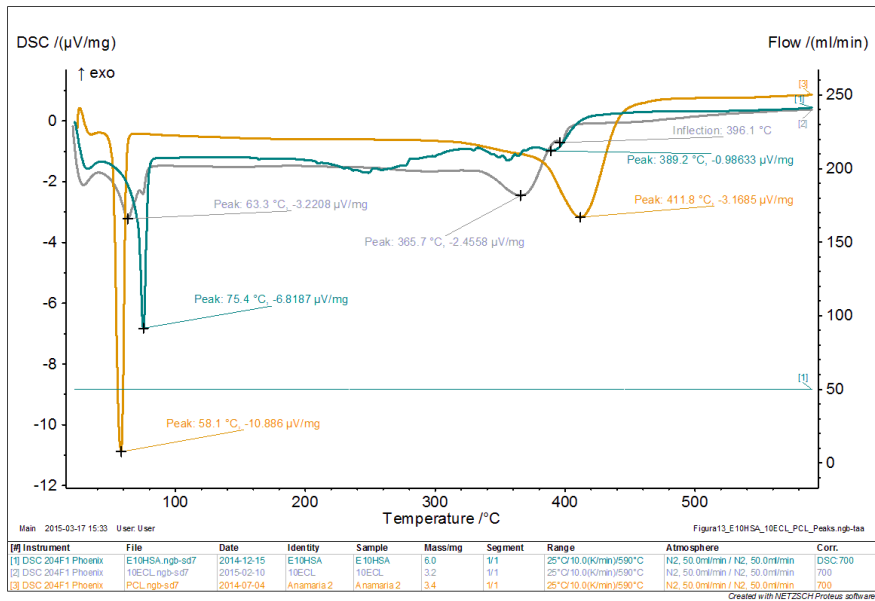


Figura A24 Curbele DSC ale copolimerilor 12ECL și homopolimerilor corespunzători.

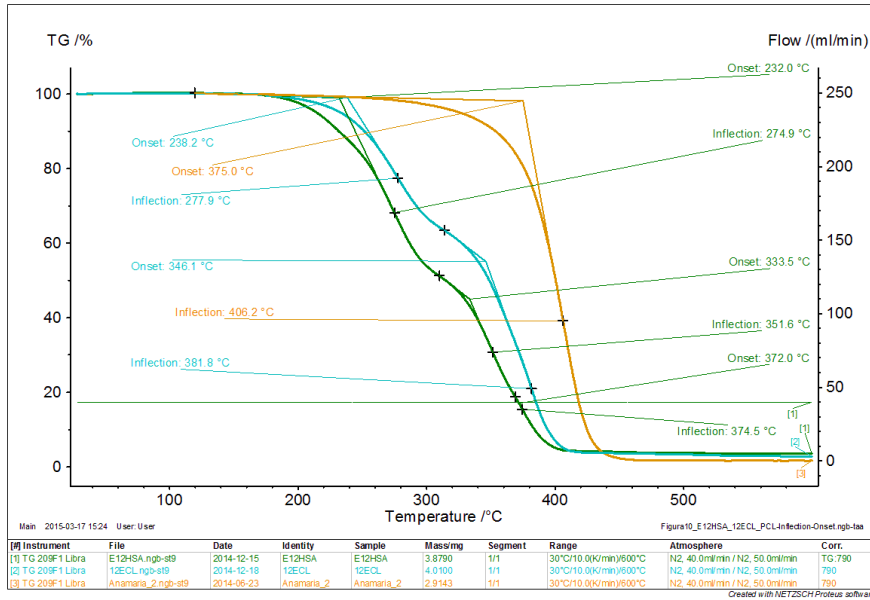


Figura A25 Termogramele copolimerilor 12ECL și a homopolimerilor corespunzători

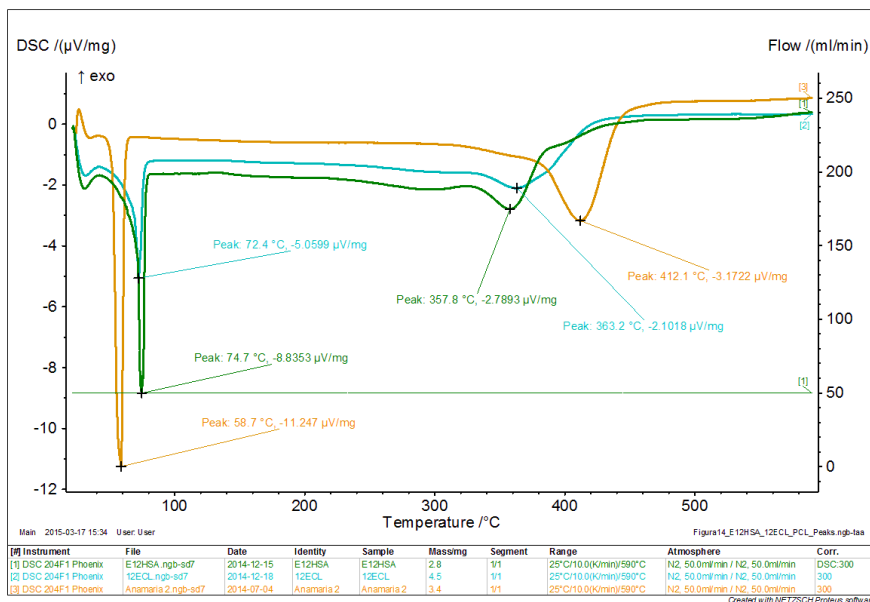


Figura A26 Curbele DSC ale copolimerilor 12ECL și homopolimerilor corespunzători.

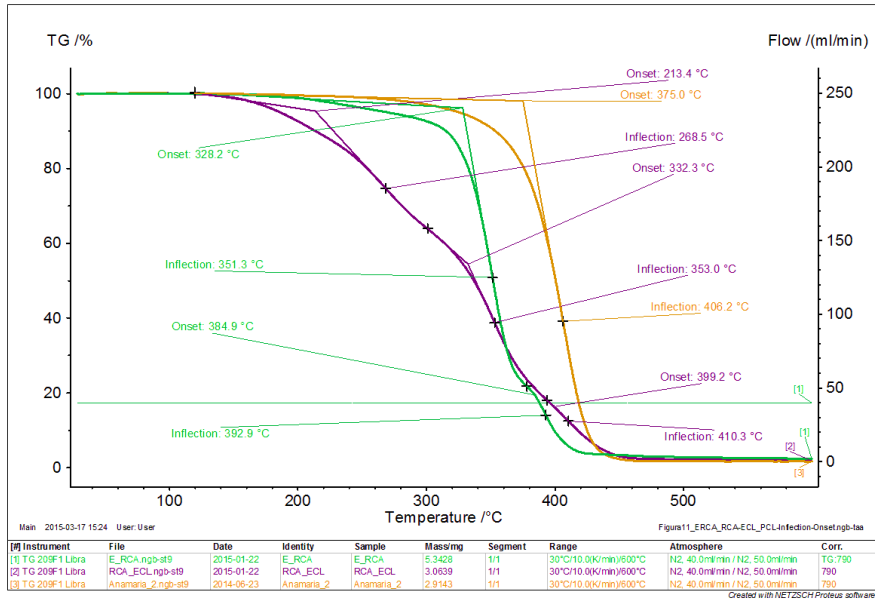


Figura A27 Termogramele copolimerilor RCA_ECL și a homopolimerilor corespunzători

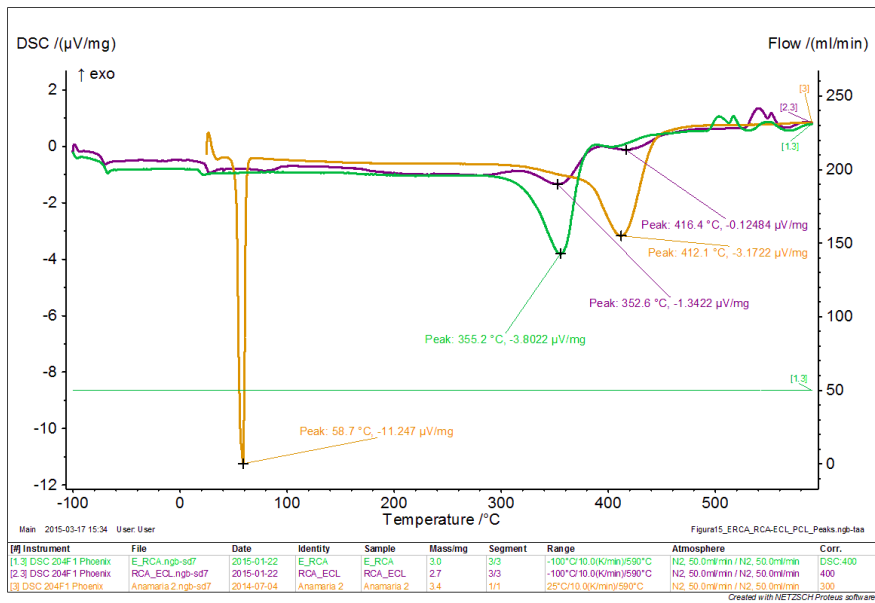


Figura A28 Curbele DSC ale copolimerilor RCA_ECL și homopolimerilor corespunzători

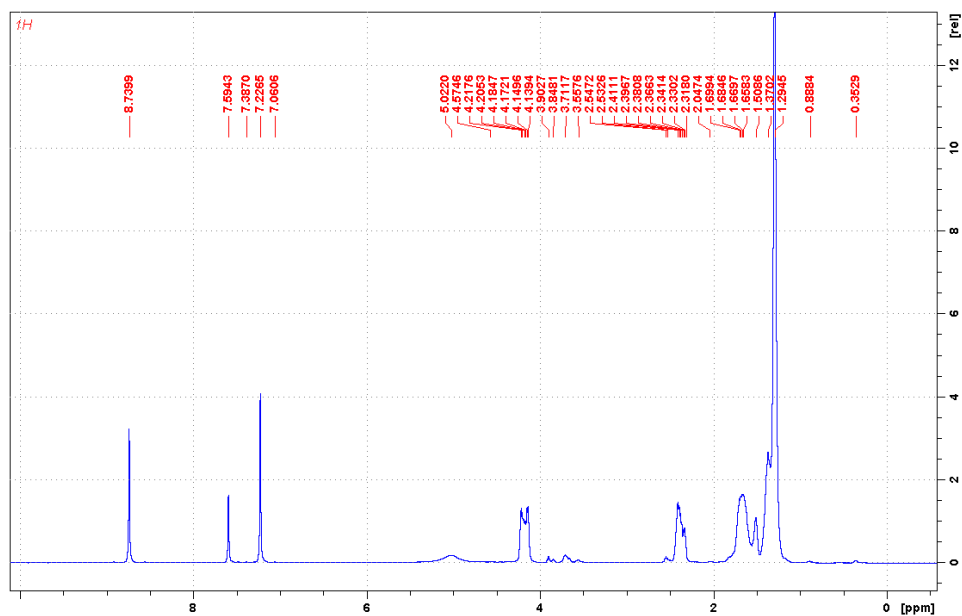


Figura A29 Spectrul ¹H-RMN al produsului de reacție 16ECL (0-9 ppm)
RMN 16ECL

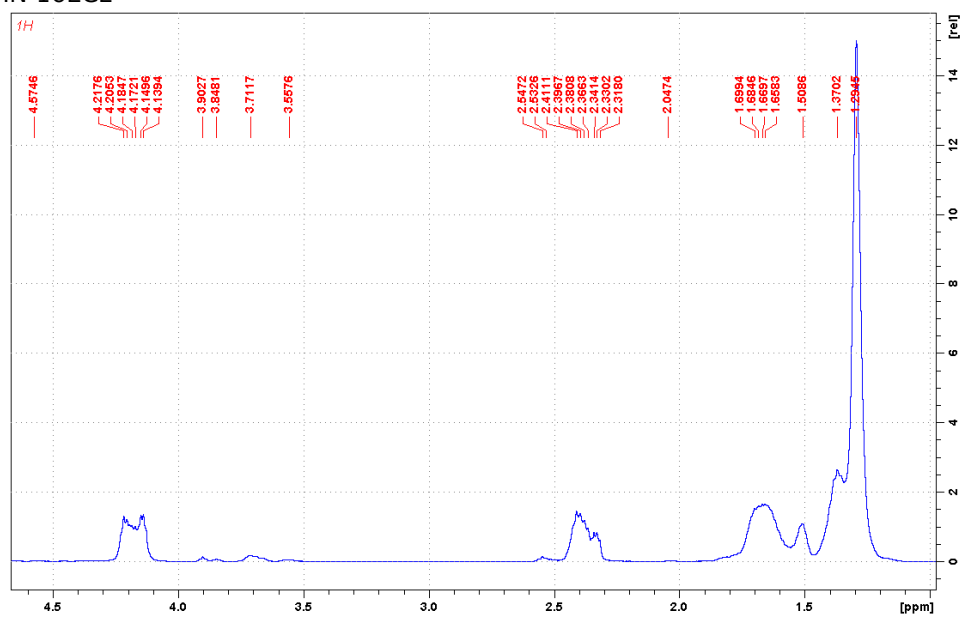


Figura A30 Spectrul ¹H-RMN al produsului de reacție 16ECL (0-4.5 ppm)

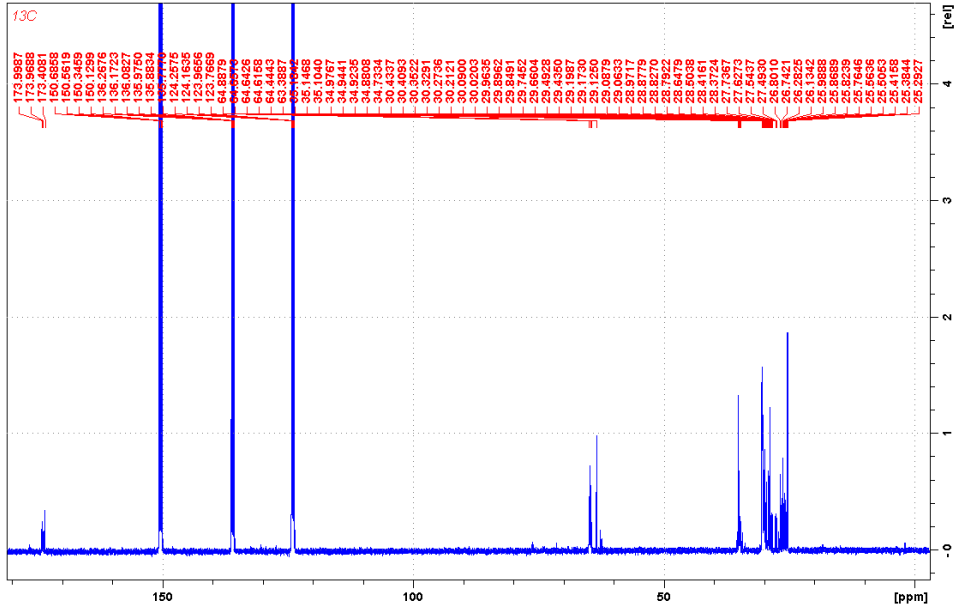


Figura A31 Spectrul ^{13}C -RMN al produsului de reacție 16ECL (0-160 ppm)

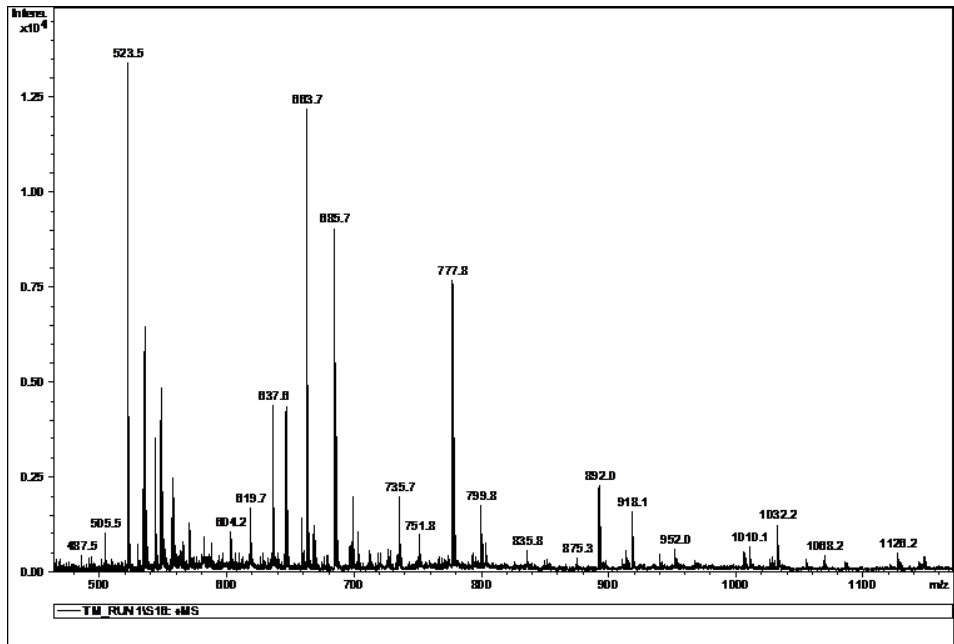


Figura A32 Spectrul MALDI-TOF MS al produsului 10ECL sinteza de lipaza LIPOZYME TL, în toluen la 75°C

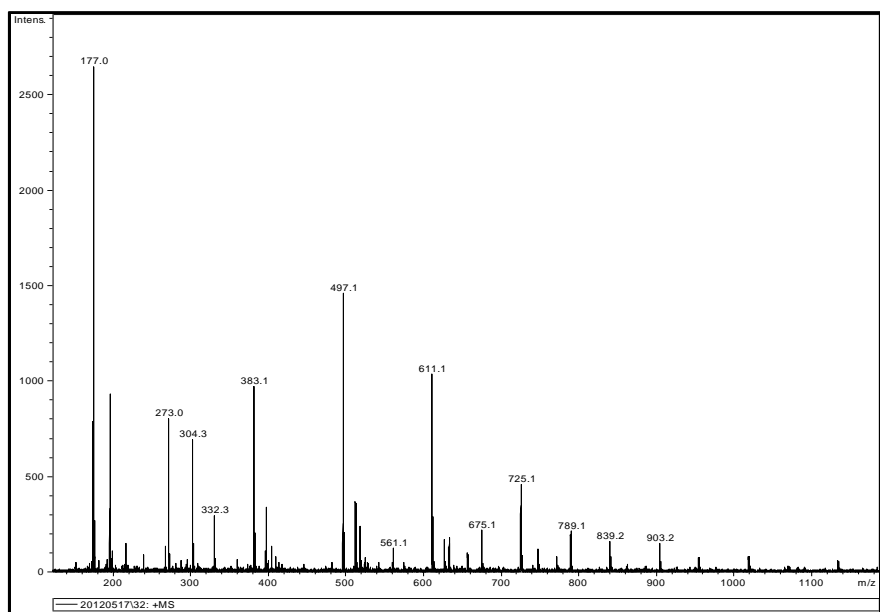


Figura A33 Spectrul MALDI-TOF MS al produsului ECL-GL sintetizați de lipaza PPL, la 50°C, 24h

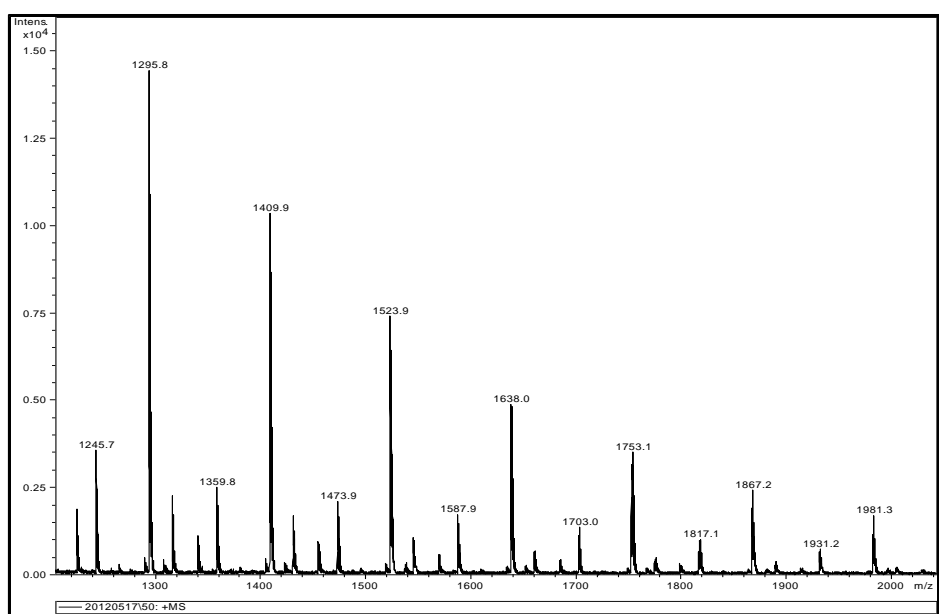


Figura A34 Spectrul MALDI-TOF MS al produsului ECL-GL, utilizând lipaza Ca/B imobilizată prin entrapare în matrici de sol-gel (TMOS:OctMOS=1:1), la 50°C, 24h

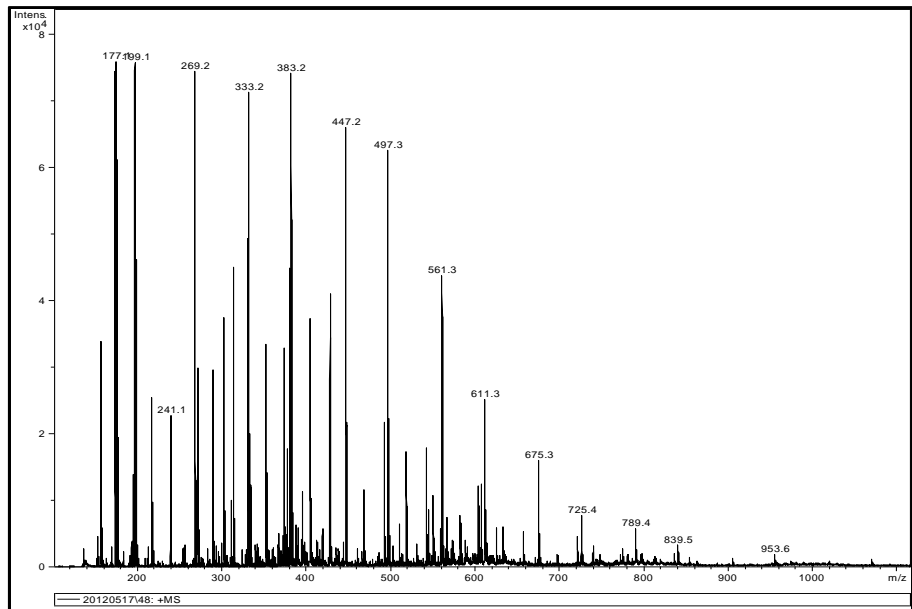


Figura A35 Spectrul MALDI-TOF MS al produsului de reacție ECL-GL sintetizat în DMSO:*t*-BuOH=20:80 de lipaza Novozyme 435.

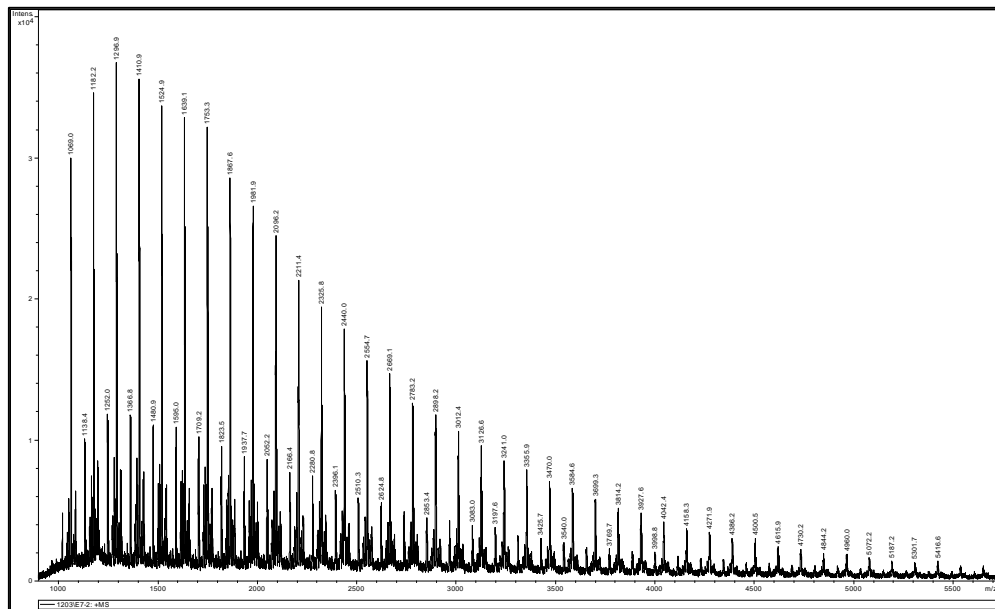


Figura A36 Spectrul MALDI-TOF MS al produsului de reacție PCL sintetizat toluen de lipaza Novozyme 435 la 75°C

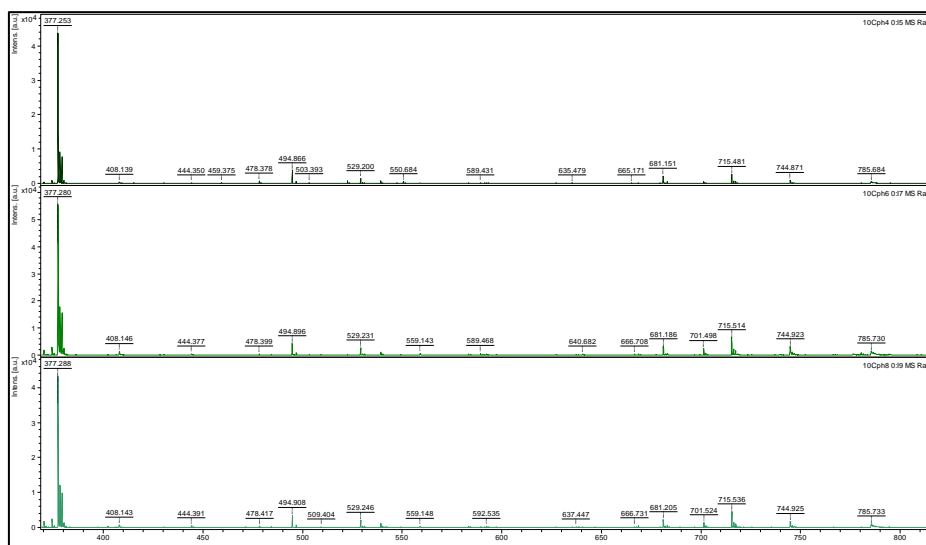


Figura A37 Spectrele MALDI-TOF MS reacțiilor control de sinteză a estolidelor de 10HSA în soluție tampon pH 4, 6.5 și 8.

Tabel A1. Masele moleculare teoretice corespunzătoare estolidelor liniare și ciclice și ale aducților de K^+ corespunzători 10HSA/12HSA

DP	Estolide liniare			Estolide ciclice	
	M [g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
1	300.48	338.58	376.68	282.48	320.58
2	582.94	621.04	659.14	564.94	603.04
3	865.40	903.50	941.60	847.40	885.50
4	1147.86	1185.96	1224.06	1129.86	1167.96
5	1430.32	1468.42	1506.52	1412.32	1450.42
6	1712.78	1750.88	1788.98	1694.78	1732.88
7	1995.24	2033.34	2071.44	1977.24	2015.34
8	2277.70	2315.80	2353.90	2259.70	2297.80
9	2560.16	2598.26	2636.36	2542.16	2580.26
10	2842.62	2880.72	2918.82	2824.62	2862.72
11	3125.08	3163.18	3201.28	3107.08	3145.18
12	3407.54	3445.64	3483.74	3389.54	3427.64

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A 2 Masele moleculare teoretice corespunzătoare estolidelor liniare și ciclice și ale aducțiilor de K^+ corespunzători 16HHDA

DP	Estolide liniare			Estolide ciclice	
	M[g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
1	272.42	310.52	348.62	254.41	292.51
2	526.83	564.93	603.03	508.82	546.92
3	781.24	819.34	857.44	763.23	801.33
4	1035.65	1073.75	1111.85	1017.64	1055.74
5	1290.06	1328.16	1366.26	1272.05	1310.15
6	1544.47	1582.57	1620.67	1526.46	1564.56
7	1798.88	1836.98	1875.08	1780.87	1818.97
8	2053.29	2091.39	2129.49	2035.28	2073.38
9	2307.70	2345.80	2383.90	2289.69	2327.79
10	2562.11	2600.21	2638.31	2544.10	2582.20
11	2816.52	2854.62	2892.72	2798.51	2836.61
12	3070.93	3109.03	3147.13	3052.92	3091.02

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A3 Masele moleculare teoretice corespunzătoare estolidelor liniare și ciclice și ale aducțiilor de K^+ corespunzători RCA

DP	Estolide liniare			Estolide ciclice	
	M[g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
1	298.46	336.56	374.66	280.46	318.56
2	578.92	617.02	655.12	560.92	599.02
3	859.38	897.48	935.58	841.38	879.48
4	1139.84	1177.94	1216.04	1121.84	1159.94
5	1420.30	1458.40	1496.50	1402.30	1440.40
6	1700.76	1738.86	1776.96	1682.76	1720.86
7	1981.22	2019.32	2057.42	1963.22	2001.32
8	2261.68	2299.78	2337.88	2243.68	2281.78
9	2542.14	2580.24	2618.34	2524.14	2562.24
10	2822.60	2860.70	2898.80	2804.60	2842.70
11	3103.06	3141.16	3179.26	3085.06	3123.16
12	3383.52	3421.62	3459.72	3365.52	3403.62

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A4 Masele moleculare teoretice corespunzătoare co-poliesterilor și ale aducțiilor de K^+ de tipul $(10HSA/12HSA)_1-(ECL)_n$

DP	Prođuși liniare			Prođuși ciclici	
	M [g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
2	414.62	452.72	490.82	396.32	434.42
3	528.76	566.86	604.96	510.46	548.56
4	642.90	681.00	719.10	624.60	662.70
5	757.04	795.14	833.24	738.74	776.84
6	871.18	909.28	947.38	852.88	890.98
7	985.32	1023.42	1061.52	967.02	1005.12
8	1099.46	1137.56	1175.66	1081.16	1119.26
9	1213.60	1251.70	1289.80	1195.30	1233.40
10	1327.74	1365.84	1403.94	1309.44	1347.54

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A5 Masele moleculare teoretice corespunzătoare co-poliesterilor și ale aducțiilor de K^+ de tipul $(10HSA/12HSA)_2-(ECL)_n$

DP	Prođuși liniare			Prođuși ciclici	
	M [g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
3	697.08	735.18	773.28	679.08	717.18
4	811.22	849.32	887.42	793.22	831.32
5	925.36	963.46	1001.56	907.36	945.46
6	1039.50	1077.60	1115.70	1021.50	1059.60
7	1153.64	1191.74	1229.84	1135.64	1173.74
8	1267.78	1305.88	1343.98	1249.78	1287.88
9	1381.92	1420.02	1458.12	1363.92	1402.02
10	1496.06	1534.16	1572.26	1478.06	1516.16
11	1610.20	1648.30	1686.40	1592.20	1630.30
12	1724.34	1762.44	1800.54	1706.34	1744.44
13	1838.48	1876.58	1914.68	1820.48	1858.58
14	1952.62	1990.72	2028.82	1934.62	1972.72
15	2066.76	2104.86	2142.96	2048.76	2086.86

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A6 Masele moleculare teoretice corespunzătoare co-poliesterilor și ale aducțiilor de K^+ de tipul $(10HSA/12HSA)_3^-(ECL)_n$

DP	Prođuși liniare			Prođuși ciclici	
	M [g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
4	979.58	1017.68	1055.78	961.58	999.38
5	1093.72	1131.82	1169.92	1075.72	1113.52
6	1207.86	1245.96	1284.06	1189.86	1227.66
7	1322.00	1360.10	1398.20	1304.00	1341.80
8	1436.14	1474.24	1512.34	1418.14	1455.94
9	1550.28	1588.38	1626.48	1532.28	1570.08
10	1664.42	1702.52	1740.62	1646.42	1684.22
11	1778.56	1816.66	1854.76	1760.56	1798.36
12	1892.70	1930.80	1968.90	1874.70	1912.50
13	2006.84	2044.94	2083.04	1988.84	2026.64
14	2120.98	2159.08	2197.18	2102.98	2140.78
15	2235.12	2273.22	2311.32	2217.12	2254.92
16	2349.26	2387.36	2425.46	2331.26	2369.06

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A7 Masele moleculare teoretice corespunzătoare co-poliesterilor și ale aducțiilor de K^+ de tipul $(10HSA/12HSA)_4^-(ECL)_n$

DP	Prođuși liniare			Prođuși ciclici	
	M [g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
5	1262.08	1300.18	1338.28	1244.08	1281.88
6	1376.22	1414.32	1452.42	1358.22	1396.02
7	1490.36	1528.46	1566.56	1472.36	1510.16
8	1604.50	1642.60	1680.70	1586.50	1624.30
9	1718.64	1756.74	1794.84	1700.64	1738.44
10	1832.78	1870.88	1908.98	1814.78	1852.58
11	1946.92	1985.02	2023.12	1928.92	1966.72
12	2061.06	2099.16	2137.26	2043.06	2080.86
13	2175.20	2213.30	2251.40	2157.20	2195.00

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A8 Masele moleculare teoretice corespunzătoare co-poliesterilor și ale aducțiilor de K⁺ de tipul (10HSA/12HSA-ECL)_n

DP	M [g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
2	414,62	452,72	490,82	396,32	434,42
3	697,08	735,18	773,28	678,78	716,88
4	811,22	849,32	887,42	792,92	831,02
5	1207,82	1245,92	1284,02	1189,52	1227,62
6	1604,42	1642,52	1680,62	1586,12	1624,22
7	2001,02	2039,12	2077,22	1982,72	2020,82
8	2397,62	2435,72	2473,82	2379,32	2417,42

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A9 Masele moleculare teoretice corespunzătoare co-poliesterilor și ale aducțiilor de K⁺ de tipul (16HHDA)₁-(ECL)_n

DP	Prođuși liniare			Prođuși ciclici	
	M [g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
2	386,57	424,67	462,77	426,17	464,27
3	500,71	538,81	576,91	540,31	578,41
4	614,85	652,95	691,05	654,45	692,55
5	728,99	767,09	805,19	768,59	806,69
6	843,13	881,23	919,33	882,73	920,83
7	957,27	995,37	1033,47	996,87	1034,97
8	1071,41	1109,51	1147,61	1111,01	1149,11

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A10 Masele moleculare teoretice corespunzătoare co-poliesterilor și ale aducțiilor de K⁺ de tipul (16HHDA)₂-(ECL)_n

DP	Prođuși liniare			Prođuși ciclici	
	M [g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
3	640,97	679,07	717,17	622,67	660,77
4	755,11	793,21	831,31	736,81	774,91
5	869,25	907,35	945,45	850,95	889,05
6	983,39	1021,49	1059,59	965,09	1003,19
7	1097,53	1135,63	1173,73	1079,23	1117,33
8	1211,67	1249,77	1287,87	1193,37	1231,47
9	1325,81	1363,91	1402,01	1307,51	1345,61
10	1439,95	1478,05	1516,15	1421,65	1459,75

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A11 Masele moleculare teoretice corespunzătoare co-poliesterilor și ale aducțiilor de K⁺ de tipul (16HHDA)₃⁻(ECL)_n

DP	Prođuși liniare			Prođuși ciclici	
	M [g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
4	923,47	961,57	999,67	905,17	943,27
5	1037,61	1075,71	1113,81	1019,31	1057,41
6	1151,75	1189,85	1227,95	1133,45	1171,55
7	1265,89	1303,99	1342,09	1247,59	1285,69
8	1380,03	1418,13	1456,23	1361,73	1399,83
9	1494,17	1532,27	1570,37	1475,87	1513,97

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A12 Masele moleculare teoretice corespunzătoare co-poliesterilor și ale aducțiilor de K⁺ de tipul (16HHDA)₄⁻(ECL)_n

DP	Prođuși liniare			Prođuși ciclici	
	M [g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
5	1205,97	1244,07	1282,17	1187,67	1225,77
6	1320,11	1358,21	1396,31	1301,81	1339,91
7	1434,25	1472,35	1510,45	1415,95	1454,05
8	1548,39	1586,49	1624,59	1530,09	1568,19
9	1662,53	1700,63	1738,73	1644,23	1682,33
10	1776,67	1814,77	1852,87	1758,37	1796,47
11	1890,81	1928,91	1967,01	1872,51	1910,61
12	2004,95	2043,05	2081,15	1986,65	2024,75
13	2119,09	2157,19	2195,29	2100,79	2138,89

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A13 Masele moleculare teoretice corespunzătoare co-poliesterilor și ale aducțiilor de K⁺ de tipul (16HHDA-ECL)_n

DP	Prođuși liniare			Prođuși ciclici	
	M [g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
3	640,97	679,07	717,17	622,67	660,77
4	755,11	793,21	831,31	736,81	774,91
5	1123,65	1161,75	1199,85	1105,35	1143,45
6	1492,19	1530,29	1568,39	1473,89	1511,99
7	1860,73	1898,83	1936,93	1842,43	1880,53
8	2229,27	2267,37	2305,47	2210,97	2249,07

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A14 Masele moleculare teoretice corespunzătoare co-poliesterilor și ale aducțiilor de K^+ de tipul $(RCA)_1-(ECL)_n$

DP	Prođuși liniare			Prođuși ciclici	
	M [g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
2	412,60	450,70	488,80	434,42	472,52
3	526,75	564,85	602,95	546,55	584,65
4	640,90	679,00	717,10	660,70	698,80
5	755,05	793,15	831,25	774,85	812,95
6	869,20	907,30	945,40	889,00	927,10
7	983,35	1021,45	1059,55	1003,15	1041,25
8	1097,50	1135,60	1173,70	1117,30	1155,40

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A15 Masele moleculare teoretice corespunzătoare co-poliesterilor și ale aducțiilor de K^+ de tipul $(RCA)_2-(ECL)_n$

DP	Prođuși liniare			Prođuși ciclici	
	M [g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
3	693,05	731,15	769,25	674,75	712,85
4	807,19	845,29	883,39	788,89	826,99
5	921,33	959,43	997,53	903,03	941,13
6	1035,47	1073,57	1111,67	1017,17	1055,27
7	1149,61	1187,71	1225,81	1131,31	1169,41
8	1263,75	1301,85	1339,95	1245,45	1283,55
9	1377,89	1415,99	1454,09	1359,59	1397,69

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A16 Masele moleculare teoretice corespunzătoare co-poliesterilor și ale aducțiilor de K^+ de tipul $(RCA)_3-(ECL)_n$

DP	Prođuși liniare			Prođuși ciclici	
	M [g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
4	975,55	1013,65	1051,75	957,25	995,35
5	1089,69	1127,79	1165,89	1071,39	1109,49
6	1203,83	1241,93	1280,03	1185,53	1223,63
7	1317,97	1356,07	1394,17	1299,67	1337,77
8	1432,11	1470,21	1508,31	1413,81	1451,91
9	1546,25	1584,35	1622,45	1527,95	1566,05
10	1660,39	1698,49	1736,59	1642,09	1680,19

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A17 Masele moleculare teoretice corespunzătoare co-poliesterilor și ale aducțiilor de K^+ de tipul $(RCA)_4-(ECL)_n$

DP	Prođuși liniari			Prođuși ciclici	
	M [g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
5	1258,05	1296,15	1334,25	1239,75	1277,85
6	1372,19	1410,29	1448,39	1353,89	1391,99
7	1486,33	1524,43	1562,53	1468,03	1506,13
8	1600,47	1638,57	1676,67	1582,17	1620,27
9	1714,61	1752,71	1790,81	1696,31	1734,41
10	1828,75	1866,85	1904,95	1810,45	1848,55
11	1942,89	1980,99	2019,09	1924,59	1962,69

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A18 Masele moleculare teoretice corespunzătoare co-poliesterilor și ale aducțiilor de K^+ de tipul $(RCA-ECL)_n$

DP	Prođuși liniari			Prođuși ciclici	
	M [g/mol]	M+K ⁺	M+2K ⁺	M [g/mol]	M+K ⁺
3	693,05	731,15	769,25	674,75	712,85
4	807,19	845,29	883,39	788,89	826,99
5	1201,76	1239,86	1277,96	1183,46	1221,56
6	1596,33	1634,43	1672,53	1578,03	1616,13
7	1990,90	2029,00	2067,10	1972,60	2010,70
8	2385,47	2423,57	2461,67	2367,17	2405,27
9	2780,04	2818,14	2856,24	2761,74	2799,84
10	3174,61	3212,71	3250,81	3156,31	3194,41

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A19 Masele moleculare teoretice corespunzătoare homopolimerilor PCL și ale aducțiilor de Na^+ și K^+

DP	M				
	[g/mol]	M+Na ⁺	M+2Na ⁺	M+K ⁺	M+2K ⁺
2	246,30	268,28	290,26	284,40	322,50
3	360,44	382,42	404,41	398,54	436,64
4	474,58	496,57	518,55	512,68	550,78
5	588,72	610,71	632,69	626,82	664,92
6	702,86	724,85	746,83	740,96	779,06
7	817,00	838,99	860,97	855,10	893,20
8	931,14	953,13	975,11	969,24	1007,34
9	1045,28	1067,27	1089,25	1083,38	1121,48
10	1159,42	1181,41	1203,39	1197,52	1235,62
11	1273,56	1295,55	1317,53	1311,66	1349,76
12	1387,70	1409,69	1431,67	1425,80	1463,90

13	1501,84	1523,83	1545,81	1539,94	1578,04
14	1615,98	1637,97	1659,95	1654,08	1692,18
15	1730,12	1752,11	1774,09	1768,22	1806,32
16	1844,26	1866,25	1888,23	1882,36	1920,46
17	1958,40	1980,39	2002,37	1996,50	2034,60
18	2072,54	2094,53	2116,51	2110,64	2148,74
19	2186,68	2208,67	2230,65	2224,78	2262,88
20	2300,82	2322,81	2344,79	2338,92	2377,02

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A20 Masele moleculare teoretice ale copolimerilor liniari formați din unități de ϵ -caprolactona și δ -gluconolactonă inserată ECL-GL-(ECL) $_n$

DP	Prođuși liniari			Prođuși ciclici	
	M[g/mol]	M+Na ⁺	M+2Na ⁺	M[g/mol]	M+Na ⁺
2	310,30	332,28	354,26	292,00	314,28
3	424,44	446,42	468,40	406,14	428,42
4	538,58	560,56	582,54	520,28	542,56
5	652,72	674,70	696,68	634,42	656,70
6	766,86	788,84	810,82	748,56	770,84
7	881,00	902,98	924,96	862,70	884,98
8	995,14	1017,12	1039,10	976,84	999,12
9	1109,28	1131,26	1153,24	1090,98	1113,26
10	1223,42	1245,40	1267,38	1205,12	1227,40
11	1337,56	1359,54	1381,52	1319,26	1341,54
12	1451,70	1473,68	1495,66	1433,40	1455,68
13	1565,84	1587,82	1609,80	1547,54	1569,82
14	1679,98	1701,96	1723,94	1661,68	1683,96
15	1794,12	1816,10	1838,08	1775,82	1798,10
16	1908,26	1930,24	1952,22	1889,96	1912,24
17	2022,40	2044,38	2066,36	2004,10	2026,38
18	2136,54	2158,52	2180,50	2118,24	2140,52
19	2250,68	2272,66	2294,64	2232,38	2254,66
20	2364,82	2386,80	2408,78	2346,52	2368,80

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

Tabel A21 Masele moleculare teoretice ale poliesterilor liniari de tipul (ECL-GL) $_n$

DP	Prođuși liniari			Prođuși ciclici	
	M[g/mol]	M+Na ⁺	M+2Na ⁺	M[g/mol]	M+Na ⁺
4	922,92	944,69	966,88	904,62	926,39
6	1229,23	1251,00	1273,19	1210,93	1232,70
8	1535,54	1557,31	1579,50	1517,24	1539,01
10	1841,85	1863,62	1885,81	1823,55	1845,32
12	2148,16	2169,93	2192,12	2129,86	2151,63
14	2454,47	2476,24	2498,43	2436,17	2457,94

DP-gradul de polimerizare, M-masa moleculara

LISTA DE LUCRĂRI

1. Lucrări științifice 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 științifice publicate în volumele unor manifestări științifice

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 ϵ -caprolactone and a carbohydrate lactone , 15th European Congress on Biotechnology, 23-26 Septembrie 2012 Istanbul-Turcia, New Biotechnology ISSN:1871-6784, 29S, pagina S53.

ABREVIERI

10HSA	acid 10-hidroxistearic
12HSA	acid 12-hidroxistearic
16HHDA	acid 16-hidroxihexadecanoic
3NH2PrTMOS	3-amino-propil-trimetoxi silan
AMP	nanoparticule magnetice funcționalizate cu grupări amino
AMP-CHT	macroparticule magnetice de chitosan
BL	β -butirolactonă
BSTFA	bis(trimetilsilil)trifluoroacetamidă
CHT	chitosan
CMP	nanoparticule magnetice funcționalizate cu grupărcarboxil
DMeDTMOS	dimetil-dimetoxisilan
ECL	ϵ -caprolactonă
FITC	izotiocianat de fluoresceină
GL	glutaraldehydă
GL	δ -gluconolactonă
HFA	hidroxiacizi grași
iBu-TMOS	izo-butil trimetoxi silan
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight
M_n	masa moleculară medie numerică
M_w	masa moleculară medie gravimetrică
OctMOS	octiltrimetoxisilan
OHaza	oleat hidratază
OHaza-AMP-CHT	oleat hidrataza imobilizată pe compozite magnetice cu chitosan
OHaza-CHT	oleat hidratază imobilizată pe chitosan
OHaza-CMP	oleat hidrataza imobilizată pe nanoparticule magnetice funcționalizate cu grupări carboxil
PCL	poli- ϵ -caprolactonă
PDI	indicele de polidispersitate
PHA	polihidroxiacanoați
PHB	polihidroxi-butirat
RCA	acid ricinoleic
TEOS	tetraetoxisilan
TMOS	trimetoxisilan