

SISTEME BIOCATALITICE PENTRU SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA UNOR BIODERIVAȚI SUSTENABILI

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

Ing. Ioan Bîțcan

Conducător științific: prof.univ.dr.ing Francisc Péter

2023

Cuvânt înainte

Teza de doctorat a fost elaborată în cadrul Școlii Doctorale de Studii Inginerești a Universității Politehnica Timișoara și a Departamentului CAICON al Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului, sub conducerea Domnului Prof. Dr. Ing. Francisc Peter căruia îi adresez mulțumiri deosebite pentru îndrumarea științifică, răbdare, pentru încrederea acordată și pentru gândurile bune și încurajările pe care mi le-a transmis în perioada studiilor de doctorat.

Doresc să mulțumesc membrilor comisiei de îndrumare, Doamna Prof. Dr. Ing. Alina Gabriela Dumitrel, Domnul Conf. Dr. Ing. Mihai Medeleanu și Doamna Ș.I. Dr. ing. Anamaria Todea, pentru observațiile valoroase privind interpretarea rezultatelor, structurarea tezei și prezentarea cât mai clară a rezultatelor.

I would like to express my special gratitude to Prof. Lucia Gardossi, Dr. Anamaria Todea, and the colleagues from the University of Trieste Dr. Federico Zappaterra, Dr. Mariachiara Spennato, and Marco Gianetto, for all their support and the nice moments during my internship. I also would like to acknowledge Dr. Lajos Nagy and Prof. Dr. Sándor Kéki from the University of Debrecen, Hungary, for all their support for the MALDI-TOF MS analysis, as well as Dr. Szilvia Klébert, Dr. Zoltán Károlyi and Dr. Laura Bereczky from the Institute of Materials and Environmental Chemistry, Research Centre for Natural Sciences, Budapest, Hungary, for the XPS analysis.

Mulțumesc cadrelor didactice din cadrul Departamentului CAICON pentru susținere și încurajări, în special Domnilor Ș.I. dr. ing. Valentin Ordodi, Ș.I. Dr. ing. Valentin Badea și Doamnelor Ș.I. Dr. Ing. Iulia Păușescu, Ș.I. Dr. chim Diana Dreavă, Asist. Drd. ing. Ioana Cristina Benea, Ș.I. Dr. Ing. Cristina Paul și Ș.I. Dr.ing. Gerlinde Rusu pentru sfaturile competente și ajutorul acordat în realizarea părții analitice a tezei. Le mulțumesc colegilor din departamentul CAICON, în special Doamnei Sing. Maricica Tako pentru că mi-a fost mereu alături, m-a ajutat și încurajat, cât și Doamnei Ing. Andreea Petrovici pentru sprijinul acordat în realizarea studiilor experimentale.

Le mulțumesc de asemenea domnului Prof. Dr. ing. Eugen Șișu și doamnei Lector Dr. ing. Ramona Buzatu de la Universitatea de Medicină și Farmacie Victor Babeș din Timișoara pentru ajutorul acordat la realizarea analizelor de spectrometrie de masă, pentru sfaturile utile în efectuarea unor studii experimentale și pentru sprijinul moral acordat.

Pentru realizarea tezei am beneficiat de sprijin material în cadrul proiectului "Rețea de excelență în cercetare și inovare aplicativă pentru programele de studii doctorale și postdoctorale/InoHubDoc", Cod proiect POCU/993/6/13/153437, cofinanțat din Fondul Social European prin Programul Operațional Capital Uman 2014-2020, pentru care adresez mulțumiri Directorului de proiect Domnul Prof. Dr. Ing. Liviu Marșavina și tutorelui meu, Doamna Prof. Dr. Ing. Adina Negrea.

Adresez mulțumiri deosebite celor mai importante persoane din viața mea, părinților mei Ioan și Dorina Bîțcan, surorii mele Maria Bîțcan și bunicii mele Rodica Dascălu, care m-au încurajat necondiționat, m-au susținut și au avut încredere în mine pe tot parcursul anilor de studiu.

Timișoara, septembrie 2023

Ioan Bîțcan

Cuprins

1	Studiu de literatură.....	7
1.1.	Importanța temei	7
1.2	Biopolimerii	9
1.2.1	Materii prime pentru obținerea biopolimerilor	12
1.2.2	Enzime utilizate în sinteza polimerilor.....	13
1.2.3	Mecanismul de reacție al lipazelor.....	13
1.2.4	Oportunități de sinteză și importanța poliesterilor obținuți din monomeri derivați din biomasă	15
1.2.5	Tendențe în sinteza catalizată de lipază a poliesterilor și copoliesterilor ϵ -caprolactonei	18
1.2.6	Evoluții în sinteza enzimatică a poliesterilor obținuți cu acid itaconic	22
1.2.7	Sinteza enzimatică de poliesteri biodegradabili pe bază de uleiuri vegetale și hidroxiacizi grași.....	24
1.2.8	Polimeri cu unități furanice sintetizați pe cale biocatalitică	26
1.2.9	Poliesteri sintetizați pe cale enzimatică prin reacții de policondensare a diolilor cu diacizi/diesteri.....	29
1.3.	Metode de degradare a polimerilor	31
1.3.1	Mecanisme de biodegradare.....	33
1.3.2	Factorii care afectează procesul de degradare	34
1.3.3	Metode de monitorizare a biodegradabilității polimerilor	36
1.4	Metode computaționale cu aplicații în biocataliză	39
1.4.1	Dinamica moleculară.....	40
1.4.2	Andocarea	40
1.5	Valorificarea glicerolului	42
1.5.1	Lacazele	45
	Sistemul mediator al lacazelor	46
1.5.2	Aplicații ale lacazelor.....	47
1.5.3	Imobilizarea lacazelor	48
2	Contribuții originale	50
2.1.	Obiectivele tezei de doctorat.....	51
2.2.	Studii computaționale asupra lipazelor din diferite surse microbiene.	53
2.2.1	Calcul de dinamică moleculară pentru lipaza din <i>Candida antarctica</i> B	53

2.2.2	Calculule de dinamică moleculară pentru lipaza din <i>Pseudomonas stutzeri</i>	62
2.2.3	Studii de andocare.....	72
2.3.	Biotransformarea uleiului de ricin în oligomeri nesaturați cu unități furanice prin metoda „one-pot”, utilizând lipaze native și imobilizate.....	74
2.3.1	Sinteza enzimatică a poli(5-hidroximetil-2-furancarboxilat-co-ricinoleatului) în sistem „one-pot” utilizând uleiul de ricin ca materie primă	75
2.3.2	Optimizarea parametrilor de reacție ai procesului „one-pot” printr-un program experimental factorial.....	78
2.3.3	Analiza suprafeței de răspuns și analiza graficelor de contur	81
2.3.4	Caracterizarea structurală a produșilor de reacție	82
2.3.5	Proprietățile termice ale copolimerilor RCA-CO-HFA	84
2.3.6	Obținerea organogelurilor. Testarea proprietăților termice, mecanice, reologice	85
2.3.7	Stabilitatea termică a organogelurilor.....	86
2.3.8	Caracterizarea morfologică a organogelurilor.....	87
2.4.	Sinteza enzimatică și caracterizarea unor oligoesteri ai acidului adipic cu dioli alifatici, ciclici, sau aromatici	89
	Evaluarea selectivității lipazelor față de diferiți dioli alifatici, ciclici și aromatici în reacții de poliesterificare.....	89
2.4.1	Influența biocatalizatorului asupra gradului de polimerizare	89
2.4.2	Efectul mediului de reacție asupra gradului de polimerizare	90
2.4.3	Influența temperaturii de reacție asupra gradului de polimerizare	92
2.4.4	Caracterizarea structurală a produșilor de reacție	93
2.4.5	Caracterizarea produșilor de reacție prin analiză termică	95
2.5.	Evaluarea impactului ecologic al unor oligoesteri obținuți pe cale enzimatică: studii de biodegradare în medii lichide cu apă dulce și apă sărată	99
2.6.	Oxidarea enzimatică a glicerolului utilizând lacaze imobilizate prin legare covalentă.....	105
2.6.1	Analiza structurală și de suprafață a lacazelor	105
2.6.2	Selecția lacazelor native pentru oxidarea glicerolului	106
2.6.3	Efectul inițiatorilor asupra reacției de oxidare a glicerolului catalizată de lacazele din TvL și AspL	108
2.6.4	Imobilizarea lacazelor prin legarea covalentă pe rășini metacrilice și suporturi magnetice funcționalizate	109

2.6.5 Imobilizarea lacazelor prin legarea covalentă pe rășini metacrilice funcționalizate cu grupări amino și epoxidice.....	110
2.6.6 Imobilizarea lacazelor prin legarea covalentă pe suporturi magnetice funcționalizate cu grupări aminice.....	110
2.6.7 Profilurile de pH și temperatură ale lacazelor native și imobilizate.....	111
2.6.8 Stabilitatea operațională a lacazelor imobilizate în cicluri de reacție consecutive 113	
2.6.9 Caracterizarea lacazelor imobilizate.....	116
2.6.10 Oxidarea glicerolului folosind lacazele imobilizate.....	120
2.6.11 Stabilitatea operațională a lacazei TvL@MG-Zn ₂ imobilizate în cicluri repetitive de oxidare a glicerolului.....	121
2.7. Evaluarea enantioselectivității lipazei din <i>Ps. stutzeri</i> pentru rezoluția cinetică a unui cetoalcool secundar heterociclic.....	123
2.7.1 Optimizarea metodei de analiză a 2,2'-furoinului prin cromatografie chirală de lichide de înaltă performanță.....	123
2.7.2 Influența mediului de reacție asupra reacției de acilare enantioselectivă....	125
2.7.2 Studiul reacției de acilare în timp utilizând lipaza din <i>Ps. stutzeri</i> nativă.....	127
2.7.3 Influența naturii și imobilizării biocatalizatorului asupra reacției de acilare enantioselectivă.....	127
2.7.4 Studiul reutilizării preparatului imobilizat 5PS în reacția de acilare.....	129
3 Partea experimentală.....	130
3.1. Materiale.....	130
3.2. Polimerizare fără solvenți.....	130
3.3. Sinteza enzimatică a copolimerilor în reacție de tip cascadă.....	131
3.4. Analiza structurală a produșilor de reacție.....	131
3.5. Cromatografia cu permeație pe gel.....	131
3.6. Analiză termică.....	132
3.7. Sinteza oligoesterilor acidului adipic.....	132
3.8. Studii de biodegradare.....	132
3.9. Obținerea unor organogeluri utilizând solvenți organici.....	132
3.10. Prepararea particulelor magnetice.....	132
3.11. Imobilizarea lacazelor.....	133
3.12. Determinarea activității pentru enzimele native și imobilizate.....	133
3.13. Obținerea modelelor tridimensionale ale lacazelor.....	134

3.14. Profilurile pH ale enzimelor native și immobilizate	134
3.15. Profilele de temperatură ale enzimelor native și immobilizate.....	134
3.16. Reutilizarea lacazelor immobilizate	134
3.17. Oxidarea enzimatică a glicerolului	134
3.18. Caracterizarea clusterilor magnetici funcționalizați prin spectroscopie de fotoelectroni cu raze X (XPS)	135
3.19. Analiza morfologiei suprafeței prin microscopie electronică de baleiaj	135
3.20. Optimizarea metodei de analiză HPLC chirală a enantiomerilor 2,2'-furoinului	135
3.22. Immobilizarea lipazelor prin metoda sol-gel	137
3.23. Influența mediului de reacție asupra reacției de acilare	137
3.24. Studiul reacției de acilare a 2,2'-furoinului în timp	137
3.25. Studiul reutilizării preparatului enzimatic de lipază în reacția de acilare a 2,2'-furoinului	137
4 Concluzii finale și contribuții originale	139
5. Bibliografie	144
LISTA DE LUCRĂRI	176

1 Studiu de literatură

1.1. Importanța temei

Biotransformările sunt bioprocese ecologice avantajoase comparativ cu metodele chimice convenționale, deoarece sunt realizate în condiții blânde, cu cerințe energetice mai reduse, oferind tehnologii curate din punct de vedere ecologic și de multe ori ating eficiențe catalitice ridicate, selectivitate și procesare simplă.

Provocările chimiei verzi și a biotehnologiei industriale se referă la variante care să ofere avantaje economice semnificative folosind procese durabile, pentru a le înlocui pe cele care sunt utilizate în prezent pe scară largă în industrie, sau să includă noi procese de recuperare a deșeurilor care integrează conceptul de biorafinare pentru o economie circulară. Mai mult, valorificarea subproduselor industriale poate avea o importanță semnificativă în viabilitatea economică și sustenabilitatea acestor procese. Una dintre sursele identificate de emisii de gaze cu efect de seră este utilizarea combustibililor fosili, direct corelată cu încălzirea globală și schimbările climatice. Printre alte politici, țările s-au angajat să intensifice utilizarea surselor de energie regenerabilă, de exemplu biodieselul reprezentând un potențial semnificativ pentru durabilitate și creștere economică. În mod paradoxal, aceste schimbări industriale și în structura producției implică adesea probleme care pot amenința sustenabilitatea soluțiilor propuse [1].

Biocataliza a devenit o parte importantă a sintezei organice moderne, atât în cercetarea fundamentală cât și în industria chimică și farmaceutică.

Biocataliza poate fi definită ca utilizarea unei enzime pentru cataliza unor reacții chimice. Încă din cele mai vechi timpuri biocataliza a fost folosită în diverse procese alimentare (fabricarea de bere, panificație, vinificație), fără a se cunoaște natura enzimatică a proceselor respective.

Utilizarea enzimelor în domeniul chimiei are de asemenea o vechime considerabilă, iar azi regăsim enzimele în industria alimentară, textilă, dar și în cea a detergenților. Impactul major al biocatalizei nu a fost însă în nici unul din domeniile menționate ci în cel al industriei farmaceutice, mai ales la începutul secolului 21. La ora actuală, enzimele concurează cu metodele chimice tradiționale pentru o gamă largă de reacții chimice [2].

Succesul biocatalizei din ultimul deceniu s-a datorat în mare parte unei extinderi rapide a gamei de reacții chimice accesibile, realizată prin intermediul instrumentelor pentru descoperirea enzimelor cuplate cu tehnici de evoluție pentru optimizarea biocatalizatorilor și realizate în laboratoare de mare capacitate. O gamă largă de enzime personalizate, cu eficiențe și selectivități ridicate, pot fi acum obținute rapid și la scară de la gram la kilogram, folosind baze de date dedicate și instrumente de căutare menite să facă acești biocatalizatori accesibili unei comunități științifice mai largi [3].

În ultimii ani, interesul pentru biocataliză s-a extins în tot domeniul chimiei verzi, având ca scop realizarea de procese industriale cu impact redus asupra mediului.

Avantajele potențiale ale enzimelor în termeni catalitici sunt specificitatea și capacitatea lor de a lucra la temperatură ambiantă în soluții apoase. Cu toate acestea, utilizarea enzimelor în chimia organică are anumite dezavantaje: stabilitate scăzută la temperaturi ridicate și în solvenți organici. Mai mult, cerința de a funcționa într-o soluție apoasă a fost problematică atunci când au fost utilizate concentrații mari de reactanți cu solubilitate scăzută. Lucrarea de pionierat a lui Klivanov [4] a arătat că enzimele pot funcționa și în medii organice. Aceasta, precum și lucrările conexe, au condus la o extindere treptată a utilizării enzimelor în sinteza organică, iar astăzi ele sunt din ce în ce mai folosite pentru a efectua transformări industriale [3].

Un factor cheie în modificarea stabilității și funcționalității enzimelor, pentru a le permite să funcționeze pe noi substraturi, a fost mutageneza dirijată *in situ*, combinată cu instrumente de modelare moleculară. Mutageneza poate fi utilizată pentru creșterea stabilității enzimelor în solvenți organici sau la temperaturi ridicate, precum și pentru a modifica specificitatea situsului activ.

Stabilitatea enzimelor poate fi îmbunătățită și prin imobilizarea pe suporturi unde, datorită mai multor puncte de atașare, lanțul proteic devine mai rezistent la denaturare [5]. Mai recent, conștientizarea faptului că enzimele pot cataliza reacții în lichide ionice și în solvenți eutectici a condus la extinderea în continuare a gamei de aplicații ale enzimelor în sinteza organică [6].

O altă dezvoltare recentă a biocatalizei a constat în realizarea reacțiilor în cascadă enzimatică. Aceste reacții implică mai mult de o enzimă care efectuează reacții în secvență. Provocările unor astfel de sisteme constau în compatibilitatea substraturilor cu enzimele utilizate și în recuperarea produsului din amestecuri complexe. În ciuda provocărilor, s-au înregistrat progrese considerabile în sinteza enzimatică în mai multe etape [5].

Cele mai importante enzime comerciale, cu peste 90% din cota de piață sunt enzimele hidrolitice: lipazele, proteazele, glicozidazele și alte hidrolaze, care sunt utilizate în principal în detergenți, hrană pentru animale, producția de bioetanol, producția de îndulcitori, industria băuturilor și a alimentelor, industria celulozei și hârtiei, industria textilă. Există însă și o serie de oxidoreductaze, liaze și izomeraze utilizate pe scară largă. În Tabelul 1 sunt incluse exemple de enzime și aplicații ale acestora.

Tabelul 1 Exemple de enzime industriale și aplicații ale acestora [7]

Enzima	Aplicații
Acetolactat decarboxilază	obținerea berii și a vinului pentru a reduce timpul de maturare
Alcool dehidrogenaza Amilaze și glucoamilaze	sinteza de compuși chirali. sunt cele mai importante enzime în funcție de volum și cota de piață, cu o gamă largă de aplicații pentru obținerea de biocombustibili, sirop de porumb cu conținut ridicat de fructoză, etc.
Catalaza	are multe aplicații în fabricarea brânzeturilor, prepararea bumbacului pentru vopsire, degradarea apei oxigenate folosite pentru înălbirea sau dezinfectarea materialelor, industria alimentară.
Cutinaza	are proprietăți hidrolitice similare cu ale lipazelor și esterazelor și aplicații potențiale în industria alimentară, cosmeticelor, pesticide, degradarea hidrolitică a polietilen tereftalatului (PET).
β -Galactozidaza	se folosește în industria alimentară pentru produsele fără lactoză.

Invertaza	hidrolizează zaharoza la zahăr invertit (fructoză și zaharoză), care se folosește pentru siropul de glucoză-fructoză.
Lacaza	este o oxidoreductază utilizată în industria hârtiei, textilă, aromelor și parfumurilor, industria alimentară, la epurarea apei reziduale.
Termolisina	este o metaloprotează utilizată în producția aspartamului.
Lipaza	utilizată în industria textilă, alimentară, detergenți, sinteză organică

1.2 Biopolimerii

Polimerii naturali sau de natură petrochimică formează baza materialelor utilizate în general în viața de zi cu zi, ca părți constitutive ale alimentelor, hainelor, locuințelor, medicamentelor, dispozitivelor medicale, ambalajelor, automobilelor, infrastructurii, telecomunicațiilor și multor altele. Polimerii sunt omniprezenti în natură [8].

Mii de polimeri se regăsesc în plante, animale și microorganisme, unde joacă roluri majore ca elemente structurale (de exemplu, celuloza și lignina în copaci și plante, chitina în exoscheletul crabilor, creveților, insectelor și pereților celulari ai ciupercilor, colagenul și hialuronanul în spațiul extracelular și țesuturile conjunctive din corpurile umane și animale), sau materiale de apărare (de exemplu, latex/cauciuc în copaci și plante cu flori, capsule de hialuronan în microorganismele patogene), printre alte funcții [9], [10].

Din cele mai vechi timpuri, oamenii s-au bazat pe polimerii naturali pentru a-și asigura nevoile, deoarece mătasea, lâna și fibrele de celuloză erau folosite pentru a produce pânze, covoare, pături și frânghii. Dezvoltarea industriei petrochimice a adus timp de câteva decenii polimerii sintetici în top, dar poziția lor dominantă a început să se schimbe atunci când s-au pus în evidență biodegradabilitatea lentă, epuizarea resurselor de petrol și dezvoltarea unor căi de obținere utilizând materii prime biodegradabile [11].

În zilele noastre, din motive evidente (preocuparea publicului față de mediu și reducerea dependenței de resursele limitate de combustibili fosili), plasticele obținute din materiale biodegradabile sunt din ce în ce mai studiate. În ultimii ani s-a observat o creștere accelerată a comercializării acestora, de ex. acid polilactic, polihidroxiclcanoati și, mai recent, succinat de polibutilenă [12]. Capacitatea de producție a polimerilor biodegradabili este în continuă creștere iar până în 2027 se estimează o creștere la aproximativ 6,3 milioane de tone [13].

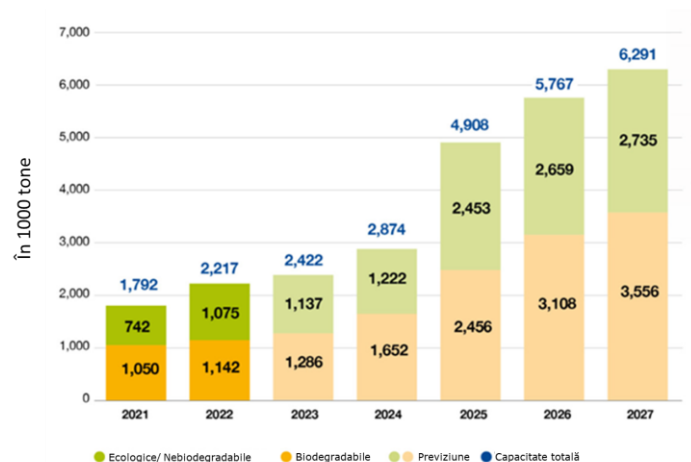


Figura 1 Estimarea producției de bioplastice la nivel global [13]

Scopul este valorificarea potențialului tehnic de substituire totală a polimerilor biodegradabili, înlocuind 90% din totalul polimerilor (și fibrelor) obținuți din petrol [14]. În acest sens, producția de monomeri adecvați din resurse regenerabile provenite din biomasă oferă o oportunitate promițătoare de a îmbunătăți parametrii economici și sustenabilitatea. În fiecare an, aproximativ 170 de miliarde de tone de biomasă sunt produse în natură; din aceasta doar 3,5% sunt utilizate în prezent [15].

Materialele plastice biodegradabile (BP) au generat mult interes, fiind considerate o contribuție ecologică la soluționarea problemelor derivate din eliminarea deșeurilor din plastic. Există mai multe materiale plastice biodegradabile de tip poliesteri care prezintă proprietăți comparabile cu cele convenționale, cum ar fi polihidroxialcanoatii (PHA), polipropiolactona (PPL), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), acidul poli(L-lactic) (PLA), poli(butilen succinatul) (PBS), poli(etilen succinatul) (PES) și poli(ester carbonatul) (PEC), precum și co-poliesteri care conțin componente alifatic și aromatice, cum ar fi poli(butilen adipat-co-tereftalat) (PBAT), poli(butilen succinat-co-tereftalat) (PBST) și poli(butilen adipat tereftalat) (PBAT).

Cu toate acestea, poliesterii care conțin numai componente aromatice sunt mai recalcitranti la biodegradare, cum ar fi poli(etilen tereftalatul) (PET), poli (butilen tereftalatul) (PBT) și poli(trimetilen tereftalatul) (PTT). Poliesterii pot fi produși din combustibili fosili (cum ar fi PBS, PCL și PES), biomasă (PLA și PHA), sau din ambele resurse (PET și bio-PET). Aplicațiile lor variază de la folii de mulcire, saci de compost, folii transparente pentru ambalarea alimentelor, țesături din poliester, ambalaje și alte rășini biodegradabile. Microorganismele care degradează poliesterii pot fi cultivate folosind medii solide care conțin polimeri emulsionați. În acest sens, zonele de halo clare în jurul coloniilor se formează atunci când microorganismele excretă enzime extracelulare care difuzează prin agar și degradează polimerul în compuși solubili în apă [16].

Este important ca materialele plastice biodegradabile să aibă aceleași proprietăți și performanțe ca și omologii lor nebiodegradabili și ca majoritatea materialelor plastice nebiodegradabile să poată fi înlocuite cu altele biodegradabile pentru a elimina amenințarea actuală pentru mediu. PLA are o capacitate minoră de a înlocui polimerii comerciali, cum ar fi PET, poliamida (PA), poli(metacrilatul de metil) (PMMA) și PP [17]. Cu toate acestea, PLA are foarte puține perspective de a concura

cu poli(clorura de vinil) (PVC) și policarbonatul (PC), care dețin aproximativ 65% din piața plasticului transparent, datorită proprietăților avantajoase ale acestor doi polimeri comerciali, cum ar fi transparența și duritatea bună, precum și punctului de înmuiere (120°C) al PC-ului.

Unele proprietăți ale PLA, cum ar fi rezistența la impact, duritatea, rigiditatea și elasticitatea sunt similare cu cele ale PET-ului, iar PLA are o rezistență UV mult mai mare decât PET-ul, prin urmare, poate fi folosit într-o oarecare măsură ca înlocuitor pentru PET. Cu toate acestea, PLA încă nu poate atinge rezistența la impact și rezistența termică a PET-ului. PLA are proprietăți bune de barieră la apă, ceea ce îi extinde aplicarea în industria de ambalare, în special pentru ambalarea pâinii calde. Totuși, granulele de PLA sunt higroscopice în comparație cu PP și necesită mai multă atenție la manipulare. De asemenea, în comparație cu PP și polietilena (PE), PLA are o rezistență mai mare la oboseală și rezistență la căldură, fiind considerat superior pentru anumite aplicații din domeniul ambalajelor, dar până acum există doar o substituție limitată. În plus PLA este mai rigid și are un modul mai mare și rezistență la grăsimi decât polietilena de joasă densitate (LDPE) și polietilena de înaltă densitate (HDPE). În ce privește potențialul de substituție al polihidroxicanoatilor (PHA) se consideră că PP și HDPE pot fi înlocuite cu PHB. Copolimerii PHA cu lungime de catenă lungă și medie au, de asemenea, potențialul de a înlocui LDPE, HDPE și PP și un potențial limitat de a înlocui poliuretanul (PU), PET și PVC [17]. Cu toate acestea, permeabilitatea la oxigen a P(3HB) este de 40 de ori mai mică decât cea a PE și de aproximativ două ori mai mică decât cea a PET. PHB prezintă proprietăți de barieră la vapori, mirosuri și grăsimi mai bune decât PP, ceea ce face ca PHB să fie mai bun decât materialele plastice comerciale actuale în ceea ce privește ambalarea produselor sensibile la oxigen, cum ar fi alimentele și băuturile [21]. PP și PHB sunt relativ similare în privința anumitor proprietăți fizice cum ar fi rezistența la tracțiune, masa moleculară, cristalinitatea și punctul de topire, dar PHB are o rezistență mai bună la căldură (130 °C) și la lumină UV.

În ciuda tuturor proprietăților excelente ale PHB, utilizarea industrială a acestui polimer este încă limitată din cauza ductilității scăzute, a rezistenței slabe la impact și pentru că se descompune cu aproximativ 10°C peste punctul său de topire, ceea ce provoacă dificultăți în prelucrarea lui. În Tabelul 2 sunt prezentate proprietățile fizice ale PHB și PP.

PBS pare promițător pentru a înlocui PET și PP în aplicații precum ambalarea produselor în pungă. Există o substituție ridicată a LDPE și HDPE cu PBS în anumite aplicații [17], deoarece PBS are proprietăți care îi permit să fie utilizat în mai multe sectoare, cum ar fi clădiri, articole de uz casnic, mobilier și agricultură [18].

Tabelul 2 Proprietățile fizice ale polimerului biodegradabil, polihidroxibutirat (PHB) și polimerului comercial, polipropilenă (PP) [17],[19].

Proprietăți	PP	PHB
Punct de topire (°C)	176	171-180
Rezistența la raze UV	Slabă	Bună
Densitate (g/cm ³)	0,905	1,17–1,25
Rezistență la tracțiune (MPa)	38	18–27
Extensia la rupere (%)	400	8
Temperatura de tranziție sticloasă (°C)	-10	2-3

1.2.1 Materii prime pentru obținerea biopolimerilor

Materiile prime regenerabile reprezintă o alternativă pentru înlocuirea celor obținute din surse petroliere în industria maselor plastice prin utilizarea unor monomeri derivați din biomasă. Această înlocuire a materialelor derivate din petrol și utilizarea lor reprezintă unul dintre cele 12 principii ale chimiei verzi [20]. Din acest motiv, polimerii derivați din materii prime regenerabile devin o opțiune tot mai importantă pentru industria materialelor plastice. În ciuda dezvoltării remarcabile în domeniul producției polimerilor prin biotehnologie albă [21], nu trebuie neglijată implicarea chimiei tradiționale, întrucât sinergiile dintre chimie și biotehnologie permit exploatarea deplină a complexității chimice a materiilor prime bioderivate, de ex. monomerii regenerabili pot deveni disponibili prin modificarea chimică a substraturilor naturale sau pot fi produși prin fermentație [22].

Cercetările din ultimul deceniu s-au adresat dezvoltării și/sau îmbunătățirii (bio)proceselor pentru a produce atât polimeri biodegradabili cât și monomeri biodegradabili, dintre care acidul lactic, acidul succinic și 1,3-propandiolul s-au dovedit a fi de real succes [23].

Gama de monomeri derivați din surse regenerabile se extinde însă mult dincolo de aceste exemple și crește continuu. Chiar dacă multe materii prime regenerabile, cum ar fi uleiurile vegetale, lignina, terpenele, aminoacizii sau chiar dioxidul de carbon au fost folosite ca materii prime pentru biopolimeri inovatori, carbohidrații reprezintă cea mai importantă sursă [24]. Un articol recent [25] a evidențiat principalele abordări (chemo)-enzimatice ale monomerilor biodegradabili cu valoare mare și structuri diverse.

În mod evident, înlocuirea polimerilor obținuți din materiale petrochimice, fabricați la scară largă, cu materiale obținute din surse regenerabile reprezintă ținta principală în viitor [26]. Această dezvoltare nu se limitează la materialele plastice de bază, deoarece un număr tot mai mare de polimeri au fost sintetizați și din surse regenerabile de monomeri folosind căi chimice, chemoenzimatice sau biocatalitice.

Cererea consumatorilor pentru noi produse medicale și cosmetice va fi principalul obiectiv a dezvoltării acestui sector. Sectorul farmaceutic este deja unul dintre principalii beneficiari ai chemoselectivității ridicate, regioselectivității și stereoselectivității reacțiilor biocatalitice [27].

De exemplu, poliesterii obținuți din acizi dicarboxilici și dioli sunt printre cele mai promițătoare materiale plastice verzi (ecologice) pentru diverse aplicații biomedicale, inclusiv administrarea controlată a medicamentelor [28], [29], ingineria țesuturilor, implanturile temporare sau vindecarea rănilor [30].

Pe lângă polimerii naturali, care sunt utilizați pe scară largă în industria cosmetică, cele mai recente evoluții din acest sector includ compuși și biopolimeri obținuți din nanoceluloză [31] sau materiale plastice pentru ambalaje cosmetice [32].

Utilizarea biocatalizatorilor în procesele industriale progresaază în direcții de eco-compatibilitate și rentabilitate [33]. Procesele biocatalitice răspund nevoilor de durabilitate, prin dezvoltarea unei chimii mai sigure și mai prietenoase cu mediul, care integrează în mod egal prioritățile competitivității economice și preocupările societale, permițând, de asemenea, proiectarea unei noi generații de polimeri [33], [34].

1.2.2 Enzime utilizate în sinteza polimerilor

Sinteza enzimatică a polimerilor, în special a poliesterilor, a fost amplu studiată în ultimii ani. Avantajele polimerizării catalizate de enzime includ: condițiile blânde de reacție, selectivitate ridicată, cantitate redusă de produși secundari de reacție, activitate catalitică ridicată față de macrolactone, absența urmelor de catalizatori metalici [35].

Variantele cele mai studiate de polimerizare enzimatică includ: policondensarea, polimerizarea oxidativă și reacțiile de polimerizare cu deschidere de ciclu a lactonelor [36]. În Tabelul 3 sunt incluse clasele de enzime cel mai des implicate în reacțiile de polimerizare, precum și tipurile de polimeri rezultați.

Tabelul 3 Sinteza polimerilor pe cale enzimatică

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

1.2.3 Mecanismul de reacție al lipazelor

Mecanismul reacției de esterificare catalizate de lipaze (Figura 2) este similar cu mecanismul general 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. [7]

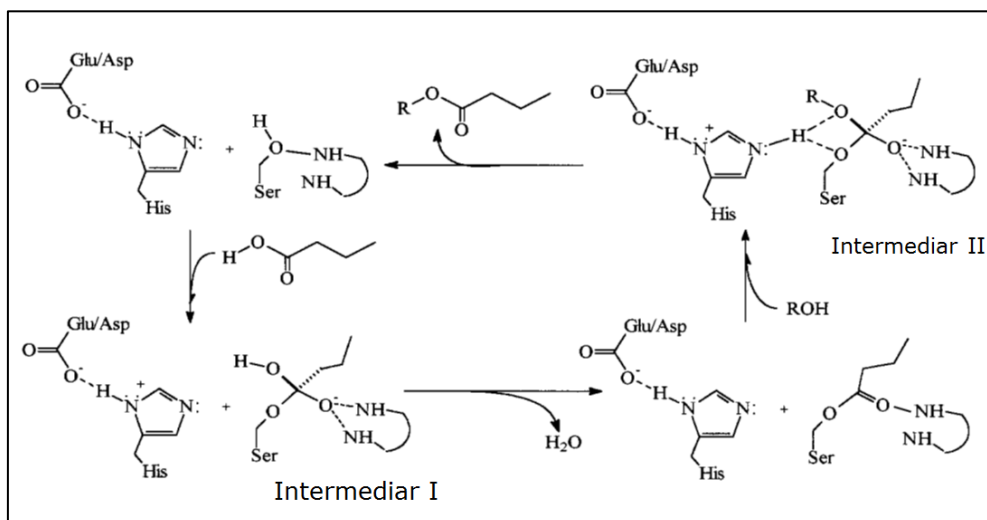


Figura 2 Mecanismul de reacție al lipazelor [7]

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 lipazele microbiene au fost împărțite în 3 grupe. Valorile PSI din primul grup au 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 determinat 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 [37].

O altă clasificare a fost raportată de Pleiss și colab. [38], care au împărțit lipazele în trei subgrupe pe baza geometriei și a situsului de legare:

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

Utilizarea lipazelor ca și catalizatori pentru reacțiile de polimerizare a intrat treptat în atenția cercetătorilor în ultimele două decenii, dovedită de numărul tot mai mare de publicații pe această temă, exemplificate de excelentele lucrări ale lui Kobayashi și colab. [39]–[43], precum și ai altor autori [44]–[47].

Strategiile biocatalitice care utilizează lipaze au devenit alternative biodegradabile importante pentru metodele convenționale de polimerizare, deoarece acestea prezintă o serie de dezavantaje legate de prezența urmelor de catalizator metallic în produs, toxicitate și temperaturi de reacție ridicate [28]. În plus, este posibilă și funcționalizarea unor polimeri ca acidul polilactic [48] sau policaprolactona [49], [50] folosind lipaze, rezultând proprietăți îmbunătățite de administrare a medicamentelor în sistemele care necesită o hidrofilicitate mai mare.

În acest capitol sunt prezentate unele dintre cele mai recente tendințe și cercetări privind sinteza enzimatică a polimerilor obținuți din monomeri derivați din biomasă, cum ar fi ϵ -caprolactona, acidul itaconic, hidroxiacizii grași, monomerii care conțin furan și derivații de aminoacizi (Figura 3).

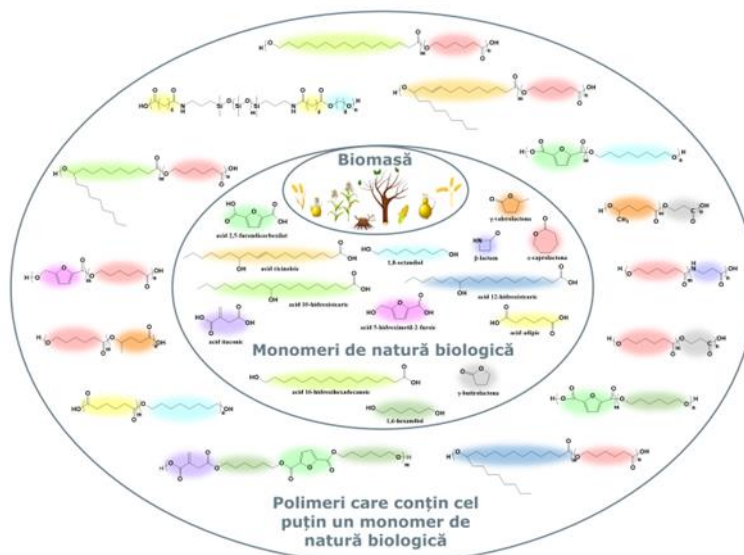


Figura 3 Exemple de polimeri sintetizați prin căi sintetice biocatalitice din monomeri biodegradabili obținuți din materii prime regenerabile.

În cele ce urmează, va fi discutată conversia biocatalitică a acestor monomeri în poliesteri folosind lipaze ca biocatalizatori. Integrarea producției de monomeri biodegradabili cu etapa de polimerizare biocatalitică poate oferi o cale biocatalitică complet verde către polimerii biodegradabili.

1.2.4 Oportunități de sinteză și importanța poliesterilor obținuți din monomeri derivați din biomasă

Poliesterii sunt o clasă de polimeri care conțin grupa funcțională esterică. Având în vedere disponibilitatea mai multor monomeri biodegradabili pentru sinteza lor, se poate afirma că poliesterii reprezintă o clasă promițătoare de polimeri obținuți din resurse regenerabile [51].

Sinteza poliesterilor poate fi abordată pe două căi: (i) polimerizarea cu deschidere de ciclu a monomerilor ciclici (lactone, diesteri ciclici și acetalici ciclici de cetenă); (ii) policondensarea în trepte fie a diacizilor, fie a diesterilor cu dioli sau polialcoolii, respectiv policondensarea hidroxiacizilor sau hidroxiesterilor (Figura 4) [47], [52].

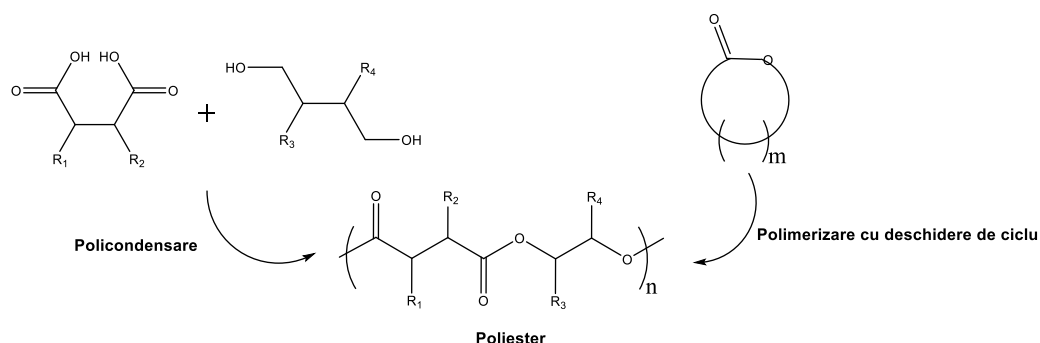


Figura 4 Căi de sinteză a poliesterilor.

Polimerizarea cu deschidere de ciclu a esterilor ciclici este o metodă viabilă și dinamică pentru sinteza poliesterilor. Această strategie este într-o expansiune constantă pe măsură ce noi monomeri biodegradabili apar ca alternativă îmbunătățită pentru sinteza verde a poliesterilor [53].

Metodologia de policondensare este avantajată de gama largă de monomeri și scheme de reacție disponibile. În ultimii ani a fost intens investigată, deoarece poate fi aplicată pentru o varietate de diacizi/diesteri simpli cu dioli (monomeri de tip AA+BB) împreună cu utilizarea hidroxiacizilor (monomeri de tip AB) sau reacții de transesterificare simple [54]–[56].

Cei mai studiați poliesteri biodegradabili sunt: acidul poliglicolic (PGA), acidul polilactic, poli(lactidă-co-glicolida), poli(ϵ -caproctona), poli(ω -pentadecalactona), poli(hidroxiacanoații), poli(dioxanona) și poli(etilen succinatul) [57]–[60]. Au fost identificate numeroase aplicații pentru acești polimeri biodegradabili, ca sisteme de eliberare treptată a compușilor bioactivi, în ingineria țesuturilor, ca sisteme care imită matrici extracelulare, sau pentru obținerea de spume cu memorie [61]–[65].

În ceea ce privește catalizatorii utilizați pentru formarea poliesterilor, folosirea *in vitro* a enzimelor prezintă un progres în comparație cu variantele chimice de cataliză, permițând sinteza poliesterilor funcționalizați, structurați și biodegradabili prin metodologii sintetice foarte selective, cu consum scăzut de energie și folosind procese de sinteză prietenoase cu mediul înconjurător.

Industria polimerilor poate beneficia de progresele biotehnologice actuale care permit producerea de poliesteri de înaltă calitate cu proprietăți funcționale și structurale noi. Întrucât enzimele implicate în sinteza poliesterilor catalizează și hidroliza legăturilor esterice, poliesterii obținuți prin biocataliză au proprietăți biodegradabile [46], [66].

În consecință se poate afirma că utilizarea biocatalizatorilor pentru sinteza poliesterilor deschide perspective semnificative pentru stabilirea unui sistem durabil de reciclare a polimerilor [67].

Polimerii utilizați în medicină trebuie să îndeplinească o serie de condiții obligatorii, precum: biocompatibilitate, biodegradabilitate, nontoxicitate și nonimunogenitate [68].

Scopul principal al sistemelor de administrare a medicamentelor este de a maximiza efectul terapeutic și de a minimiza efectele secundare ale acestora [69], [70]. Polimerii speciali sintetizați pe cale biocatalitică pot răspunde acestor cerințe

prin flexibilitatea structurală a lanțului polimeric și prin funcționalizarea cu substituenți adecvați.

Cele mai relevante enzime implicate în reacții de polimerizare extracelulare sunt lipazele (EC 3.1.1.3). În natură, lipazele catalizează în mod natural hidroliza esterilor glicerolului cu acizi grași. Formarea legăturii esterice poate fi realizată prin deplasarea echilibrului reacțiilor într-un mediu lipsit de apă, împreună cu inhibarea formării produșilor secundari de reacție [71].

O clasă de monomeri biodegradabili adecvați pentru sinteza poliesterilor este reprezentată de acizii organici obținuți din monozaharide prin conversia biologică sau chimică a biomasei. Exemple de asemenea monomeri obținuți din resurse regenerabile sunt acidul adipic, acidul succinic, acidul lactic, acidul fumaric, acidul levulinic, acidul citric și acidul itaconic [51], [72], [73].

În cele mai multe cazuri, acizii carboxilici sunt obținuți prin fermentația carbohidraților, în special a glucozei. Sursele de biomasă care pot fi transformate în glucoză includ amidonul, celuloza, zaharoza și lactoza, iar glucoza este la rândul ei transformată în monomeri pentru poliesteri. Conversia se poate realiza prin hidroliză enzimatică sau prin transformarea chimică a biomasei lemnoase, evitând utilizarea materiilor prime din culturile alimentare [74].

Derivații de furan obținuți din carbohidrați derivați din biomasă, cum sunt hidroximetilfurfuralul (HMF) și furfuralul (FAL), pot fi de asemenea înlocuitori durabili pentru monomerii obținuți din petrol [75], pentru a produce alcooli și acizi organici adecvați pentru sinteza poliesterilor. Ca derivați importanți ai furanului, acidul furoic (FA) și acidul 5-hidroximetil-2-furancarboxilic (5OH2FA) sunt produși de oxidare ai FAL și, respectiv, HMF.

O altă clasă de monomeri obținuți din surse de biomasă sunt diolii cu catenă scurtă, cum ar fi 1,3-propandiol, 1,4-butandiol, izobutanol, sorbitol, etilen glicol, precum și izosorbidă, izomanidă și izoididă, produse de deshidratare ale sorbitolului și manitolului. Materiile prime menționate sunt potrivite pentru sinteza poliesterilor, fiind produse prin metode microbiene [48], [51], [68], [76].

Monomerii care dețin caracteristici adecvate pentru polimerizarea cu deschidere de ciclu includ o serie de lactone, lactide și macrolide de la dimensiuni mici până la dimensiuni mari. Lactonele pot polimeriza prin deschiderea ciclului catalizată de lipaze, iar gradul lor de polimerizare depinde de sursa de proveniență a enzimei [54], [77].

În ultimii ani, un mare număr de lactone, nesubstituite sau substituite, de diferite dimensiuni ale moleculei au fost polimerizate sau copolimerizate de lipaze de origine diferită [27]. Exemplele includ β -propiolactona, α -metil- β -propiolactona, α -dodecenil- β -propiolactona, β -butirolactona, γ -butirolactona, β -malolactona de benzil, β -malolactona de benzil, δ -valerolactona, γ -valerolactona, α -metil- δ -valerolactona, ϵ -caprolactona, α -metil- ϵ -caprolactona, γ -metil- ϵ -caprolactona și ω -pentadecalactona [54]–[56], [73], [78].

Lactida (dimerul acidului lactic) este una dintre cele mai promițătoare surse de monomeri pentru sinteza poli(lactidei) sau PLA în reacția de polimerizare cu deschidere de ciclu [79]. Macrolidele disponibile ca monomeri pentru reacțiile de polimerizare sunt lactone cu dimensiuni mai mari, inclusiv 11-undecanolidă (UDL), 12-dodecanolidă (DDL), 15-pentadecanolidă (PDL) și 16-hexadecanolidă (HDL) [43].

Anumite lactone, cum ar fi γ -butirolactona, γ -valerolactona, δ -valerolactona și ϵ -caprolactona pot fi obținute din biomasă (γ -butirolactona din acidul succinic, γ -valerolactona prin hidrogenarea acidului levulinic, δ -valerolactona din furfural și ϵ -caprolactonă din hidroximetilfurfural, în patru etape). Cercetările privind sinteza lactonelor derivate din resurse regenerabile au demonstrat că valorificarea materiilor

prime de biomasă reprezintă o componentă esențială pentru creșterea industriei de biorafinare [80].

ϵ -Caprolactona, lactida și glicolida sunt monomeri de tip lactonă și au fost investigați intens pentru aplicații medicale [81]. Homopolimerii lor, precum și copolimerii lor cu alți monomeri, și-au găsit aplicabilitate ca suturi, plăci și sisteme de fixare în dispozitivele de fixare a fracturilor, ca matrici suport pentru medicamente sau celule și în alte aplicații clinice [82]–[84].

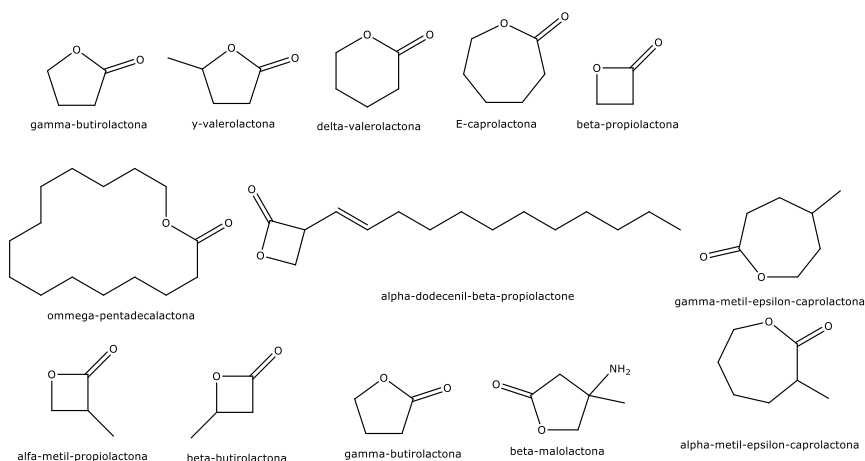


Figura 5. Exemple de lactone utilizate ca materii prime pentru obținerea biopolimerilor catalizată de lipaze

1.2.5 Tendințe în sinteza catalizată de lipază a poliesterilor și copoliesterilor ϵ -caprolactonei

Sinteza enzimatică a homopolimerilor și copolimerilor ϵ -caprolactonei a fost intens studiată, datorită posibilităților numeroase de aplicare ale acestor materiale. Au fost testate diverse lipaze, în majoritatea cazurilor sub formă imobilizată, precum și mai mulți co-monomeri. O selecție a rezultatelor semnificative obținute prin cataliză enzimatică este prezentată în Tabelul 4 și Tabelul 5, precizând și suportul de imobilizare al enzimei, dacă a fost cazul. Deși lipazele native au condus la același interval de mase moleculare medii, așa cum se arată în Tabelul 5, în majoritatea cazurilor lipaza a fost utilizată în formă imobilizată.

Numărul mare de studii efectuate cu lipaza B din *Candida antarctica* imobilizată pe rășină metacrilică (Novozyme 435) confirmă statutul acestui biocatalizator ca fiind cel mai frecvent utilizat în reacții enzimatiche până în prezent. Datorită ușurinței și reproductibilității sale, sinteza enzimatică a PCL a fost folosită în ultimii ani ca reacție model pentru evaluarea eficienței catalitice a lipazelor în reacțiile de poliesterificare sau pentru evaluarea efectului unor solvenți (de exemplu lichide ionice).

Deși există o diversitate de metode de caracterizare a produșilor rezultați, inclusiv caracterizarea structurală prin diferite tehnici, analiză termică etc., masele moleculare medii au fost selectate din motive de coerență ca și caracteristici comune

iar aceste valori au fost incluse în Tabelul 4 și Tabelul 5. Evident, valoarea acestui parametru este puternic dependentă de metoda de măsurare (SEC-GPC, MALDI-TOF MS sau RMN) [85], dar poate fi totuși considerată o expresie a performanțelor biocatalizatorului sau a efectelor condițiilor de reacție.

Rezultatele raportate în ultimii ani indică faptul că masele moleculare medii ale produșilor de reacție sunt dependente și de mediul de reacție. Chiar dacă monomerul este lichid, produsul este de obicei solid la temperaturi mai mici de 60°C și pentru alungirea lanțului polimeric alegerea unui solvent adecvat este crucială. Solventul cel mai utilizat a fost toluenul, rezultând polimeri cu mase moleculare medii de până la 10000 Da, cu excepția studiului lui Poojari și colab. [86], unde valorile M_w determinate prin GPC au fost de aproximativ 50000 Da. Prin utilizarea lichidelor ionice ca medii de reacție s-a înregistrat o creștere a maselor moleculare medii.

Tabelul 4 Sinteza poli(ϵ -caprolactonei) catalizată de lipaze.

Sursa lipazelor	Suportul de imobilizare	Condițiile de reacție	M_w/M_n [Da]	Ref
<i>C. antarctica</i> B	Rășină acrilică Novozyme 435	toluen, 70°C, 4 ore, 10 cicluri de reacție	M_n : 50000	[86]
	Cleiuri de montmorilonit și sepiolit	toluen, 70°C, 5-6 ore, atmosferă uscată de N_2	M_n : 3300-8000	[87]
	Rășină acrilică Novozyme 435	Tf ₂ N-lichid ionic, 70°C, 48 ore	M_n : 12300-18000	[88]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lewatit Acurel	volum mare, 150°C, 6 ore	M_n : 600-1300	[89]
Pancreas de porc	Particule poroase de silice	BMIMPF ₆ , 150 °C, 24 ore	M_n : 13500 - 17000	[90]
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Rășină hidrofobă macroporoasă	45-80°C, 72 ore	M_n : 850-1400	[91]
<i>Yarrowia lipolytica</i>		Lichide ionice cu [BF ₄] ⁻ / [BuPy][CF ₃ COO] [EMIM][NO ₃] 60-150°C, 24 ore, atmosferă uscată de N_2	M_n : 1000 - 8000	[92]

Proprietățile de biocompatibilitate, toxicitatea scăzută și biodegradabilitatea indică PCL drept un material promițător pentru o serie de aplicații. Cu toate acestea, hidrofobicitatea ridicată și proprietățile mecanice nesatisfăcătoare îi limitează

aplicațiile. Din acest motiv, în cele mai multe cazuri investigațiile s-au concentrat pe îmbunătățirea proprietăților PCL prin diferite metode: sinteză chimică, polimerizare prin grefare, precum și funcționalizare prin copolimerizare enzimatică pentru inserarea și atașarea de diferite grupări funcționale.

O selecție a celor mai relevante rezultate obținute pe cale enzimatică în ultimii 15 ani este prezentată în Tabelul 5. Aceste date arată că o varietate de co-monomeri au fost deja investigați în reacțiile de copolimerizare cu ϵ -caprolactonă, demonstrând perspective evidente. Extinderea domeniului de aplicare al poli(ϵ -caprolactonei), un polimer de interes ridicat ca atare [93], s-a realizat prin sinteza unei game largi de noi compuși polimerici cu funcționalități și proprietăți specifice. În ceea ce privește masele moleculare, valorile au fost destul de scăzute, cu excepția cazurilor când s-au folosit alte lactone în calitate de co-monomeri.

Cu toate acestea, având în vedere condițiile blânde, de ex. temperaturi de aproximativ 80°C, rezultatele sunt promițătoare pentru mai multe aplicații. Recent, oligoesteri sintetizați enzimatic ponindu-se de la ϵ -caprolactonă și acid 12-hidroxistearic au fost utilizați pentru prepararea de nanocompozite polimerice încărcate cu sorafenib, un medicament pentru tratamentul cancerului. Nanoparticulele rezultate au arătat un profil de eliberare promițător al medicamentului și un efect citotoxic *in vitro* pentru linia de carcinom hepatocelular HepG2 [50].

Tabelul 5 Sinteza copoliesterilor ϵ -caprolactonei, catalizată de lipaze native și imobilizate.

Co-monomeri	Sursa lipazelor	Suportul de imobilizare	Condițiile de reacție	Mw/Mn [Da]	Ref
glicerină	<i>C. antarctica B</i>	Rășină acrilică (Novozyme 435)	Toluen, 70°C, 2-8 ore, N ₂ atm	M _n : 1500-3100 M _w : 2400-4300	[49]
2-mercaptoetanol metoxi- polietilen glicol	<i>C. antarctica B</i>	Rășină acrilică (Novozyme 435)	Fără solvent /toluen, 70°C, 20 ore	M _n : 4600-21300	[94]
Polietilen glicol metil eter	<i>C. antarctica B</i>	Rășină acrilică (Novozyme 435)	THF, 70-130°C, 25-70 ore, N ₂ atm	M _n : 2000-7700	[94]
2-mercaptoetanol	<i>C. antarctica B</i>	Rășină acrilică (Novozyme 435)	Fără solvent, MTBE, 24-72 ore	M _n : 2000-6900	[95]
4-metil- ϵ -caprolactonă	<i>C. antarctica B</i>	Rășină acrilică (Novozyme 435)	Fără solvent, 60°C, 12 ore, Ar atm	M _n : 21000-23000	[96]
ω -pentadecalactonă	<i>C. antarctica B</i>	Rășină acrilică (Novozyme 435)	Fără solvent / toluen, 55-90°C, 2-24 ore	M _n : 22000-86000	[97]
Acid malic	<i>C. antarctica B</i>	Rășină acrilică Novozyme 435	Toluen/ Me-THF/ Acetonitril/ fără solvent 70 -80°C, 2-48 ore	M _w : 800-1500	[98]
Acid 5-hidroximetil-2-furoic	<i>C. antarctica B</i>	Lipozyme CalB	Fără solvent, 40-80°C, 24 ore	M _w : 745-1347/ M _n : 695-1180	[99]

Co-monomeri	Sursa lipazelor	Suportul de imobilizare	Condițiile de reacție	Mw/Mn [Da]	Ref
	<i>C. antarctica B</i>	GF-CalB-IM	Fără solvent, 40-80°C, 24 ore	Mw: 1085-1404/ Mn: 960-1128	[99]
	<i>C. antarctica B</i>	Rășină acrilică Novozyme 435	Fără solvent, 40-80°C, 24 ore	Mw: 1058-1481/ Mn: 931-1280	[99]
dietilen glicol, 1,3-propandiol	<i>Y. lipolytica</i>	Lewatit VPOC 1026	Fără solvent, 120°C, 6 ore	Mn: 300-900	[100]
δ-gluconolactonă	<i>T. lanuginosus</i>	Non-compressible silica gel carrier Lipozyme-TL IM	Fără solvent, 73°C, 24 ore	Mw: 860-893/ Mn: 824-855	[101]
10HSA	<i>C. antarctica B</i>	Rășină acrilică Novozyme 435	Toluen, 45-85°C, 24 ore	Mw: 1284/ Mn: 1215	[102]
	<i>Ps. stutzeri</i>	CLEA	Toluen 45-85°C, 24 ore	Mw: 702/ Mn: 663	[102]
	<i>T. lanuginosus</i>	Suport de silicagel Lipozyme TL-IM	Toluen, 45-85°C, 24 ore	Mw: 1146/ Mn: 1052	[102]
12HSA	<i>C. antarctica B</i>	Rășină acrilică Novozyme 435	Toluen, 45-85°C, 24 ore	Mw: 1399/ Mn: 1169	[102]
	<i>Ps. stutzeri</i>	CLEA	Toluen, 45-85°C, 24 ore	Mw: 906/ Mn: 806	[102]
	<i>T. lanuginosus</i>	Suport de silicagel necompresibil Lipozyme TL-IM	Toluen, 45-85°C, 24 ore	Mw: 1002/ Mn: 913	[102]
	<i>C. antarctica B</i>	Rășină acrilică Novozyme 435	Toluen, 90-115°C, 24 ore	Mw: 1069-2375/ Mn: 985-2000	[103]
	<i>C. antarctica B</i>	Rășină schmbătpore de ioni microporoasă GF-CalB-IM	Toluen, 50°C, 24 ore	Mw: 692/ Mn: 689	[104]
RCA	<i>Ps. stutzeri</i>	CLEA	Toluen, 45-85°C, 24 ore	Mw: 1086/ Mn: 997	[102]
	<i>T. lanuginosus</i>	Suport de silicagel necompresibil Lipozyme TL-IM	Toluen, 45-85°C, 24 ore	Mw: 1009/ Mn: 917	[102]
	<i>C. antarctica B</i>	Rășină acrilică Novozyme 435	Toluen, 45-85°C, 24 ore	Mw: 1291/ Mn: 1145	[98]
16HHDA	<i>C. antarctica B</i>	Rășină acrilică Novozyme 435	Toluen, 90-115 °C, 400 rpm, 24 ore	Mw: 823-1729/ Mn: 742-1334	[102]
	<i>Ps. stutzeri</i>	CLEA	Toluen, 45-85°C, 24 ore	Mw: 825/ Mn: 724	[102]
	<i>T. lanuginosus</i>	Suport de silicagel necompresibil Lipozyme TL-IM	Toluen, 45-85°C, 24 ore	Mw: 1232/ Mn: 1101	[102]
	<i>C. antarctica B</i>	Rășină acrilică Novozyme 435	Toluen, 45-85°C, 24 ore	Mw: 1479/ Mn: 1321	[102]
10HSA				Mw: 793/ Mn: 727	
12HSA	<i>Ps. fluorescens</i>	-	Toluen, 45-85°C, 24 ore	Mw: 887/ Mn: 855	[102]
RCA				Mw: 1426/ Mn: 1304	
16HHDA				Mw: 1294/ Mn: 1177	

Co-monomeri	Sursa lipazelor	Suportul de imobilizare	Condițiile de reacție	Mw/Mn [Da]	Ref
glicolidă PEG	<i>Ps. cepacia</i>	-	Fără solvent, 80°C, 14 zile, Ar atm	M _n : 2100- 3400	[105]

10HSA – Acid 10-hidroxistearic, 12HSA – Acid 12-hidroxistearic, RCA – acid ricinoleic, 16HHDA – acid 16-hidroxihexadecanoic.

1.2.6 Evoluții în sinteza enzimatică a poliesterilor obținuți cu acid itaconic

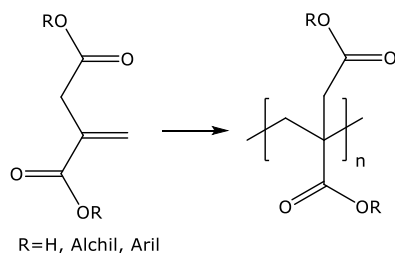
Deși acidul itaconic (acidul 2-metilensuccinic) este un metabolit al mai multor microorganisme, el este produs la scară industrială numai prin fermentație cu *Aspergillus terreus*, producând aproximativ 80 g L⁻¹ [106]. Recent, diferite microorganisme (Tabelul 6) au fost modificate genetic pentru a produce acid itaconic în cel mai eficient mod posibil, însă productivitatea *A. terreus* nu a fost depășită [107].

Tabelul 6 Microorganismele raportate ca producători eficienți de acid itaconic.

Microorganism	Concentrație [g L ⁻¹]	Referință
<i>Aspergillus terreus</i> (etapa inițială)	24-27	[108]
<i>Aspergillus terreus</i> (etape optimizate)	~ 86	[109]
<i>Ustilago maydis</i>	53	[110]
<i>Candida</i> sp.	35	[111]
<i>Pseudozyma antarctica</i>	30	[112]
Macrofag	nespecificată	[113]

Acidul itaconic este utilizat în reacțiile de polimerizare datorită proprietăților sale fotoactive și biocompatibile. Posibilitățile sintetice care pot implica acidul itaconic și derivații săi în reacțiile de polimerizare sunt prezentate în Figura 6. Astfel de poliesteri și-au găsit aplicabilitate în domeniul medical, ingineria țesuturilor, pentru a obține spume cu memorie, rășini, precum și lacuri [114]–[120].

1) Polimerizare radicalică



2) Policondensare

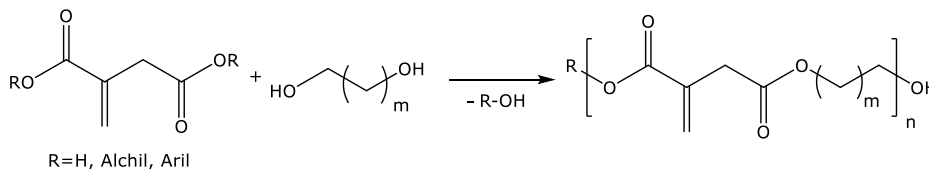


Figura 6 Posibilitățile de polimerizare ale acidului itaconic și derivații săi

Pe baza datelor disponibile, policondensarea enzimatică pentru poli(itaconati) este singura metodă care permite sinteza unor compuși cu grupări vinilice nereacționate. Guarneri și colab. au evidențiat că scopul principal în cazul poliesterilor cu acid itaconic nu este sinteza polimerilor cu lanț lung ci obținerea de noi materiale funcționale biodegradabile prin conservarea fragmentului itaconic în condiții de reacție controlate [121].

Un studiu important al poliesterilor acidului itaconic a fost realizat de Barrett și colab. [118], prin policondensare termică sau enzimatică. Copolimerii au fost sintetizați la 90°C în prezența Novozyme 435. Rezultatele obținute pe cale enzimatică au fost remarcabile, atingând mase moleculare medii de 12000 Da. Poliesterii sintetizați au fost supuși procesului de reticulare în prezența radiațiilor ultraviolete și a unui fotoinițiator (dietoxi acetofenonă). După cum era de așteptat, proprietățile materialelor s-au schimbat, flexibilitatea fiind mai mare odată cu adăugarea de acid adipic. Acest studiu a demonstrat potențialul poliesterilor care conțin acid itaconic în domeniul biomedical și biotehnologic, cu posibilitatea aplicării lor în suturi, stenturi sau particule care eliberează medicamente [118].

Selectivitatea lipazei pentru dimetil succinat și pentru partea neconjugată a dimetilitaconatului a fost demonstrată de Muller și colab., rezultând poliesteri cu unități de itaconat predominant terminale. Din punct de vedere al analizei termice, poliesterii sintetizați enzimatic au fost semicristalini, în timp ce poliesterii obținuți chimic au fost amorfi. Având în vedere masele moleculare medii, nu au existat diferențe foarte mari, prin utilizarea enzimei s-a ajuns la 840 Da, în timp ce prin folosirea unui catalizator metalic s-a obținut 880 Da. Mai mult, în timpul procesului biocatalitic nu au fost observate reacții secundare sau modificări de culoare, ca în cazul catalizatorului metalic [122].

Pellis și colab. au dezvoltat o metodă de legare covalentă a lipazei B din *Candida antarctica*, immobilizând-o pe o rășină metacrilică funcționalizată cu grupări epoxidice. Enzima immobilizată a fost utilizată cu succes în policondensarea itaconatului de dimetil cu 1,4-butandiol, păstrându-și activitatea catalitică chiar și după mai multe cicluri de reacție. Cu toate acestea, masele moleculare medii ale poliesterilor sintetizați nu au fost foarte mari [123]. Într-un studiu ulterior, aceiași cercetători au încercat să mărească masele moleculare, arătând influența concentrației și structurii diolilor utilizați [124].

Sinteza enzimatică a poliesterilor din dietil succinat, dimetil itaconat și 1,4-butandiol a fost investigată de Jiang și colab. în mai mulți solvenți, cele mai mari mase moleculare obținându-se în difenil eter [125]. Ulterior, același grup a reușit sinteza enzimatică a poliesterilor cu masă moleculară mare folosind 1,4-butandiol, dimetil itaconat și un alt diester (dietil succinat, dietil glutarat, dietil adipat și dietil sebacat). S-a demonstrat influența lungimii lanțului de atomi de carbon din molecula de diester asupra maselor moleculare medii ale poliesterilor, Novozyme 435 având o specificitate mai mare pentru adipatul de dietil [126].

Prepolimerii obținuți din acid itaconic și oligo(etilenglicol) au fost sintetizați enzimatic și ulterior funcționalizați cu diverse amine (piperidină, morfolină, imidazol și dialilamină) [127].

Yamaguchi și colab. au raportat o altă abordare pentru obținerea poliesterilor nesaturați. Alături de anhidrida itaconică au folosit și anhidrida succinică și glutarică în sintezele de poliesteri, precum și mai mulți dioli: 1,4-butandiol, 1,6-hexandiol, 1,8-octandiol și 1,10-decandiol. Reacția a produs poliesteri cu randamente de 68-92%, iar studiile structurale au arătat că dubbele legături poliesterice nu au fost afectate în reacția de polimerizare enzimatică [128].

Structuri noi de terpolimer cu două funcționalități (unitatea de itaconat și ciclul furanic) au fost sintetizate din furan-2,5-dicarboxilat, dimetil itaconat și 1,6-hexandiol, cu un randament de peste 80% și mase moleculare medii de aproximativ 1200 Da, în toluen la 80°C, folosind două lipaze din *Candida antarctica* B imobilizate [129].

1.2.7 Sinteza enzimatică de poliesteri biodegradabili pe bază de uleiuri vegetale și hidroxiacizi grași

Utilizarea uleiurilor vegetale și a derivaților lor ca monomeri pentru sinteza polimerilor a fost în centrul atenției în ultimele decenii. Disponibilitatea universală, prețul scăzut de producție și biodegradabilitatea le recomandă ca produse chimice esențiale derivate din resurse regenerabile, deoarece uleiurile vegetale și acizii grași derivați din acestea sunt considerate printre cele mai importante materii prime pentru fabricarea polimerilor funcționali și a materialelor polimerice [130]. Utilizarea materialelor polimerice pe bază de uleiuri vegetale nu este limitată la industria chimică, (de ex. vopsele și lacuri), deoarece au fost dezvoltate și mai multe aplicații biomedicale folosind materiale polimerice multifuncționale derivate din uleiuri vegetale pentru plasturi farmacologici, dispozitive de vindecare a rănilor, sisteme transportoare de medicamente, sau structuri-cadru pentru ingineria țesuturilor [131]. Derivații uleiurilor vegetale s-au utilizat și pentru aplicații în domenii tehnologice ca fotopolimerizarea și vitrimerii, oferind rezultate noi în imprimarea 3D, robotică și biomateriale [132].

Uleiul de ricin este unul dintre cele mai studiate uleiuri naturale necomestibile datorită conținutului său ridicat (> 85%) de acid ricinoleic (RCA) (acid 12-hidroxi-cis-9-octadecenoic) [133], un hidroxiacid natural izostructural cu acidul oleic, dar având o grupare hidroxil la atomul de carbon C12. Versatilitatea chimiei uleiului de ricin permite utilizarea acestuia pentru sinteza diferitelor tipuri de polimeri, de exemplu polimeri epoxidici, poliamide, poliesteri și poliuretani [134], [135]. Uleiul de ricin este, de asemenea, folosit ca sursă pentru prepararea acidului poli(lactic) ramificat pentru a îmbunătăți proprietățile fizice ale materialelor bioplastice [136]. Homopolimerul nesaturat al RCA și copolimerii săi cu poli(1,4-butilen succinat) au fost sintetizați chimic folosind drept catalizator tetraoxid de titan la 230°C. În plus, prezența legăturilor duble în aceste sisteme polimerice a fost exploatată pentru a lega covalent o sare de vinilimidazoliu, îmbunătățind în mod constant proprietățile antimicrobiene ale polimerilor finali [137]. Structura unică a RCA permite mai multe variante de funcționalizare fie la gruparea hidroxil, permițând utilizarea acesteia ca agent de acoperire și stabilizare pentru nanoparticule [138], fie la dubla legătură prin formarea unui macroperoxid disponibil pentru reacțiile de grefare [139].

Reacțiile biocatalitice catalizate de lipaze sunt bine implementate în chimia organică sintetică, inclusiv în aplicații industriale [140] și sinteza polimerilor [141]. Mai mult, selectivitatea lipazelor poate fi utilizată pentru a media polimerizările *in vitro* ale acizilor grași și derivaților acestora, ocolind etapele costisitoare și consumatoare de timp de protecție-deprotecție și oferind o platformă versatilă pentru reglarea proprietăților funcționale ale poliesterilor sintetizați [142], [143]. Polimerii și copolimerii hidroxiacizilor au fost deja sintetizați prin biocataliză și au aplicații promițătoare în mai multe domenii [144]. Homopolimerii (estolidele) acidului 12-hidroxistearic, acidului 16-hidroxihexadecanoic și RCA au fost obținuți folosind lipaze în solvenți organici cu grade de polimerizare de până la valoarea 10 [102], în timp ce copolimerii acestor hidroxiacizi cu ϵ -caprolactonă au prezentat grade superioare de polimerizare, până la 15 unități [102].

Estolidele (Figura 7) sunt oligomeri naturali, alcătuiți în general din unități de hidroxiacizi grași. Estolidele au vâscozitate ridicată, stabilitate oxidativă bună, biodegradabilitate ridicată, astfel încât au un potențial considerabil pentru obținerea de lubrifianți, plastifianți, aditivi cosmetici și componente în vopsele [139].

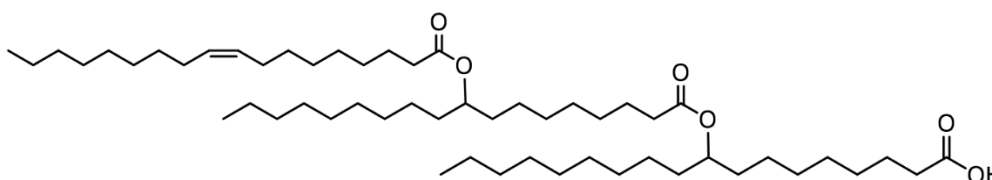


Figura 7 Structura generală a estolidelor.

Sinteza chimică a estolidelor poate fi realizată din hidroxiacizi, la temperaturi și presiuni ridicate [145].

O nouă clasă de estolide complexe, cu proprietăți termice superioare la temperaturi scăzute, a fost sintetizată din acid oleic și acizi grași saturați, la diferite rapoarte molare, folosind acid percloric drept catalizator. Separarea produsului a fost realizată prin distilare Kugelrohr, iar randamentele au fost între 45 și 65%. Estolidele saturate și esterii simpli au prezentat proprietăți fizice diferite [146]. Homoestolidele simple ale acidului oleic au prezentat o stabilitate oxidativă mai bună decât fluidele pe bază de uleiuri vegetale sau petrol, atunci când au fost formulate cu o cantitate scăzută de stabilizator oxidativ. S-a demonstrat că cea de-a doua legătură esterică din structura estolidei este mai robustă în comparație cu trigliceridele, iar hidroliza este mai dificilă. Acest aspect structural al estolidelor oferă proprietăți superioare la temperaturi scăzute, în plus față de proprietățile inerente ale unui acid gras. Biodegradabilitatea estolidelor a fost, de asemenea, demonstrată [146].

Anumiți hidroxi esteri, cum ar fi esterii etilici ai acidului 3-hidroxi butiric, acidului 4-hidroxi butiric, acidului 5-hidroxi hexanoic, acidului 6-hidroxi hexanoic, acidului 5-hidroxi dodecanoic și acidului 15-hidroxi pententencanoic au fost polimerizați enzimatic, iar poliesterii au avut mase moleculare în intervalul 3800-5400 Da [147].

Estolidele acidului ricinoleic au fost sintetizate folosind lipaza nativă și imobilizată din *Candida rugosa*, la temperatură moderată, într-un bioreactor. Lipaza a fost imobilizată pe 10 suporturi diferite prin legare covalentă și adsorbție fizică, o rășină schimbătoare de anioni fiind cel mai eficient suport [148].

O lipază din *Staphylococcus xylosus* (SXL2), imobilizată prin adsorbție pe CaCO_3 , a fost utilizată pentru sinteza estolidelor acidului ricinoleic, atât în sisteme organice, cât și fără solvenți. Cele mai mari conversii (aproximativ 65%) au fost obținute în sistemul fără solvenți la 55°C. Structura estolidei a fost demonstrată prin LC-MS, FT-IR și ^{13}C -RMN [149].

Poliesterii cu masă moleculară mare (grad de polimerizare 10) au fost sintetizați enzimatic din acidul 10-hidroxi dodecanoic și 11-hidroxi dodecanoic, folosind lipaza *C. rugosa* drept catalizator. În cazul acidului 11-hidroxi undecanoic s-au obținut mase moleculare de aproximativ 22000 Da în prezența sitelor moleculare. Reactivitatea hidroxiacizilor în aceste reacții de policondensare a scăzut în următoarea ordine: acid 16-hidroxi hexadecanoic \approx acid 12-hidroxi dodecanoic \approx acid 10-hidroxi dodecanoic > acid 6-hidroxi hexanoic. Pentru acest tip de reacție de policondensare, lipaza studiată prezintă activitate mai mare în cazul monomerilor cu

lanț mai lung, datorită unui efect de activare mai puternic al substraturilor mai hidrofobe [147].

Estolidele acizilor 10-hidroxiștearic, 12-hidroxiștearic, 16-hidroxihexadecanoic și ricinoleic au fost sintetizate cu grade de polimerizare până la 10, utilizând mai multe lipaze native și imobilizate, în medii organice. Au fost evaluate specificitatea substratului și selectivitatea acestor biocatalizatori. Lipaza de la *Pseudomonas stutzeri* imobilizată prin reticulare (CLEA) a fost cel mai bun biocatalizator în ceea ce privește creșterea lungimii lanțului. A fost demonstrată de asemenea posibilitatea direcționării acestor reacții în vederea obținerii fie de lactone fie de estolide cu grade diferite de polimerizare [150].

1.2.8 Polimeri cu unități furanice sintetizați pe cale biocatalitică

Introducerea heterocicurilor de furan în moleculele de polimer oferă acces la o gamă largă de materiale noi cu proprietăți originale prin procese simple și eficiente.

Derivații de furan sunt compuși naturali regenerabili [151] care au atras un interes considerabil pentru sinteza organică fină și obținerea de diferite materiale cu proprietăți mecanice, optice, fotochimice și ecologice specifice. Polimerii funcționalizați cu furan au fost utilizați pentru a crea sisteme de livrare conjugate cu anticorpi pentru eliberarea treptată a medicamentelor [152]. Chimia derivaților de furan a fost studiată intens și există mai mulți monomeri derivați din cei doi compuși furanici de primă generație, adică furfural și 5-hidroxiometilfurfural (HMF), obținuți direct din zaharuri sau polizaharide [153]. Produsul cel mai important poate fi considerat poli(etilen 2,5-furandicarboxilat) obținut din acid 2,5-furandicarboxilic, care se așteaptă să pătrundă pe piața materialelor de ambalare din 2023 ca omolog din surse regenerabile al PET-ului [154].

Au fost raportate mai multe căi de sinteză biocatalitică pentru polimerii pe bază de furan, cum ar fi reacțiile de policondensare ale unor monomeri derivați de acid 2,5-furandicarboxilic (FDCA), 2,5-bis(hidroxiometil)-furan (BHMF) și 2,5-diformilfuran [155]. În special, FDCA a atras un interes științific considerabil ca materie primă pentru sinteza catalizată de lipaze polimerilor [156] și copolimerilor [99], [157].

Deși nu este la fel de investigat ca FDCA și BHMF pentru sinteza catalizată de lipaze a polimerilor, acidul 5-hidroxiometil-2-furancarboxilic (HFA) este un alt monomer emergent pe bază de furan. Au fost raportate mai multe căi biocatalitice pentru conversia HMF în HFA, demonstrând caracterul său de compus bioderivat. Cu toate acestea, pentru a sintetiza eficient acizii carboxilici pe bază de furan printr-o metodă biocatalitică, este necesar un biocatalizator robust (enzimă izolată sau celule întregi) pentru oxidarea selectivă a aldehidelor furanice în mediu apos, deoarece acești derivați de furan sunt inhibitori cunoscuți ai enzimelor și microorganismelor [158].

Până în prezent, au fost raportate mai multe căi sintetice pentru polimeri cu cicluri furanice, cum ar fi reacțiile de policondensare cu participarea acidului 2,5-furandicarboxilic (FDCA), 2,5-bis-(hidroxiometil)-furanului (BHMF) și 2,5-diformilfuranului (DFF) [155].

Cel mai important poliester pe bază de acid 2,5-furandicarboxilic este poli(etilen 2,5-furandicarboxilat) (PEF) [159]. Structura chimică, stabilitatea termică și natura aromatică a FDCA fac posibilă înlocuirea acidului tereftalic în sinteza poliesterilor, de ex. poli(etilen tereftalat) (PET) [160]–[162], poli(butilen tereftalat) (PBT) [152-155], poli(propilen tereftalat) (PPT) [163], [164] și poli(butilen adipat-co-butilenă tereftalat) (PBAT) [165],[166].

Utilizarea polietilenfuranoatului (PEF) ca înlocuitor al polietilen tereftalatului (PET) a fost studiată în detaliu, iar rezultatele obținute au fost promițătoare: permeabilitate la O₂ de 11 ori mai mică [167], permeabilitate la CO₂ de 19 ori mai bună și difuzia CO₂ de 127 ori mai bună [168], împreună cu o capacitate de sorbție a apei de 1,8 ori mai mare și o reducere de 5 ori a difuziei apei [169], [170].

Diferențele semnificative între cei doi polimeri au fost atribuite înlocuirii inelului fenolic nepolar al PET cu inelul furanic polar în PEF.

Pentru a îmbunătăți proprietățile polimerilor care conțin unități de furan, în special pentru a crește biodegradabilitatea acestora, au fost sintetizați și alți copolimeri. Principala strategie raportată implică utilizarea FDCA ca monomer cu inel furanic împreună cu alți monomeri biodegradabili, cum ar fi acizii alifatici sau diolii. Unele dintre cele mai relevante rezultate pentru sinteza enzimatică a poliesterilor pe bază de furan au fost incluse în Tabelul 7.

Toate studiile au fost efectuate cu Novozyme 435. Condițiile de reacție raportate indică temperaturi de reacție în intervalul 60-140°C, în medii organice sau sisteme fără solvenți și, în unele cazuri, cu un control atent al presiunii.

Tabelul 7 Sinteza enzimatică a poliesterilor care grupări furanice, folosind Novozyme 435 ca biocatalizator

Monomeri cu ciclul furanic	Co-monomeri	Condiții de reacție	Mw/Mn [Da]	Ref.
2,5-bis hidroximetilfuran	DES/DEG/DEA/DES	Difenil eter	M _n : 2100-3000	[171]
		80°C, 2 ore, atm		
		80°C, 4 ore, 350 mHg		
		80°C, 66h, 2 mHg		
DMFDCA	1,8-ODA	I. Toluen, 60-100°C pentru 72 ore	I. M _n : 7600-13400	[172]
		II. Difenil eter: 4 presiuni diferite	M _w : 11800-48300	
		80°C, 8 ore, presiune atmosferică, N ₂ atm	II. M _n : 4000-11100	
		80°C, 16 ore, 450 mmHg, N ₂ atm	M _w : 10500-54000	
		90°C, 36 ore, 100 mmHg, N ₂ atm		
		140°C, 12 ore, 100 mmHg, N ₂ atm		
DMFDCA	1,3-PDO/1,4-BDO/1,6-HDO/1,8-ODO/1,10-DDO/ D-sorbitol/ glicerol/	Difenil eter,	M _n : 200-23700	[173]
		A. I. 80 °C, 2 ore, atm, + II. 80 °C, 2 mmHg 72 ore.	M _w : 800-48700	
	izosorbid	B. I. 80 °C, 2 ore atm,		

		+ II. 80 °C, 2 mmHg 24 ore		
		+ III. 95 °C, 2 mmHg 24 ore		
		+ II. 80 °C, 2 mmHg 24 ore		
DMFDCA	C2-C12 dioli	Toluen: <i>t</i> -butanol = 70:30 % wt., 40°C, 24 ore	n.d.	[156]
(butilenă ciclică) 2,5- furandicarboxilat	ε-caprolactonă	Fără solvent, 130- 150°C, 24 ore, N ₂ atm	M _w : 22000-50000	[174]
DMFDCA	DODA/DETA/ED DA	Fără solvent/ Toluen, 90°C 72 ore.	M _n : 6360, 8030	[175]
DMFDCA+ BHMF	Dioli alifatici liniari/ dietil esteri de diacizi	Difenil eter, I. 80 °C, 2 ore, N ₂ atm, + II. 80 °C, 2 mmHg 48 ore, + III. 95°C, vid înaintat, 24 ore	M _w : up to 35000	[157]
DET/DEF/DEF	BDO/HDO/ODO	DPE/vrac-85°C, 6ore, 1000 mmbar + 90ore, 20 mmbar	M _n : 1500-2000	[176]
DMFDCA	1,4-BDO/ 1,4- ciclohexan dimetanol	difenil eter/fără solvent 80 to 140°C for 2 ore + 80 to 140°C, 2 mmHg, 24 to 72 ore.	M _n : 695-2648 M _w : 431-8173	[177]

DES - dietil succinat, DEG - dietil glutarat, DEA - dietil adipat, DES - dietil sebacat, DMFDCA - dimetil furan-2,5-dicarboxilat, 1,8-ODA - 1,8-octandiamină, DODA - 4,9-dioxa- 1,12-dodecandiamină, EDDA - 1,2-bis(3-aminopropilamino) etan, DETA - dietilentriamină, DET - dietil tereftalat, DEI - dietil izoftalat.

FDCA sau derivații săi au fost implicați în numeroase reacții de poliesterificare, pentru a obține noi materiale cu proprietăți îmbunătățite.

Monomerii utilizați în reacțiile de polimerizare cu FDCA sau derivații săi includ: 1,3-propandiol, 1,4-butandiol, 1,6-hexandiol, 1,8-octandiol, 2,3-butandiol, 2-metil-1,3-propandiol, 1,4-ciclohexan-dimetanol și izosorbid [161],[164], [178].

Jiang și colab. au folosit Novozyme 435 pentru sinteza poliesterilor care conțin 2,5-bis(hidroximetil)furan și diferiți esteri dietilici: succinat de dietil, glutarat de dietil, adipat de dietil și sebacat de dietil. Reacțiile au fost efectuate în difenileter la 80°C, aplicând vid pentru a îndepărta alcoolii rezultați. În ciuda numărului diferit de atomi de carbon din unitatea care se repetă, toți poliesterii obținuți prin această cale aveau mase moleculare mai mici de 2000 Da [171].

Polimerizarea enzimatică a unui derivat FDCA cu diferiți dioli și polioli a fost obiectul și unui alt studiu. În reacțiile de polimerizare s-au folosit 1,3-propandiol, 1,4-butandiol, 1,6-hexandiol, 1,8-octandiol, 1,10-decandiol, 2,3-butandiol, dietilenglicol, izosorbidă, D-sorbitol și glicerol reacții cu 2,5-furandicarboxilat de dimetil (DMFDC). Procesele au fost efectuate în difenil eter, la temperaturi cuprinse între 80-140°C, rezultate mai bune obținându-se în cazul diolilor cu mai mult de trei atomi de carbon în moleculă [173].

S-au raportat sinteze enzimatiche de copoliesteri folosind doi derivați de 5-hidroximetilfurfural (HMF) și dioli alifatici, respectiv un al doilea tip de copoliesteri în care diolii au fost înlocuiți cu esteri dietilici ai unor diacizi.

Astfel, 2,5-furandicarboxilatul de dimetil (DMFDC) și 2,5-bis(hidroximetil)furan (BHMF) au fost poliesterificați cu 1,4-butandiol, 1,6-hexandiol, 1,8-octandiol, 1,10-decandiol și, respectiv, 1,12-dodecandiol, folosind difenil eter ca mediu de reacție și Novozyme 435 drept catalizator. În același mod, au fost sintetizați copoliesteri ai DMFDC și BHMF cu dietil succinat, dietil adipat, dietil suberat, dietil sebacat, respectiv dietil dodecandioat. În cazul copoliesterilor obținuți cu dioli, s-a observat o preferință enzimatică pentru diolii cu mai multe grupări metilen (8, 10 și 12), comparativ cu diolii cu un lanț de metilen mai scurt (4 și 6). La utilizarea 1,8-octandiolului s-a format un polimer cu grad de polimerizare de 122, cel mai mare dintre diolii testați. Folosind diesteri în loc de dioli ca al treilea co-monomer, cel mai înalt grad de polimerizare a fost obținut pentru copoliesterul care conține adipat de dietil. Utilizarea diesterilor ca și co-monomeri a dus la o scădere a gradelor de polimerizare, comparativ cu copoliesterii sintetizați cu dioli [157].

Cruz-Izquierdo și colab. au studiat reacțiile de poliesterificare catalizate enzimatic folosind 2,5-furandicarboxilat de dimetil (DMFDC) și o serie de dioli cu număr de atomi de carbon între 2 și 12, într-un amestec de solvenți organici. Reacțiile au fost efectuate la 40°C, într-un amestec toluen:terț-butanol 7:3, timp de 24 ore. Conținutul de copolimer și gradul de polimerizare au crescut în ordinea: C2 < C12 < C10 < C3 < C8 < C4 < C6, unde numerele reprezintă atomii de carbon din molecula de diol. Nu a fost observată o corelație a gradului de polimerizare cu lungimea lanțului hidrocarburic al diolului [156].

J. C. Morales-Huerta și colab. au realizat sinteza poli(ϵ -caprolacton-co-butilen 2,5-furandicarboxilatului) cu mase moleculare de până la 50000 Da, în două etape. În prima etapă, poliesterul ciclic poli(butilen furanoat) a fost obținut în prezența 2-etilhexanoatului de Sn(II), urmat de polimerizarea enzimatică cu deschiderea inelului, folosind lipază din *Candida antarctica* B [179].

O limitare tehnologică importantă a sintezei biocatalitice a acestor produși este că masa moleculară a copoliesterilor pare să fie limitată de încorporarea redusă a aromaticității în catena principală [157].

1.2.9 Poliesteri sintetizați pe cale enzimatică prin reacții de policondensare a diolilor cu diacizi/diesteri

Datorită dezvoltării biorafinării la nivel mondial, calea biologică poate oferi acces la mulți compuși de bază care sunt sintetizați în prezent din surse petrochimice [2]. Unii acizi carboxilici și polioli de origine biologică servesc ca materii prime pentru sinteza poliesterilor prin policondensare. În acest fel, principalii poliesteri pot fi sintetizați folosind monomeri regenerabili cum ar fi glicerol, 1,3-propandiol, 1,4-butandiol, 1,6-hexandiol, 1,8-octandiol și acizi carboxilici precum acizii succinic, fumaric, itaconic și adipic [29,30]. De exemplu, 1,3-PDO poate fi obținut prin conversia biotehnologică a glicerolului iar acidul succinic (SA) din glucoză [35].

O moleculă cu relevanță tot mai mare este 1,4-butandiolul (1,4-BDO), care este o substanță chimică utilizată pe scară largă drept componentă de bază pentru sinteza polimerilor, în special a poliesterilor și poliamidelor [45]. Cu o piață globală de 2,5 milioane de tone pe an, producția industrială de 1,4-BDO depinde în principal de substanțe chimice de origine petrolieră, cum ar fi anhidrida maleică, acetilena,

butanul, propilena și butadiena [46]. În căutarea obținerii de monomeri sustenabili, companii precum Novamont, BioAmber, Genomatica și DuPont Tate & Lyle dezvoltă sinteza 1,4-BDO de natură biologică la scară comercială (>2.000 de tone) [10]. Biosinteza are loc prin hidrogenarea acidului succinic. Un proces alternativ, elaborat de Genomatica, folosește o tulpină de *E. coli* modificată genetic pentru a obține 1,4-BDO prin fermentare directă din zaharuri [47].

Încă comercializat ca substanță chimică derivată din petrol, 1,6-hexandiolul (1,6-HDO) este considerat un monomer emergent, care poate fi derivat din biomasă. Rennovia Inc. a anunțat operarea la scară pilot pentru producția de 1,6-HDO pe bază de materii prime regenerabile. Noul proces industrial folosește biocatalizatori mai stabili, capabili să prevină scăderea performanței în timpul producției de 1,6-HDO, folosit ca intermediar în fabricarea mai multor substanțe chimice de bază, care au o valoare de piață de peste 20 miliarde USD [48]. Substanțele chimice dependente de 1,6-HDO includ hexametildiamina (HMD), acidul adipic și caprolactama, care sunt utilizate ca materii prime pentru fabricarea diferiților polimeri [49]. Această abordare oferă posibilitatea de a obține poliesteri și poliamide bioderivate din 1,6-HDO, ceea ce reprezintă o modalitate pentru reducerea volumului de gaze cu efect de seră [48].

Un alt monomer cu producție potențială de natură biologică este 1,8-octandiolul (1,8-ODO). Deși 1,8-ODO provenit dintr-o materie primă regenerabilă nu este încă comercializat, el poate fi produs prin hidrogenarea esterilor acidului suberic [20,50]. 1,8-ODO este utilizat ca monomer în sinteza unor polimeri, cum ar fi poliesterii și poliuretanii.

În Tabelul 8 sunt prezentate exemple de dioli utilizați pentru sinteza enzimatică a unor poliesteri în combinație cu diverși diesteri sau diacizi.

Acidul adipic (AA) este una dintre cele mai importante substanțe chimice, cu o piață de 4 milioane de tone pe an [70]. Folosit în principal pentru producția de nailon 66 și poliesteri sub formă de fibre și rășini, AA este utilizat și în sinteza poliuretanilor sau a esterilor adipici pentru plastifianți PVC, lubrifianți, aditivi alimentari și cosmetice [71]. În prezent, fabricarea industrială a AA este de natură petrochimică și se bazează pe oxidarea ciclohexanolului sau a ciclohexanonei, producând un amestec cunoscut sub numele de ulei KA care este oxidat ulterior la acid adipic [72]. Un dezavantaj al acestui proces este generarea de produse secundare ca N₂O, care este un gaz cu efect de seră [73]. În acest context, producția de AA pe bază biologică a apărut ca o alternativă viabilă la procesele petrochimice.

Tabelul 8 Exemple de dioli și diesteri utilizați ca materii prime în reacții de policondensare catalizate de hidrolaze

Dioli	Diesteri	Enzima	Temp [°C]	Ref
1,4-BDO/1,6-HDO/1,8-HDO	di(Me-/Et-/Bu-) adipat	CaLB	85	[180]
1,4-BDO/1,6-HDO/1,8-HDO	di(Me-/Et-/Bu-) succinat	CaLB	85	[180]
1,4-BDO/1,6-HDO/1,8-HDO	di(Me-/Et-/Bu-) sebacat	CaLB	85	[180]
1,4-BDO/1,6-HDO/1,8-HDO	diEt-2,5-furandicarboxilat	CaLB	85	[176]
1,4-BDO/1,6-HDO/1,8-HDO	diEt-2,5-piridindicarboxilat	CaLB	85	[176]
1,4-BDO/1,6-HDO/1,8-HDO	diEt-2,4-piridindicarboxilat	CaLB	85	[176]

1,4-BDO/1,6-HDO/1,8-HDO	diEt-2,6-piridindicarboxilat	CaLB	85	[176]
1,4-BDO/1,6-HDO/1,8-HDO	di(Me-,Bu-) itaconat	CaLB	50 - 65	[181]
1,4-BDO/1,6-HDO/1,8-HDO	di(Me-,Bu-) fumarat	CaLB	50 -65	[181]
etilenglicol/1,3-PDO/1,4-BDO	diME-adipat	Thc_cut1	70	[182]
1,4-ciclohexandimetanol	diMe itaconat	CaLB	40 - 90	[121]
1,4-BDO/1,8-HDO	diMe adipat	Thc_cut1	50	[183]
1,4-BDO/1,8-HDO	diMe succinat	Thc_cut1	50	[183]
1,4-BDO/1,8-HDO	diMe suberat	Thc_cut1	50	[183]
1,4-BDO/1,8-HDO	diBu galactarat	CaLB	120 - 140	[184]
2,5- <i>bis</i> (hidroximetil)furan	diMe adipat	CaLB	85	[185]
3,4- <i>bis</i> (hidroximetil)furan	diMe succinat	CaLB	85	[185]
2,6- <i>bis</i> (hidroximetil)piridină	diMe sebacat	CaLB	85	[185]

1.3. Metode de degradare a polimerilor

Producția de materiale plastice poate părea mult mai ușoară decât eliminarea lor prin diferite mijloace de degradare. Este nevoie de mult mai multă energie și eforturi pentru a degrada un polimer, mai ales dacă este un polimer nebiodegradabil. Cu toate acestea, uneori sunt necesare eforturi la fel de mari pentru degradarea unui polimer biodegradabil, dar perioada de degradare este mai scurtă.

Degradarea polimerilor este un proces care aduce modificări ale proprietăților (de ex., formă, culoare, rezistență la tracțiune) prin permiterea unor procese biologice, chimice sau fizice care au ca rezultat ruperea legăturilor cu transformări chimice ulterioare. Aceste transformări includ în principal variații chimice, ruperea legăturilor și dezvoltarea de noi grupări funcționale. Proprietățile materialelor, cum ar fi caracteristicile mecanice, electrice sau optice ale polimerilor sunt influențate de degradare. Polimerii nu se corodează precum metalele, ci suferă procese de degradare prin mai multe mijloace care ar putea fi realizate de către mediu sau de către enzime prin biodegradare.

Degradarea materialelor plastice poate fi inițiată de radiațiile UV care formează radicali liberi, care sunt apoi supuse unor reacții de propagare și terminare. Hidroliza, precum și degradarea enzimatică și oxidativă a plasticului în apă ajută la degradarea lanțurilor lungi de polimeri.

Plasticul poate fi găsit la diferite dimensiuni, de la mezo-plastice la macro-plastice și diferite combinații de factori ca oxigenul, umiditatea, enzimele și radiațiile UV vor influența procesul de degradare [186].

O cantitate enormă de polimeri ajung în râuri, lacuri și în mare, unde se formează literalmente insule de plastic. Viața marină este perturbată de efectul negativ al materialelor plastice care plutesc pe apă [187]. Cantitatea de bacterii, ciuperci și substanțe chimice crește în corpul mării din cauza acumulării plasticului, care reprezintă o amenințare majoră pentru viața marină. Acești polimeri se

degradează lent hidrolitic și, ca urmare a expunerii la UV, formează foarte lent micro-plastice care sunt consumate și transformate în poluanți organici persistenti toxici de către fauna marină. Materialele plastice sunt compuse dintr-o varietate de substanțe chimice, poluanți și aditivi, de exemplu ftalați, iar atunci când polimerii sunt expuși la lumina UV în mediul marin, favorizând trecerea lor în apă [186]. De-a lungul timpului, doar partea din materiale plastice expuse la lumina soarelui încep să sufere degradarea UV, în timp ce partea rămasă sub suprafața apei începe să formeze ciuperci și încet să se degradeze hidrolitic [186].

Există un efort considerabil de cercetare la nivel mondial pentru a dezvolta polimeri biodegradabili pentru aplicații agricole sau ca opțiune de gestionare a deșeurilor pentru polimerii din mediu. Până la sfârșitul secolului al XX-lea, majoritatea cercetărilor au fost orientate spre sinteză și nu s-a acordat prea multă atenție identificării cerințelor de mediu și testării biodegradabilității polimerilor. Un factor important și este utilizarea termenului de biodegradare, care nu a fost aplicat în mod consecvent. În domeniul medical al suturilor, al reconstrucției osoase și al administrării de medicamente, termenul de biodegradare a fost folosit pentru a indica degradarea în macromolecule care rămân în organism, dar migrează (de exemplu, polietilenă (PE) cu masă moleculară (MW) ultra mare din protezele articulare) sau hidrolizează în molecule cu MW scăzut care sunt fie excretate din organism (bioabsorbție) fie dizolvate fără modificarea MW (bioabsorbție) [188], [189]. Pe de altă parte, pentru materialele plastice degradabile din punct de vedere ecologic, termenul de biodegradare poate însemna fragmentare, pierderea proprietăților mecanice sau uneori degradare prin acțiunea organismelor vii [190]. Deteriorarea sau pierderea integrității fizice este adesea confundată cu biodegradarea [191]. Multe grupuri și organizații au depus eforturi să definească în mod clar termenii „degradare”, „biodegradare” și „biodegradabilitate”, dar stabilirea unei singure definiții acceptate de comunitatea internațională nu a fost simplă.

Factorii de mediu, ca lumina, căldura sau substanțele chimice influențează modificările polimerilor care au drept rezultat degradarea. Au fost implementate și testate diferite tipuri de degradare pentru polimeri. Cu toate acestea, pe baza sursei transformării chimice, tipurile majore de degradare sunt degradarea termică, fotodegradarea, degradarea chimică și degradarea biologică.

Degradarea termică a unui polimer este considerată o deteriorare a unei molecule de polimer din cauza supraîncălzirii [192], [193]. Moleculele cu lanț lung ale polimerului sunt perturbate din cauza energiei termochimice absorbite și, prin urmare, catena polimerilor tinde să se rupă și să se separe, ceea ce are ca rezultat compuși depolimerizați cu masă moleculară mică. În general, degradarea termică aduce modificări în distribuția masei moleculare a unui polimer, care îi afectează proprietățile tipice [194].

Fotodegradarea este o degradare a unui polimer prin fotoliză, care este inițiată de razele naturale precum UV, gamma sau razele X. Anumiți polimeri sunt capabili să absoarbă aceste radiații solare dăunătoare, care includ UV-A (315-400 nm) și UV-B (295-315 nm). Majoritatea polimerilor au tendința de a absorbi radiația de înaltă energie, care apoi permite electronilor săi să se activeze, iar reactivitatea mai mare duce la reacții de scindare, oxidare și alte tipuri de degradare. Degradarea chimică a polimerilor este inițiată de substanțe chimice ca alcaliile și acizii, iar acest lucru duce fie la solvoliză, fie la degradarea oxidativă care depolimerizează polimerul în componente cu masă moleculară mai mică [194]. Biodegradarea este procesul care utilizează organisme vii din mediu, cum sunt ciupercile și bacteriile, pentru a descompune polimerii cu lanț lung în monomerii lor sau în dioxid de carbon, apă și diverse minerale. Poate avea loc în sol, apă, precum și în sedimente. Umiditatea

ridicată stimulează atacul microbial care permite creșterea fungică și bacteriană pe polimerii solizi. Creșterea acestora provoacă ruperea la scară mică în structura polimerului pe măsură ce microorganismele pătrund în ea. Datorită acestor forțe fizice, suprafața polimerică este deteriorată și expusă în continuare la agenți care o pot degrada biochimic și chimic.

Biodegradarea poate fi clasificată în biotică sau abiotică. Biodegradarea abiotică implică hidroliză și fotoliză, în timp ce biodegradarea biotică implică degradarea microbială. Degradarea biotică poate fi împărțită la rândul ei în degradare aerobă sau anaerobă. Degradarea aerobă este inițiată în prezența aerului și produce biomasă, dioxid de carbon, apă, minerale și sare. Biodegradarea anaerobă se realizează în absența oxigenului și produce disulfură de carbon, metan, dioxid de carbon, apă, minerale și sare.

Polimerii din gropile de gunoi și sedimente sunt degradați anaerob, în timp ce în natura sălbatică sunt degradați aerob. Locuri precum composturile de sol au o degradare parțial aerobă și parțial anaerobă. Biodegradarea oricărui polimer necesită anumite medii în care principalii parametri sunt conținutul de oxigen, temperatura, pH-ul și conținutul de umiditate. Prin urmare, acestea trebuie luate în considerare deoarece joacă un rol vital în degradarea oricărui polimer.

1.3.1 Mecanisme de biodegradare

Biodegradarea constă în mod normal din trei etape: biodeteriorare, biofragmentare și asimilare. În biodeteriorare, proprietățile fizice, mecanice și chimice ale polimerilor sunt modificate din cauza creșterii microorganismului pe suprafața polimerului sau în interiorul polimerului [194]. Termenul de biofragmentare implică descompunerea biologică a lanțului polimeric în monomeri și oligomeri cu ajutorul microorganismelor, în timp ce asimilarea începe atunci când aceste microorganisme sunt hrănite cu nutrienți, carbon și surse de energie din polimeri proveniți din biofragmentare și sunt apoi transformați în biomasă, apă și CO₂.

Faptul că polimerii au lanțuri lungi și mase moleculare mari înseamnă că nu pot fi nici ingerați, nici trecuți prin nici o membrană celulară pentru degradare ulterioară. Prin urmare, este necesară o etapă de conversie în oligomeri și monomeri (depolimerizare) [195]. Astfel, etapa inițială în timpul biodegradării este transformarea polimerului cu lanț lung în oligomeri și monomeri. O varietate de forțe biologice și fizice pot fi utilizate pentru a rupe polimerii cu lanț lung, în funcție de mecanismul aplicat. Monomerii polimerilor biodegradabili sunt ușor digerați în mediu, iar acești monomeri de dimensiuni mici fie trec prin membrane, fie sunt ingerați de organismele microbiene în mediul degradant. Procesul de degradare este complet atunci când compușii organici împreună cu apa și mineralele sunt eliberați înapoi în mediu. Acest pas este cunoscut sub numele de mineralizare [194]. Polimerii se degradează inițial la suprafață, care este expusă mediului. Strivirea suprafeței și variația culorii polimerului sunt printre primele rezultate vizuale ale unui polimer în curs de degradare. Degradarea ulterioară este mai ușoară datorită fisurării suprafeței, care permite și expune suprafața interioară a polimerului, care în cele din urmă se dezintegrează [196].

Există diferite mecanisme de degradare a polimerilor în natură, hidroliza și oxidarea biologică fiind considerate a fi cele două tipuri majore de biodegradare. Aceste mecanisme sunt clasificate în funcție de sursele utilizate, cum ar fi enzimele sau bacteriile și dacă sunt catalitice sau necatalitice. Lungimea mai mică a lanțului polimeric și caracterul hidrofil îmbunătățit pot face procesul de biodegradare mai ușor

și mai rapid în ceea ce privește durata degradării. Degradarea microbiană implică fie enzime, fie microorganisme pentru a degrada polimerii. Microorganisme precum ciupercile, bacteriile și drojdiile secretă subprodusi de tip peroxizi și acizi, care contribuie de asemenea la procesul de degradare [197].

Biodegradarea enzimatică implică o varietate de enzime care pot fi prezente în mediu, de exemplu în compost. De cele mai multe ori, ciupercile și bacteriile din zona respectivă acționează ca surse de enzime care realizează în continuare procesul de degradare. Aceste enzime pot fi împărțite în două categorii: depolimeraze intracelulare și extracelulare. Enzimele extracelulare sau exoenzimele difuzează inițial de la sol la suprafața polimerului. Suprafața polimerului absoarbe apoi enzima, care catalizează în continuare reacția de degradare. Enzimele intracelulare sau endoenzimele funcționează în interiorul celulelor și contribuie de asemenea la degradarea polimerului [198]. O serie de polimeri complecși se scindează în lanțuri scurte și acționează ca o sursă de energie atunci când trec prin membrana bacteriană. Viteza cu care polimerii se degradează printr-un mecanism enzimatic este controlată de conținutul de umiditate, temperatură și cristalinitatea polimerului. De exemplu, microorganismele necesare pentru degradarea bacteriană a PCL sunt exte nsiv dispersate în ecosistem. Conform unor studii recente, s-a observat că o ciupercă asemănătoare drojdiei numită *Pullularia pullulans* poate degrada eficient PCL cu o masă moleculară mai mică, în timp ce tulpina fungică *Penicillium* sp. poate degrada polimerii PCL cu masă moleculară mai mare [199]. Mai mult, s-a observat că enzimele de tip lipază, în special lipaza din *Pseudomonas*, realizează o biodegradare mai rapidă a polimerilor, având capacitatea de a rupe anumite legături esterice din substraturi hidrofobe [188].

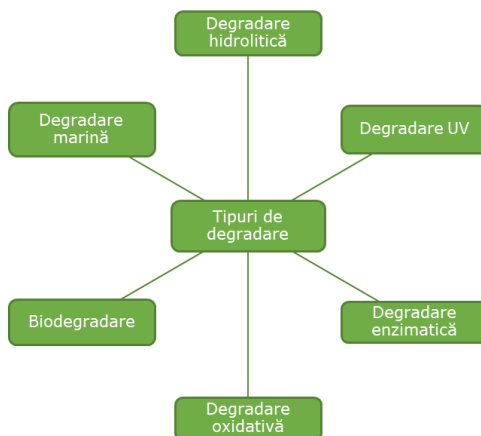


Figura 8 Tipuri de degradare a polimerilor

1.3.2 Factorii care afectează procesul de degradare

Biodegradarea polimerilor este afectată de mai mulți factori (Figura 9). Majoritatea polimerilor care se degradează necesită parametri specifici în absența cărora degradarea nu va avea loc, indiferent dacă sunt biodegradabili sau

nebiodegradabili. Mediul în care ajunge polimerul, fie că este în compost, în apă sau într-un depozit va determina în mare măsură dacă polimerul se va degrada și, dacă da, cât de rapidă va fi degradarea.

Diferențele de structură și morfologie a polimerilor joacă, de asemenea, un rol important în eficacitatea (bio)degradării acestora. Morfologii precum natura cristalină a polimerului, în care unitățile care se repetă au simetrii înalte (cristalinitate ridicată) și legături puternice de hidrogen la interfață, inhibă atacul enzimatic [197]. Cei mai importanți factori de mediu care inițiază procesul de degradare sunt oxigenul și cantitatea de radiații UV, precum și prezența enzimelor în zona deșeurilor [186]. Degradarea depinde, de asemenea, de complexitatea lanțului polimeric, de structura sa chimică și de cristalinitatea polimerului [200]. Lanțurile polimerice mai scurte ar avea ca rezultat o degradare mai rapidă, în timp ce structurile chimice complexe ar avea nevoie de un aport suplimentar de enzime sau de coenzime complexe. Artham și colab. [197] au stabilit că lanțurile polimerice complexe fac accesibilitatea enzimelor la catena principală a polimerului dificilă. Ei au demonstrat că polimerii cu cristalinitate mai mare și cristale mai mari, cum ar fi PHB, au manifestat o reducere a ratei de depolimerizare.

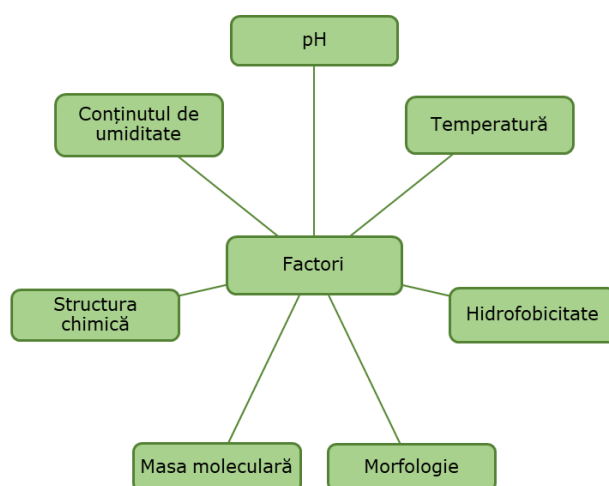


Figura 9 Factorii care influențează degradarea polimerilor

Îmbunătățirea proprietăților polimerilor prin modificarea structurii și/sau a morfologiei acestora poate afecta negativ (bio)degradarea polimerului. Alți factori care joacă un rol în procesul de (bio)degradare sunt temperatura medie și pH-ul mediului înconjurător. Conținutul de salinitate și umiditate din mediul degradant afectează viteza cu care polimerul se degradează. Unii polimeri biodegradabili se degradează mai repede dacă conținutul de umiditate din mediu este ridicat, în timp ce mulți polimeri nu se degradează dacă salinitatea din mediu scade până la un anumit nivel. Acești factori sunt cunoscuți ca factori abiotici în procesul de degradare [197]. Caracteristicile polimerului sunt importante în degradarea unui polimer biodegradabil. Unele dintre acestea sunt hidrofobicitatea, flexibilitatea, masa moleculară și grupările funcționale. Se consideră că degradarea polimerilor depinde de istoricul de depozitare al polimerului înainte de a fi aruncat pentru degradare. Dacă polimerul a fost folosit

sau ținut în condiții umede sau expus la lumina UV, acesta va avea șanse mai mari de degradare. Polimerii ce includ grupări metil, hidroxil și carboxil au o viteză de degradare mai mare, iar polimerii cu grupări flexibile sunt mai ușor de biodegradat, deoarece se potrivesc în situsul activ enzimatic mult mai rapid decât polimerii rigizi [197]. Polimerii biodegradabili pot avea structuri și/sau compoziții complexe. În cele mai multe cazuri, pentru a le îmbunătăți proprietățile, aceștia sunt amestecați cu alți polimeri sau amestecați cu aditivi naturali, anorganici sau organici, sau sunt reticulați. Astfel de tratamente pot afecta accesibilitatea polimerului la microorganismele degradante, cum ar fi enzimele [197]. Prin urmare, atunci când un plastic este aruncat în mediu, este necesar să se ia în considerare toate aceste condiții și factori care afectează degradabilitatea la scară mai mare.

1.3.3 Metode de monitorizare a biodegradabilității polimerilor

Așa cum rezultă din diferitele mecanisme descrise anterior, biodegradarea nu depinde doar de chimia polimerului, ci și de prezența sistemelor biologice implicate în proces. Atunci când se investighează biodegradabilitatea unui material, efectul mediului nu poate fi neglijat. Activitatea microbiană și, prin urmare, biodegradarea este influențată de:

- prezența microorganismelor;
- disponibilitatea oxigenului;
- cantitatea de apă disponibilă;
- temperatura;
- mediul chimic (pH, electroliți, etc).

Pentru a simplifica imaginea de ansamblu, mediile în care are loc biodegradarea sunt, practic, împărțite în două: a) aerobe (cu oxigen disponibil) și b) anaerobe (fără oxigen prezent). Disponibilitatea oxigenului afectează foarte mult compoziția comunității microbiene care este activă în mediu și, prin urmare, capacitatea acestora de a biodegrada anumiți polimeri. Această diviziune poate fi, la rândul său, subdivizată în 1) medii acvatice și 2) medii cu conținut ridicat de solide. Tabelul 9 prezintă schematic diferitele medii, cu exemple în care poate apărea biodegradarea [201].

Tabelul 9 Clasificarea schematică a diferitelor medii de biodegradare pentru polimeri

	1) Acvatic	2) Solide dure
a) Aerobic	<ul style="list-style-type: none"> - Stații de epurare aerobă a apelor uzate - Ape de suprafață (ex: lacuri și râuri) - Medii marine 	<ul style="list-style-type: none"> - Soluri de suprafață - Instalații de compostare a deșeurilor organice - Aruncarea gunoiului - Sedimente de adâncime din mare
b) Anaerobic	<ul style="list-style-type: none"> - Stații de tratare anaerobă a apelor uzate - Rumenul erbivorelor 	<ul style="list-style-type: none"> - Nămol anaerob - Tratarea anaerobă a apelor uzate - Gropi de gunoi

Mediile cu un conținut ridicat de solide vor fi cele mai relevante pentru măsurarea biodegradării ecologice a materialelor polimerice, deoarece reproduc condițiile existente în timpul tratării biologice a deșeurilor solide municipale, cum ar fi compostarea sau digestia anaerobă (biogazificarea).

Cu toate acestea, posibilele aplicații ale materialelor biodegradabile, altele decât în ambalaje și produse de consum, de exemplu, în plasele de pescuit pe mare, sau expunerea nedorită în mediu din cauza deșeurilor, explică necesitatea testelor de biodegradare acvatică. Numeroase modalități de evaluare experimentală a biodegradabilității polimerilor au fost descrise în literatura științifică.

Deoarece mediul tipic de expunere implică incubarea unui substrat polimeric cu microorganisme sau enzime, sunt posibile doar un număr limitat de măsurători: cele referitoare la substraturi, la microorganisme sau la produșii de reacție. Patru abordări pentru studierea proceselor de biodegradare au fost evaluate de Andradý [202], [203].

- Monitorizarea acumulării de biomasă;
- Monitorizarea epuizării substraturilor;
- Monitorizarea produșilor de reacție;
- Monitorizarea modificărilor proprietăților substratului.

Cele mai uzuale teste pentru evaluarea preliminară a biodegradabilității sunt următoarele:

a). Teste enzimatice: În testele enzimatic, substratul polimeric este adăugat la o soluție tampon sau la soluție cu pH controlat, care conține unul sau mai multe tipuri de enzime purificate. Aceste teste sunt foarte utile în examinarea cineticii depolimerizării sau eliberării oligomerului sau monomerului dintr-un lanț polimeric în diferite condiții de testare. Metoda este foarte rapidă (de la minute la ore) și poate oferi informații cantitative. Cu toate acestea, testele enzimatic nu sunt adecvate pentru a determina vitezele de mineralizare.

Tipul de enzimă care urmează să fie utilizată și cuantificarea degradării va depinde de polimerul care este analizat. De exemplu, Mochizuki și colab. [204] au studiat efectele degradării fibrelor de policaprolactonă asupra hidrolizei enzimatic de către lipază. Degradabilitatea fibrelor de policaprolactonă a fost monitorizată prin formarea de carbon organic dizolvat (DOC) și pierderea de masă. Sisteme similare cu lipaze au fost folosite pentru studierea hidrolizei unor game largi de poliesteri alifatici, copoliesteri cu segmente aromatice și copoliesteramide. Alte enzime, cum ar fi α -chymotripsina și α -trypsina, au fost, de asemenea, aplicate acestor polimeri [205]. Biodegradabilitatea segmentelor de alcool polivinilic (PVA), în ceea ce privește lungimea lanțului și configurația stereochemică, a fost studiată folosind PVA-dehidrogenază izolată [206]. Enzimele celuloitice au fost folosite pentru a studia biodegradabilitatea esterilor celulozei în funcție de gradul de substituție și dimensiunea substituentului [207].

Dezavantajele metodei: Este necesară prudență în extrapolarea analizelor enzimatic ca instrument de screening pentru diferiți polimeri, deoarece enzimele au fost asociate cu un singur polimer. Enzimele selectate inițial pot prezenta o activitate semnificativ mai redusă față de polimeri modificați sau materiale diferite, chiar dacă în mediu pot exista enzime mai potrivite. De asemenea, trebuie avut grijă dacă enzimele nu sunt purificate, stabilizate, sau depozitate în mod necorespunzător, deoarece poate apărea inhibarea și pierderea activității enzimatic [208].

b). Teste cu plăci: au fost dezvoltate inițial pentru a evalua rezistența materialelor plastice la degradarea microbiană. Mai multe metode au fost standardizate de către organizațiile abilitate, cum sunt ASTM și ISO [209], [210]. Ele sunt utilizate în prezent și pentru a vedea dacă un material polimeric va susține creșterea microorganismelor [208], [211]. Principiul metodei presupune plasarea materialului de testat pe suprafața unui agar cu săruri minerale depus în prealabil pe o placă Petri care nu conține nicio sursă suplimentară de carbon. Materialul de testat și suprafața agarului sunt pulverizate cu un inocul mixt standardizat de bacterii și/sau

ciuperci cunoscute. Materialul de testat este examinat, după o perioadă de incubare predeterminată la temperatură constantă, în ce privește creșterea înregistrată pe suprafața sa și se dă o evaluare.

Valabilitatea acestui tip de test este limitată dacă se face doar o evaluare vizuală a materialului plastic. Ar trebui evaluate și alte proprietăți pentru a susține observațiile vizuale. De exemplu, examinarea microscopică a suprafeței poate oferi asemenea informații suplimentare.

Dezavantaje: Un rezultat pozitiv la un test pe plăci de agar indică faptul că un organism poate crește pe substrat, dar nu înseamnă că polimerul este biodegradabil, deoarece creșterea poate fi pe contaminanți, pe plastifianții care sunt prezenți, pe fracțiile oligomerice încă prezente în polimer și așa mai departe. Prin urmare, aceste teste trebuie tratate cu prudență atunci când se extrapolează datele în situații de teren.

c). Teste de respirație: Activitatea microbiană aerobă este monitorizată de obicei prin utilizarea oxigenului. Biodegradarea aerobă necesită oxigen pentru oxidarea compușilor în constituenții săi minerali, cum ar fi CO_2 , H_2O , dioxid de sulf (SO_2), pentoxid de fosfor (P_2O_5) și așa mai departe. Cantitatea de oxigen utilizată în timpul incubației, numită și consumul biologic de oxigen (BOD), este, prin urmare, o măsură a gradului de biodegradare. Mai multe metode de testare se bazează pe măsurarea BOD, adesea exprimată ca procent din consumul teoretic de oxigen (TOD) a compusului. TOD, care este cantitatea teoretică de oxigen necesară pentru oxidarea completă a unui substrat la constituenții săi minerali, poate fi calculată luând în considerare compoziția elementală și stoichiometria oxidării [202], [212], [213], [214], [215] sau pe baza determinării experimentale a cererii chimice de oxigen (COD) [202], [212].

Testele BOD ce utilizează sticle închise la culoare și etanșate cu capace prevăzute cu senzori au fost concepute pentru a determina biodegradabilitatea detergentilor [213], [214]. Acestea au condiții stricte datorită nivelului scăzut de inocul (de ordinul a 10⁵ microorganisme/L) și cantității limitate de substanță de testat care poate fi adăugată. Aceste limitări provin din cerința practică ca necesarul de oxigen să nu depășească jumătate din nivelul maxim de oxigen dizolvat în apă la temperatura testului, pentru a evita generarea de condiții anaerobe în timpul incubației. Pentru materialele insolubile, cum ar fi polimerii, sunt acceptabile condiții mai puțin stricte și au fost dezvoltate modalități alternative de măsurare a BOD. Testele cu două faze în flacon închis permit un conținut mai mare de oxigen în baloane și o cantitate mai mare de inocul. Sunt de asemenea posibile concentrații de testare mai mari, încurajând o precizie mai mare prin cântărirea directă a probelor. Cererea de oxigen poate fi determinată alternativ prin măsurarea periodică a concentrației de oxigen în faza apoasă prin deschiderea baloanelor [213], [216], [217], prin măsurarea modificării volumului sau presiunii în baloanele de incubare care conțin agenți absorbantți de CO_2 [212], [218], [219], sau prin măsurarea cantității de gaz produs constant pentru menținerea constantă a volumului respirometric [212], [215], [216], [218].

d). Teste cu degajare a gazelor (CO_2 sau CH_4). Eliberarea CO_2 sau CH_4 dintr-un substrat reprezintă un parametru direct de mineralizare. Prin urmare, testele de degajare a gazelor pot fi instrumente importante în determinarea biodegradabilității materialelor polimerice. Un număr de metode de testare binecunoscute au fost standardizate pentru biodegradarea aerobă, cum ar fi testul Sturm (modificat) [220], [221], [222] și testul de compostare controlat de laborator [223], [224]; cât și pentru biodegradarea anaerobă, cum ar fi testul anaerob cu nămol [225], [226] și testul de digestie anaerobă [227], [228]. Deși principiul acestor metode de testare este același,

ele pot diferi în ceea ce privește compoziția medie, inoculul, modul în care sunt introduse substraturile și tehnica de măsurare a degajării gazelor.

Testele cu degajare a gazelor sunt metode de testare populare deoarece sunt sensibile și relativ simplu de efectuat. Se determină o măsură directă de mineralizare și polimerii solubili în apă sau insolubili pot fi testați ca filme, pulberi sau obiecte. În plus, condițiile de testare și inoculul pot fi ajustate pentru a se potrivi aplicației sau mediului în care ar trebui să aibă loc biodegradarea. De obicei se folosesc medii sintetice acvatică, dar și apa de mare naturală [229], [230] sau probe de sol [231], [232] pot fi utilizate ca medii de biodegradare. O condiție prealabilă pentru aceste medii este ca evoluția de fond CO_2 să fie limitată, ceea ce exclude aplicarea condițiilor reale de compostare. Prin urmare, biodegradarea în condiții de compostare este măsurată folosind un inocul derivat din compost matur cu activitate respiratorie scăzută [223], [233] [234]. Un dezavantaj al utilizării unor medii complexe de degradare, cum ar fi compostul matur, este că caracterizarea simultană a produselor intermediare de degradare și determinarea bilanțului de carbon este dificilă din cauza prezenței unui număr mare de compuși interferenți. Pentru a depăși acest lucru, a fost dezvoltat un test alternativ bazat pe o matrice pe bază de pat mineral inoculată [235], [236].

1.4 Metode computaționale cu aplicații în biocataliză

Înțelegerea bazei moleculare a interacțiunilor substratului enzimatic este o condiție prealabilă pentru variantele de inginerie cu un domeniu de aplicare lărgit al substratului, selectivitate crescută pentru aplicații biocatalitice sau pentru găsirea de noi enzime în bibliotecile de secvențe genomice sau metagenomice pentru sinteza produselor dorite [237].

Modelarea moleculară este utilizată pentru a obține o analiză la nivel molecular a enzimei, contribuind la înțelegerea mecanismului său de acțiune și a proprietăților moleculare. Prin urmare, s-a dovedit a fi un mijloc foarte util pentru cunoașterea deplină a biocatalizei și a aplicațiilor sale biotehnologice [238]. Sub denumirea generică de modelare moleculară sunt reunite toate metodele teoretice și tehnicile de calcul folosite pentru a reprezenta, simula și prezice comportamentul sistemelor chimice mici și moleculelor biologice mari, precum și ansamblurile moleculare. Folosind algoritmi de calcul, ei reconstruiesc modele tridimensionale ale enzimelor, le optimizează geometria moleculară, calculează proprietățile fizice ale atomilor care le alcătuiesc (energie, distribuția sarcinii, interacțiuni intra- și intermoleculare etc.). Astfel de cunoștințe nu sunt deocamdată accesibile cu metodele experimentale pe care modelarea le unește pentru a le explica sau prezice rezultatele, reducând costurile și eforturile.

Interacțiunile unei molecule de substrat cu centrul activ al unei enzime au fost studiate prin trei metode diferite: andocare moleculară [239], simularea dinamicii moleculare a substratului într-o orientare productivă în situsul activ [240] și calcule chimice cuantice ale căii de reacție [4]. Folosind aceste metode au fost identificate reziduurile relevante din punct de vedere funcțional, care stabilizează substratul în orientarea sa productivă, precum și pozițiile care împiedică orientarea productivă a unui substrat sau mediază legarea acestuia într-o orientare neproductivă [4], fiind astfel candidați promițători pentru mutații. Aceste abordări de modelare au fost de succes dacă etapa chimică reprezintă blocajul cinetic al ciclului catalitic. Cu toate acestea, există tot mai multe dovezi că accesul la substrat sau ieșirea produsului ar putea fi etapele limitative ale vitezei de reacție [241] sau ar putea contribui la selectivitatea enzimelor [242]. Datorită creșterii rapide a resurselor de calcul,

simulările imparțiale ale interacțiunilor proteină-ligand au devenit fezabile pentru a studia legarea mai multor molecule de ligand în soluție [243]. Primele rapoarte demonstrează, de asemenea, fezabilitatea acestei abordări de a studia interacțiunile enzimă-substrat [244]–[246].

1.4.1 Dinamica moleculară

Vederea statică a unei molecule, cum ar fi cea oferită de cristalografia cu raze X sau conformația sa energetică inferioară, este insuficientă pentru a înțelege activitatea și proprietățile biologice, deoarece ne oferă doar o imagine medie, înghețată, a unui sistem complex. Moleculele sunt entități în mișcare: atomii interacționează continuu unul cu altul și cu mediul. Mișcările lor dinamice pot explica gama de stări accesibile termic pentru sistem și pot conecta secvența de structură și funcția. Frauenfelder și Wolynes au fost primii care au legat dinamica proteinelor cu funcționalitatea acestora [247]; [248].

Simulările de dinamică moleculară (MD) sunt folosite tocmai pentru a estima echilibrul și proprietățile dinamice ale sistemelor complexe care nu pot fi calculate analitic, completând alte abordări computaționale precum simulările Monte Carlo sau procedurile de minimizare [249].

Dinamica unui sistem molecular poate oferi informații referitoare la geometria moleculară și energiile; fluctuațiile atomice importante; fluctuațiile locale care conduc la formarea sau ruperea legăturilor de hidrogen; prezența interacțiunilor cu apa, ionii sau substanțele dizolvate; modificări de conformație; legăturile dintre enzimă și substrat; fluctuațiile energiilor libere; deformările macromoleculilor precum plierea proteinelor.

GROMACS (GRONingen Machine for Chemical Simulations) este un pachet de dinamică moleculară și minimizare conceput pentru simulări de proteine, lipide și acizi nucleici [250]; [251]. GROMACS este capabil să efectueze simulări de dinamică moleculară și minimizare, bazate pe mecanica moleculară. Minimizările sunt implementate cu metode derivate de ordinul întâi. Sunt disponibili algoritmi care se referă la metoda Steepest Descent și metoda Conjugate Gradient [252]. MD-urile sunt realizate prin rezolvarea ecuațiilor de dinamică clasică. Ecuațiile și algoritmi sunt rezolvate simultan în fiecare pas. Sistemul este urmărit pe durata hotărâtă de utilizator, având grijă ca temperatura și presiunea să rămână la valorile cerute [252].

GROMACS este unul dintre cele mai rapide și mai populare programe de simulare moleculară disponibile [253] și pentru că este gratuit și open-source. Este software-ul utilizat pentru studiul computațional al acestei lucrări. GROMACS se bazează în esență pe pachetul GROMOS, care a fost dezvoltat pentru simularea bio(macro)moleculilor în soluție [250]. Deși GROMACS a fost conceput pentru tratarea moleculelor biologice cu interacțiuni complexe de legare, realizarea de calcule pentru interacțiuni fără legare îl face potrivit pentru toate tipurile de simulări moleculare. Software-ul este capabil să suporte diferite câmpuri de forță (sunt disponibile GROMOS87, GROMOS96, OPLS/AA, Amber, CHARMM, Martini), să includă un solvent în interiorul reproducerii, cât și să furnizeze traiectoria obținută la sfârșitul simulării și diverse metode de analiză și vizualizare a traiectoriei în sine [252].

1.4.2 Andocarea

Procedura numită andocare include toate acele simulări de apropiere a moleculelor care vizează studierea modificărilor energetice ale speciilor moleculare implicate, în funcție de conformațiile și pozițiile acestora. În ansamblu, este o formă de optimizare a interacțiunii dintre două sau mai multe molecule, ținând cont de efectele sterice și interacțiunile care nu implică legare.

Acest lucru se realizează prin aplicarea unui screening virtual al structurilor care este utilizat pentru a poziționa o moleculă sau macromoleculă tridimensională într-o structură țintă, variind pozițiile, conformațiile și orientările și calculând energia de legare pentru toate pozițiile găsite. Acest instrument de calcul este utilizat de obicei pentru a studia relațiile moleculare pe care le poate avea un ligand cu macromolecula țintă. Având în vedere, de exemplu, o structură enzimatică, un substrat (atât natural, cât și nenatural) poate fi inserat în situsul său activ, optimizând poziționarea acestuia și prezicând modele de interacțiune între cele două.

Acest tip de analiză permite caracterizarea comportamentului moleculei în situsul activ, identificarea elementelor structurale ale enzimei și ale ligandului în scopul stabilizării substratului în sine, formularea mecanismelor de acțiune, ipoteza geometrică și variațiile sterice care trebuie aplicate ligandului pentru a crește interacțiunea acestuia [254]. Andocarea a fost folosită pentru a identifica noi molecule care pot fi utilizate în biocataliză: specificitatea enzimelor este de obicei investigată prin andocare necovalentă a diferitelor tipuri de substraturi în situsul catalitic [255]. În acest fel, a fost posibilă de exemplu identificarea substraturilor pentru dehidrogenaze/reductaze cu lanț scurt [256]. Andocarea moleculară a fost, de asemenea, utilizată pentru predicția enantioselectivității în diferite enzime, inclusiv lipaza B din *Candida antarctica* [257].

Această abordare este utilizată și în domeniul proiectării medicamentelor pentru descoperirea unor posibile medicamente de natură enzimatică și pentru îmbunătățirea caracteristicilor compușilor, crescând afinitatea acestora față de situsul activ.

Pentru a implementa o procedură de andocare este esențial să avem structura tridimensională exactă și cu un grad bun de definire atât a macromoleculei țintă, cât și a ligandului. Andocarea poate fi efectuată și pe o porțiune limitată a macromoleculei care, în cazul unei enzime, corespunde de obicei situsului activ. Din punct de vedere istoric, primele proceduri de andocare au fost efectuate ținând cont de teoria „lock and key”, care explica mecanismul de legare dintre substrat și situsul activ, tratând astfel atât proteina, cât și ligandul ca fiind rigide. Teoria relativ nouă „Induced-fit” creată de Koshland [258] presupune în schimb că situsul activ enzimatic este modelat în funcție de interacțiunea cu ligandul și că ligandul însuși își schimbă conformația pentru a se optimiza în raport cu proteina.

Pe baza acestui concept de andocare, situsul activ și ligandul ar trebui tratate ca structuri flexibile. Cu toate acestea, având în vedere costul resurselor informatice, cea mai utilizată și populară metodă de efectuare a andocării prevede ca ligandul să fie elementul flexibil în cadrul unei structuri enzimatice, care este în schimb menținută rigidă. Întrucât scopul andocării moleculare este de a prezice structura complexului ligand-receptor prin metode computaționale, andocarea presupune două etape de bază: (i) predicția conformațiilor, pozițiilor și orientărilor (pozițiilor) ligandului, reproducând în mod ideal interacțiunile experimentale; (ii) calculul afinității față de locul activ (energie de legare) a fiecărei poziții astfel încât acestea să poată fi clasificate pentru a găsi conformațiile preferate dintre toate cele generate. Acești doi pași sunt legați de metodele de eșantionare, respectiv de funcțiile de punctare. Eșantionarea se referă la generarea de poziții presupuse ale ligandului în situsul activ. Sunt strategii de căutare conformaționale care ar trebui să genereze un număr de

conformații care include și poziția cu care ligandul formează complexul țintă. Există diverse metode de eșantionare, inclusiv simulări ale dinamicii moleculare ale algoritmilor complecși și matematici. Printre acestea din urmă, algoritmi genetici (GA) care își au originea în teoria evoluționistă a lui Darwin sunt deosebit de interesanți.

Gradele de libertate ale ligandului sunt reprezentate în algoritm ca șiruri binare, numite gene. Combinațiile acestor gene formează cromozomii care reprezintă conformațiile posibile. Mutațiile genelor și încrucișările între cromozomi dau naștere la noi poziții, care sunt evaluate în funcție de funcția de punctare și, dacă sunt judecați pozitiv, vor da naștere unei noi generații. Scorul permite prezicerea afinității față de situsul activ, sub formă de forță de legare, a fiecăreia dintre pozițiile obținute. Unele tipuri de funcții folosesc câmpuri de forță (de exemplu, OPLS, CHHLUMBRU sau CHARMM) pentru a calcula această energie, însumând de obicei interacțiunile electrostatice și necovalente van der Waals.

Funcțiile îmbunătățite reușesc, de asemenea, să țină cont de legăturile de hidrogen, solvatarea și entropia [259].

Andocările prezente în această teză au fost realizate cu software-ul AutoDockTools [260]. AutoDock conține mai multe metode de generare a pozițiilor din care utilizatorul poate alege inclusiv algoritmi genetici lamarckieni și simulări Monte Carlo [259]. Funcțiile de punctare se bazează pe câmpul de forță AMBER și includ termeni precum interacțiuni vdW, legături de hidrogen, interacțiuni electrostatice, conformație și entropie de desolvatare. Pentru ca substraturile să fie andocate la locul enzimei de interes, trebuie specificată o porțiune 3D a proteinei în care urmează să fie calculate interacțiunile cu ligandul, denumită „gridbox”. Gridbox-ul este de obicei setat în porțiunea de proteină corespunzătoare situsului activ. Pentru această porțiune, sunt create „hărți” care specifică interacțiunea, desolvatarea și energiile electrostatice în puncte echidistante din gridbox pentru fiecare tip de atom prezent în ligand care urmează să fie studiat. Aceste hărți sunt apoi folosite pentru a calcula energiile pozițiilor în timpul andocării [261]. Notarea pozițiilor are loc în funcție de „energia lor de andocare”, folosită ca parametru al validității ipostazei. Energia de andocare corespunde sumei energiei intermoleculare și a energiei interne a ligandului [261].

Coordonatele relative și valorile estimate ale energiei de andocare și ale energiei libere de legare (cea din urmă ca sumă a energiei intermoleculare și a contribuției de torsiune) sunt apoi atribuite pozițiilor; pozițiile obținute în final de la andocare sunt reproduse grafic în cadrul enzimei pe AutoDockTools [261].

Pentru a calcula flexibilitatea ligandului, acestuia din urmă i se atribuie numărul de TORSDOF (grade de libertate torsionale) care corespunde numărului de legături rotative din substrat [261]. Legăturile marcate ca rotative vor fi responsabile pentru răsucirile interne ale ligandului și, prin urmare, pentru pozițiile asumate în timpul andocării. Cu AutoDock este, de asemenea, posibil să se trateze părți ale receptorului ca fiind flexibile [261].

1.5 Valorificarea glicerolului

Glicerolul sau 1,2,3-propantriolul este cel mai simplu polioliol, fiind sintetizat biologic în mod natural de animale, plante și microorganisme prin diferite căi.

Industrial, glicerolul poate fi produs prin diferite procese: ca și co-produs al saponificării sau hidrolizei grăsimilor și uleiurilor la fabricarea săpunului; prin fermentarea zaharurilor la glicerol de către microorganisme și specifice; ca și co-produs al transesterificării grăsimilor și uleiurilor la obținerea biodieselului.

Ca o consecință a creșterii producției de biodiesel din ultimul deceniu, din 1999 până în 2009 cantitatea de glicerol rezultată din acest proces a crescut de 10 ori, ajungând la peste 2 milioane de tone, ceea ce a reprezentat mai mult de 50% din producția mondială de glicerol. De atunci, glicerolul provenit din industria de biodiesel a dominat piața acestei substanțe chimice, iar glicerolul sintetic (obținut din resurse petroliere) a ajuns să reprezinte mai puțin de 0,25% din total. Surplusul de glicerol brut creat în ultimul deceniu a cauzat efecte dramatice asupra pieței glicerolului. De exemplu, în Statele Unite, în perioada 2004-2006, prețul glicerolului brut a scăzut de la 25 de cenți USD per litru la mai puțin de 5 cenți USD per litru, ca urmare a creșterii de 10 ori a producției de biodiesel.

Ca răspuns la aceste schimbări, au fost dezvoltate noi procese industriale pentru producerea de substanțe chimice cu valoare adăugată pe bază de glicerol. Producția de epiclorhidrină, propilenglicol și metanol din glicerol a ajutat la reducerea surplusului de glicerol și creșterea valorii sale comerciale. La jumătatea anului 2014, valoarea comercială a glicerolului brut era de 240 USD pe tonă datorită noilor căi de utilizare a glicerolului industrial.

Diversificarea în continuare a pieței glicerolului în noi aplicații este considerată un pas necesar pentru consolidarea și îmbunătățirea dezvoltării durabile a biorafinăriilor pe sectoarele combustibililor și chimiei.

Un scenariu dezirabil pentru dezvoltarea unor biorafinării bazate pe glicerol ar implica utilizarea acestuia pentru obținerea de substanțe chimice brute și produse fabricate în volum mare la costuri relativ scăzute. Valorificarea glicerolului brut poate fi realizată prin conversia sa în produse cu valoare adăugată mare, deși este imperativ să se utilizeze abordări ecologice și durabile. Una dintre principalele direcții de investigație pentru valorificarea glicerolului a fost utilizarea tehnologiilor de biotransformare, a căror amploare a crescut exponențial în ultimul deceniu (

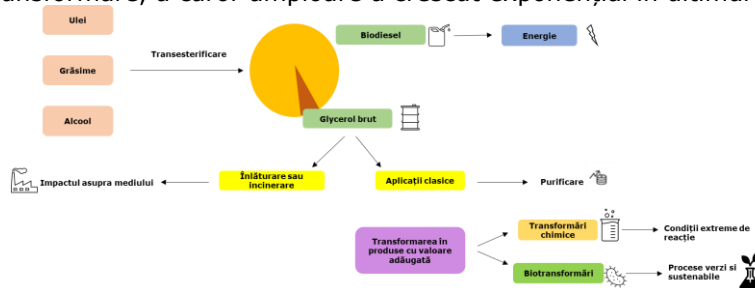


Figura 10).

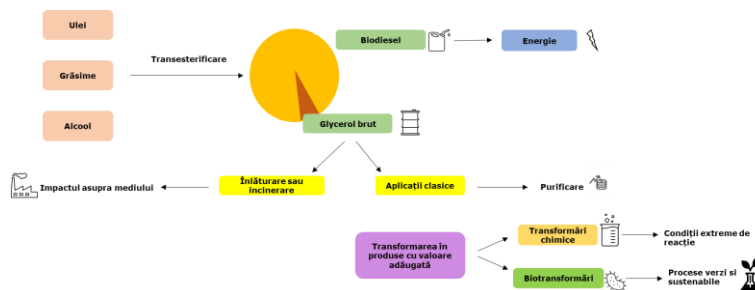


Figura 10 Căi de obținere și valorificarea glicerolului

Majoritatea compușilor cu valoare adăugată ridicată obținuți din glicerol brut sunt produse ale bioconversiilor microbiene. Tabelul 10 rezumă cele mai recente rezultate raportate în literatură privind biotransformările glicerolului brut.

Tabelul 10 Principalii compuși organici obținuți din glicerol prin procedee de biotransformare

Produs	Microorganism	Concentrația inițială de glicerol brut [g/L]	Randament [g/L]	Timp [h]	Ref.
Acid Malic	<i>Aspergillus niger</i> PJR1	160	83,23	192	[262]
	<i>Aspergillus niger</i> PJR1	161,56	92,64 ± 1,54	92	[263]
1,3-Propandiol	<i>L. reuteri</i> CH53	450 g/L glicerol brut + 450 g/L glucoză, 21 mL/h	68,32 ± 0,84	54	[264]
	Consoțiu microbial	130 g/L și o viteză de diluție de 0,096 h ⁻¹	57,86	11	[265]
2,3-Butandiol	<i>R. ornithinolytica</i> B6 overexpressing budABC	50 g/L. Când concentrația reziduală de glicerol a scăzut sub 20 g/L, s-au adăugat 100 mL de soluție stoc de glicerol (540-600 g/L).	78,1	126	[266]
Acid citric	<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC 5029	170	79,0	528	[267]
	<i>Yarrowia lipolytica</i> NG40/UV5	Nedeclarat	100 ± 3,4	96	[268]
	<i>Y. lipolytica</i> ACA-YC 5031	70 g/L + 2,0 g/L compuși fenolici + NaCl 0,5 w/w%	54	233	[269]
Eritritol	<i>Y. lipolytica</i> ACA-DC 5029	170	65,8	528	[267]
Acid Succinic	<i>E.coli</i> K-12	30	117,99	4	[270]
	<i>Y. lipolytica</i> PGC01003	120,9/L + Când glicerolul rezidual a scăzut sub 15 g/L, aproximativ 80 - 100 mL de glicerol brut 700 g/L au fost alimentați pentru a suplimenta sursa de carbon	209,7	322	[271]

Produs	Microorganism	Concentrația inițială de glicerol brut [g/L]	Randament [g/L]	Timp [h]	Ref.
	Actinobacteria (Isolate AKR177)	67 g/L + Când glicerol rezidual a scăzut sub 5 g/L, alimentare cu impulsuri de 20 g/L	86,9	264	[272]
	<i>Enterobacter</i> sp. LU1	50 g/L + suplimentare 30 g/L la 186 ore; impulsurile de alimentare implicau și adăugare de lactoză.	69,0 ± 2,50	288	[273]

1.5.1 Lacazele

Lacazele (benzendiol: oxigen reductaze) aparțin grupului de metaloenzime cu atomi de cupru, care catalizează oxidarea substraturilor, în general fenolice, cu reducerea simultană a oxigenului molecular la apă.

Prima lacază fost descrisă de Yoshida după extracția din exsudatele copacului japonez *Rhus vernicifera*. Caracteristica lacazelor este dată de cei patru atomi de Cu pe care îi conține în structură. Lacazele au fost izolate dintr-o largă varietate de plante, ciuperci și bacterii. În plante, lacaza a fost identificată în varză, napi, sfeclă, mere, cartofi, pere și în alte vegetale. A fost de asemenea găsită și în zeci de insecte, din genurile: *Bombys*, *Calliphora*, *Diploptera*, *Drosophila*, *Lucilia*, *Manduca*, *Musca*, *Oryctes*, *Papilio*, *Phormia*, etc. [274]

Majoritatea lacazelor descrise în literatură au fost izolate din ciuperci: ascomycetes, deuteromycetes și basidiomycetes. Cei mai frecvenți producători de lacaze sunt ciupercile care produc putrefacția lemnului *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea*, *Trametes villosa*, *Trametes gallica*, *Cerena maxima*, *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus eryngii*, etc.

Mecanismul de reacție al proceselor catalizate de lacaze se explică prin prezența unor centre diferite de cupru în molecula enzimei. Toate lacazele sunt caracterizate prin prezența a cel puțin unui atom de cupru tip-1 (T1) care este responsabil de culoarea albastră și unde are loc și oxidarea substratului reducător, împreună cu cel puțin alți trei atomi de cupru suplimentari: un atom de tip-2 (T2), și doi atomi de tip-3 (T3), aranjați într-un grup trinuclear unde oxigenul molecular este redus la două molecule de apă [275], [276].

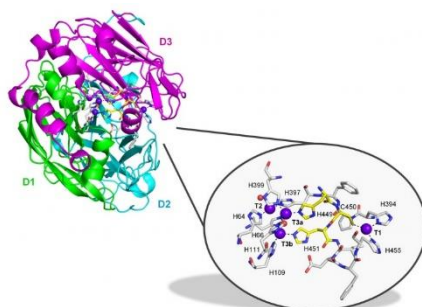


Figura 11 Structura generală și detaliile centrului activ al lacazei din *Trametes trogii*.

În Figura 11, domeniile cupredoxin (D1, D2 și D3) sunt reprezentate cu verde, albastru și roz. Sferele albastre-violete reprezintă ioni de cupru, iar sferele roșii reprezintă coordonarea moleculelor de apă. Reziduurile căii interne de transfer de la Cu-T1 la grupul trinuclear Cu-T2/T3 sunt reprezentate cu galben. Reziduurile implicate în prima sferă de coordonare catalitică a ionilor de cupru și interacțiunea acestora sunt reprezentate prin linii punctate negre [276].

Moleculele de substrat sunt legate în apropierea centrului T1-Cu care este mai mic decât centrul de legare al oxigenului (molecula de substrat este oxidată de către centrul T1-Cu). Are loc obstrucționarea unui electron (format în urma oxidării substratului) printr-un mecanism care implică substratul și centrul T1-Cu. Astfel, moleculele de substrat sunt transformate în radicali liberi, care pot fi supuși unei alte reacții de oxidare sau de cuplare radicalică, având ca rezultat formarea de oligomeri sau polimeri.

Electronul obstrucționat se deplasează de la centrul T1-Cu la clusterul trinuclear printr-o cale cisteină-histidină. Centrul trinuclear, care joacă un rol important în mecanismul catalitic, este format din ionii de cupru de tip-2 și tip-3. Procesul catalitic începe după ce moleculele de oxigen se atașează de cluster-ul trinuclear și inhibă/blochează intrarea ulterioară a oricărei alte molecule. Centrul T2-Cu reacționează cu două molecule de histidină și o moleculă de apă, în timp ce centrul T3-Cu reacționează cu trei molecule de histidină și o moleculă de hidroxid.

În etapa finală, molecula de oxigen este transformată în apă de lacază în două etape. În prima etapă, primul electron este redus de centrul T2-Cu și T3-Cu, în timp ce reducerea celui de-al doilea electron este asistată de mediatorul de peroxid care are o legătură cu centrul T2-Cu și T1-Cu, legat de centrul T3-Cu prin legături covalente cistidină-histidină [277], [278].

Sistemul mediator al lacazelor

În general lacazele au un potențial de oxidare scăzut, care restricționează procesul de oxidare la grupări fenolice. Totuși, aceste enzime pot prezenta capacitate ridicată de oxidare față de compuși non-fenolici în prezența unui mediator. Anumite molecule mediator pot acționa ca purtători de electroni între substrat și enzimă. Mediatorii modulează potențialul redox al sistemului de reacție și prin urmare extind domeniul de aplicare al lacazelor și la structurile non-fenolice [279], [280].

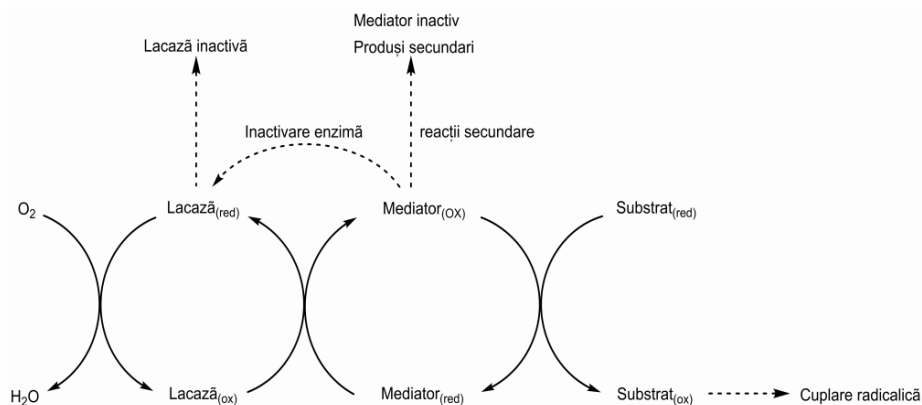


Figura 12 Sistemul catalitic mediator de oxidare a lacazei și potențialele efecte secundare nedorite

Prima substanță identificată ca mediator pentru lacaze a fost 1-(3-cloro-4-metoxifenil)etanol (ABTS). Acesta este oxidat (pierde un electron) în prezența lacazei cu ajutorul mediatorului (ABTS) pentru a produce 1-(3-clor-4-metoxifenil)etanona, cu reducerea oxigenului la o moleculă de apă. În continuare 1-(3-cloro-4-metoxifenil)etanona suferă o altă transformare structurală pentru a forma 2-cloro-1,4-dimetoxibenzen și 3-cloro-4-metoxibenzaldehidă [280].

Au fost raportați și alți compuși care pot funcționa ca mediatori ai lacazelor, în special compuși cu funcționalitate N-hidroxi și s-a constatat că aceștia prezintă potențiale redox ridicate și reactivitate puternică față de lignină. Compuși N-hidroxi care prezintă reactivitate redox sunt: 1-hidroxibenzotriazolul (HBT), urmat de acidul violuric (VLA), N-hidroxifitalimida (HPI) și 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil (TEMPO) [279].

Pentru oxidarea substraturilor non-fenolice au fost identificate trei mecanisme de reacție prin intermediul mediatorilor și anume: (1) transfer de electroni (ET), (2) transferul atomilor de hidrogen (HAT) și (3) mecanismul ionic [279].

ABTS folosește calea ET, compușii N-hidroxi precum HBT, VLA sau HPI efectuează transferul radicalilor de hidrogen. Pentru radicalul stabil TEMPO și derivații acestuia (de ex. peroxi) este propus un mecanism ionic, în care lacaza oxidează radicalul stabil oxil la ionul de oxoamoniu, care apoi obstrucționează α -protonul substratului [279].

1.5.2 Aplicații ale lacazelor

Exemple de aplicații ale lacazelor în diferite industrii și sectoare tehnologice au fost incluse în Tabelul 11.

Tabelul 11 Aplicațiile lacazelor în diferite domenii

Domeniu	Aplicație
Industria alimentară	în procese care îmbunătățesc sau modifică aspectul culorii alimentelor sau băuturilor, la determinarea

	acidului ascorbic, gelifierea pectinei, în panificație [281]
<i>Industria hârtiei</i>	substituirea reactivilor care conțin clor folosiți în industria de prelucrare a hârtiei, reducând astfel poluarea cauzată de compușii organici cu clor [282]
<i>Industria textilă</i>	înălbirea și vopsirea fibrelor, modificarea și/sau îmbunătățirea proprietăților textilelor; bioremedierea apelor uzate folosite în industria textilă [283]
<i>Biocombustibili</i>	polimerizarea și îndepărtarea compușilor fenolici care inhibă fermentația zaharurilor prezente în materialul hidrolizabil lignocelulozic [284]
<i>Chimia organică</i>	producerea polimerilor și compușilor farmaceutici [285]
<i>Industria cosmetică</i>	decolorarea și/sau vopsirea părului implică de obicei utilizarea de substanțe chimice dure, care pot deterioara părul. Precursorii de coloranți pot fi oxidați la agentul colorant folosind lacază în locul agentului chimic [286]

1.5.3 Imobilizarea lacazelor

Imobilizarea lacazelor este o metodă importantă pentru creșterea potențialului de aplicare a acestor enzime în procesele industriale. Obiectivul principal al imobilizării este recuperarea biocatalizatorului prin etape simple de separare, cum ar fi filtrarea.

În acest scop, biocatalizatorul trebuie să fie suficient de activ și stabil pentru a fi reutilizat în mai multe cicluri de reacție [287]. Imobilizarea biocatalizatorilor este benefică din punct de vedere economic pentru funcționarea bioproceselor în sistem continuu [288], iar utilizarea unei enzime imobilizate permite simplificarea în mare măsură a designului reactorului și controlul eficient al reacției [289].

Deși au fost raportate numeroase studii de imobilizare a lipazelor și lacazelor într-o gamă extinsă de aplicații industriale, proiectarea de noi protocoale care pot permite îmbunătățirea proprietăților enzimaticice în timpul imobilizării rămâne încă un obiectiv actual [289]. Majoritatea studiilor de imobilizare au fost realizate cu lacaza din *Trametes versicolor*.

Mohammadi și colab. au raportat imobilizarea covalentă pe suporturi sol-gel funcționalizate cu grupări epoxidice a lacazei din *Myceliophthora thermophila*. Încărcarea cu enzimă pe suport a fost de aproximativ 30 mg/g în condiții optime (pH 4,5, 24 ore). Efectul pH-ului, temperaturii și solventului organic asupra activității enzimei imobilizate a fost determinat și comparat cu cel ale enzimei libere. În general, s-a constatat că enzima imobilizată este stabilizată în comparație cu enzima liberă [290].

Kadam și colab. au raportat imobilizarea covalentă a lacazei din *Trametes versicolor* pe nanotuburi halosit modificate cu Fe_3O_4 și funcționalizate cu chitosan, folosind glutaraldehidă ca agent de legare. Suportul rezultat a prezentat 92,74 mg/g capacitate de imobilizare a lacazei și după imobilizare 92% din activitate a fost recuperată. Lacaza imobilizată a prezentat stabilitate mai mare la pH și temperatură, și stabilitate operațională ridicată după 11 cicluri de utilizare [291].

În 2017 același grup a raportat imobilizarea lacazei din *Trametes versicolor* pe nanotuburi halosit modificate cu Fe_3O_4 și funcționalizate cu γ -aminopropiltriethoxisilan, folosind glutaraldehidă ca linker. După imobilizare activitatea recuperată a fost de 90,20% iar capacitatea de încărcare a suportului a fost de 84,26 mg/g. După 9 cicluri de reacție activitatea relativă a fost 80,49% [292].

Maryskova și colab. au raportat imobilizarea lacazei din *Trametes versicolor* pe nanofibre de poliamidă/chitosan, folosind ca și agent de reticulare albumina serică de bovină și hexametildiamina (HMD), iar ca agent de legare glutaraldehidă. Au fost obținute 2 preparate enzimatiche cu activitate foarte similară la aproximativ 150 U/g de lacază atașată. Lacaza imobilizată cu HMD s-a dovedit a fi mai eficientă la degradarea Bisfenolului A și 17α -etinilestradiolului în comparație cu enzima nativă [293].

Nguyen și colab. au raportat imobilizarea lacazei din *Trametes versicolor* pe suporturi de chitosan folosind ca agent de reticulare glutaraldehida. Preparatele obținute au fost utilizate pentru degradarea coloranților cu sulf [294].

Amin și colab. au raportat imobilizarea covalentă a lacazei din *Trametes versicolor* pe nanoparticule de magnetită modificate, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{SiO}_2$, iar preparatele obținute au fost testate în procesul de ameliorarea a delignificării reziduurilor organice ale uleiului de măsline. După 6 ore de incubare, degradarea ligninei și fenolului de către lacaza imobilizată a fost estimată la 77,3% și, respectiv, 76,5%. Lacaza imobilizată și-a păstrat 70% din capacitatea inițială de degradare după 11 utilizări în loturi succesive de tescovină de măsline. Mai mult, lacaza imobilizată a păstrat 70% din activitatea sa inițială după 21 de zile de depozitare la temperatura camerei [295].

Gao și colab. au raportat co-imobilizarea lacazei și a 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil (TEMPO) pe nanoparticule magnetice Fe_3O_4 , funcționalizate cu grupări amino prin tehnica de reticulare cu glutaraldehidă. Când raportul dintre TEMPO și lacază a fost de 0,3 mM/g: 120 U/g pe nanoparticulele co-imobilizate de lacază și TEMPO, randamentul maxim de decolorare a fucsinei acide a fost de 77,41%. În plus, nanoparticulele co-imobilizate și-au păstrat peste 50% din activitate după opt cicluri de reacție [296].

Yuan și colab. au raportat în 2018 imobilizarea lacazei din *Coriolus versicolor* prin adsorbție pe suporturi de nanoceluloză bacterială (BNC), iar performanțele catalitice ale preparatelor obținute au fost testate în reacția de oxidare a ABTS-ului și au fost utilizate cu succes în 10 cicluri de reacție [297].

Tarasi și colab. au raportat imobilizarea prin adsorbție fizică pe trei tipuri de nanoparticule magnetice Fe_3O_4 îmbunătățite a lacazei din *Trametes versicolor*. Unul din preparatele obținute a avut activitatea maximă, egală cu cea inițială, la pH 4 și a menținut 70% din activitatea inițială în intervalul de temperatură de 15-55 °C [298].

Cao și colab. au raportat imobilizarea lacazei pe polidopamină modificată 3D, interconectă cu silice macroporoasă. Activitatea enzimatică a lacazelor imobilizate a fost 295,9 U/g, respectiv 222,2 U/g. Stabilitatea și reutilizarea celor două lacaze imobilizate au fost îmbunătățite în comparație cu lacaza liberă [299].

Kacem și colab. au realizat în premieră imobilizarea lacazei din *Trametes versicolor* prin entrapare într-o membrană polimerică de incluziune din lichid ionic

[PILM_s] și policlorură de vinil. Randamentul de imobilizare a fost foarte mare în toate cazurile ($99,2 \pm 0,6\%$), dar stabilitatea operațională a fost scăzută [300].

Vera și colab. au studiat imobilizarea lacazelor din *Trametes versicolor* și *Aspergillus sp.* prin legare covalentă pe microsfele de poli(glicidilmetacrilat), iar preparatele obținute au prezentat stabilitate ridicată pentru un domeniu de pH cuprins între 2,0 și 7,0 [301].

Zhu și colab. au raportat imobilizarea lacazei din *Trametes versicolor* prin adsorbție fizică și legare covalentă pe suporturi magnetice interconectate cu silice mezoporoasă. Probele obținute au fost testate în reacția de oxidare în amestec cu ABTS, menținând o activitate de peste 70% după 10 cicluri de reacție [302].

Wu și colab. au realizat imobilizarea lacazei prin legare covalentă pe suport magnetic funcționalizat cu grupare amino. Probele s-au caracterizat prin stabilitate ridicată la valori scăzute ale pH-ului și temperaturi înalte, menținând 89% din activitatea inițială după 28 de zile. Preparatele s-au testat și în procedeul de înlăturare a 2,4-diclorofenolului prezent în apele uzate [303].

Nyanhongo și colab. au studiat imobilizarea lacazelor din *Agaricus bisporus* și *Trametes versicolor* prin legare covalentă pe microsfele de poli(glicidilmetacrilat). Preparatele obținute au fost testate cu succes în procesul de înlăturare a pesticidelor [304].

Sarno și colab. au realizat imobilizarea lacazei din *Aspergillus sp.* pe suporturi magnetice, utilizând-o la degradarea anilinei cu randament de până la 98% [305].

Babadostu și colab. au studiat imobilizarea lacazelor prin afinitate pe nanoparticule magnetice. Probele au fost utilizate ca și biosenzori pentru monitorizarea conversiei fenolului în medii de cultură bacteriene [306].

Smith și colab. au realizat imobilizarea directă a mai multor biomolecule, inclusiv a lacazei, prin legare covalentă pe nanofibre prin tehnica de reticulare cu glutaraldehidă [307].

Shokri și colab. au raportat imobilizarea lacazei pe suporturi polizaharidice naturale, folosind ca inițiator acid violuric, TEMPO, N-hidroxiftalimidă și ABTS. Aplicațiile acestor preparate au constat în detectarea și degradarea agenților poluatori din mediu [308].

Melo și colab. au realizat imobilizarea lacazei din *Trametes versicolor* pe rășini metacrilice. Studiul a avut ca scop eliminarea bisfenolului-A (BPA) din soluțiile apoase. Forma imobilizată a enzimei a prezentat o activitate de patru ori mai mare decât forma sa nativă la temperaturi cuprinse între 10°C și 60°C [309].

Primozić și colab. au realizat imobilizarea lacazei din *Trametes versicolor* sub formă de agregate enzimatiche reticulate (CLEAs). Acestea au fost testate pentru degradarea diclofenacului. Probele au menținut 50% din activitatea inițială după 4 cicluri de reacție [310].

Bayramoglu și colab. au studiat efectele imobilizării lacazei din *Trametes versicolor* pe suporturi magnetice Fe₃O₄ funcționalizate cu grupări epoxi și a lacazei din *Pleurotus ostreatus* pe suporturi acrilice (EUPERGIT C 250L) funcționalizate cu grupări epoxi, cu scopul degradării coloranților din soluțiile apoase [311].

2 Contribuții originale

2.1. Obiectivele tezei de doctorat

Teza de doctorat este focalizată pe dezvoltarea și testarea unor sisteme biocatalitice de obținere a unor bioderivați de natură monomerică sau poliesterică utilizând materii prime regenerabile. Pornindu-se de la principiile chimiei verzi și avantajele cunoscute ale catalizatorilor enzimatici pentru a obține noi bioderivați, compuși cu multiple utilizări în diverse domenii, teza a avut ca obiectiv general investigarea căilor de sinteză pentru realizarea de asemenea produși, în strânsă legătură cu criteriile de sustenabilitate ce guvernează dezvoltarea actuală a bioeconomiei. În Figura 13 sunt prezentate schematic căile de sinteză testate încadrate într-un sistem de reacții care are la bază utilizarea materiilor prime de tipul uleiurilor vegetale sau zaharurilor.

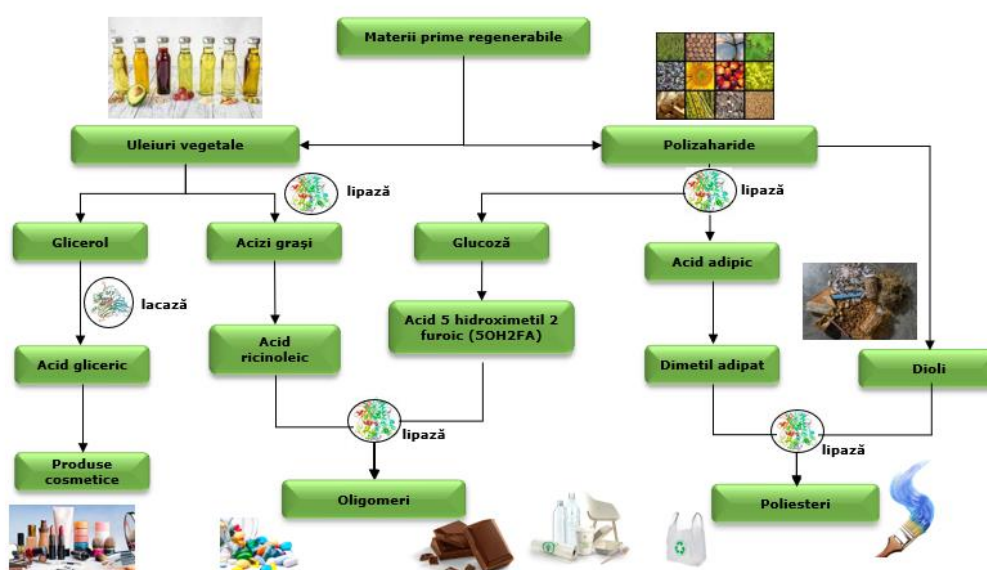


Figura 13 Reprezentarea schematică a obiectivelor tezei de doctorat

Abordarea acestui vast domeniu s-a realizat prin stabilirea unor obiective specifice, care au inclus o parte computațională menită să elucideze capacitatea anumitor enzime din clasa lipazelor de realizare a biotransformărilor urmărite, urmată de sinteza de noi oligoesteri și a biodegradării acestora, oxidarea enzimatică selectivă a glicerolului și evaluarea unui biocatalizator mai puțin cunoscut pentru rezoluții cinetice enantioselective. S-a acordat de asemenea atenție deosebită ingineriei reacțiilor studiate și caracterizării produșilor obținuți.

Obiectivele principale ale tezei de doctorat au fost:

1. Studii computaționale asupra lipazelor din diferite surse microbiene.
2. Biotransformarea uleiului de ricin în oligomeri nesaturați cu unități furanice prin metoda „one-pot”, utilizând lipaze native și imobilizate.
3. Sinteza enzimatică și caracterizarea poliesterilor derivați ai acidului adipic
4. Studii de biodegradare a poliesterilor în medii lichide.

5. Oxidarea enzimatică selectivă a glicerolului, utilizând lacaze immobilizate prin legare covalentă.
6. Evaluarea regioselectivității lipazei din *Pseudomonas stutzeri* pentru rezoluția cinetică a unui derivat furanic.

2.2. Studii computaționale asupra lipazelor din diferite surse microbiene.

În cadrul acestui capitol au fost utilizate diferite metode computaționale pentru a evalua:

- efectul parametrilor fizici de reacție (temperatura și presiunea) asupra structurii tridimensionale și asupra suprafețelor a două lipaze microbiene disponibile comercial;
- interacțiunile acestor lipaze cu diferite substraturi oligoesterice ecologice, alifatic și aromatice.

Scopul acestor metode de modelare moleculară și andocare este de a oferi o predicție a schimbărilor conformației proteinelor și implicit a situsului activ pe care le suferă enzimele atunci când sunt utilizate în condiții diferite de reacție.

Trebuie menționat faptul că abordarea computațională are limitări, deoarece prin utilizarea metodelor selectate nu este posibilă simularea variațiilor de mediu și a problemelor experimentale, cum ar fi probleme de transfer de masă în timpul reacțiilor biocatalitice sau schimbarea continuă a naturii substratului și a mediului de reacție datorită progresului reacțiilor de polimerizare.

2.2.1 Calcule de dinamică moleculară pentru lipaza din *Candida antarctica* B

Dinamica moleculară (MD) este o tehnică ce explorează posibilitățile conformaționale ale sistemului în timp. Oportunitatea de a simula și deci de a studia complex fenomenul de mare precizie definesc simulările de MD drept o tehnică potrivită pentru investigarea proceselor de activare a lipazelor. Pot fi efectuate diferite variante de dinamică moleculară de bază pentru a perturba echilibrul sistemului, pentru a modifica acuratețea și, în consecință, a reduce timpul necesar de simulare. Ideea MD este simularea unui sistem pentru a observa un fenomen dependent de evoluția în timp a sistemului. Natura fenomenului definește probabilitatea ca acesta să se întâmple în timpul simulării. Cu alte cuvinte, probabilitatea de a observa un fenomen dat este o funcție ce depinde de natura sa intrinsecă și de timpul total simulat. Un eveniment foarte probabil se va întâmpla de multe ori într-o singură traiectorie scurtă, un eveniment rar nu se poate întâmpla deloc într-una foarte lungă [312].

Ideea de non-echilibru MD (sau steered MD) este de a forța o alterare a sistemului chimic simulat, care tinde spontan spre un echilibru termodinamic, pentru a accelera evenimentul dorit sau pentru a face apariția lui mai probabilă. În principiu, conceptul este foarte simplu și se bazează pe alterarea unuia sau mai multor parametri în timpul simulării (gradient de presiune, gradient de forțe etc.).

O altă strategie evidentă de a observa un fenomen lent sau improbabil este creșterea timpului de simulare. Deși a permite sistemului să evolueze spontan pe toată durata necesară este mult mai riguroasă decât forțarea neechilibrului prin aplicarea forțelor sistemului, costul de calcul este de obicei prea mare pentru a urma această cale. Necesitatea de a reduce costul de calcul poate fi satisfăcută doar prin reducerea preciziei simulării. Pe acest concept s-au depus multe eforturi și în prezent este posibil să se simplifice definirea sistemului chimic cu prețul unei pierderi de precizie, adesea tolerabilă dacă nu afectează grav fenomenul de interes.

Modificările de precizie pot fi realizate în principal schimbând tipul câmpului de forță. Diverse tipuri de câmpuri de forță pot fi utilizate în timpul simulărilor MD și sunt clasificate pe baza diferitelor ținte de simulare pe care le descriu cel mai bine

(proteine, molecule organice, ADN etc.) sau pe baza acurateții lor (granulație fină, granulație grosieră).

Fiecare tip de MD și fiecare câmp de forță are avantaje și dezavantaje și utilizatorul ar trebui să poată alege condițiile de simulare potrivite, pe baza sistemului care trebuie simulat a scopului care trebuie atins.

- câmpuri de forță cu granulație fină, cum ar fi OPLS-AA56, de obicei include toate câmpurile de forță atomice, unde moleculele sunt de fapt reprezentate de toți atomii lor;

- câmpurile de forță atomice unite, cum ar fi GROMOS,57 reprezintă numai hidrogenii polari, alți hidrogeni nu sunt simulați în mod explicit, dar sunt considerați împreună cu atomii grei de care sunt legați (adică CH₃);

- câmpurile de forță cu granulație grosieră, cum ar fi MARTINI, 58 reprezintă molecule cu blocuri moleculare, în care fiecare sferă simulată poate reprezenta mai mult de o grupare chimică (adică CH₄-CH₃-CH₃-).

Structurile enzimatică nu sunt structuri fixe și rigide, deoarece conțin un număr mare de legături flexibile și astfel posedă conformații diferite. Prin urmare, a fost util studiul comportamentului acestora în timp, examinând adaptarea conformației în funcție de mediu și de condițiile termice simulate.

Structurile echilibrate obținute din minimizări au fost utilizate ca structuri de start pentru dinamica moleculară aferentă. Câmpul de forță utilizat pentru două lipaze considerate în acest studiu a fost OPLS-AA. Condițiile simulate au fost:

- pH 7, la temperaturi de 343 și 358K, presiuni: 0,1 și 1 bar pentru lipaza din CalB;
- pH 7, la temperaturi de 323 și 343K presiuni: 0,1 și 1 bar pentru lipaza din *Ps. stutzeri*.

Toate simulările s-au realizat pe o durată de 500 ns.

Succesul unei dinamici este garantat de stabilitatea presiunii și temperaturii în timpul simulării. Pe întreaga durată a dinamicii, acești doi parametri rămân constanți și aproape de valoarea setată.

Analiza structurii 3D a lipazei din *Candida antarctica* B

Lipaza din *Candida antarctica* B (CalB) este un catalizator eficient pentru hidroliza în apă a esterilor, poliesterilor și trigliceridelor și esterificarea/poliesterificarea în solvenți organici sau sisteme fără solvent. Este folosită în multe aplicații industriale datorită nivelului ridicat de enantioselectivitate, activitate pentru o gamă largă de substraturi, stabilitate termică și stabilitate în solvenți organici. Diferite structuri cristalografice ale lipazei CalB sunt disponibile pe Protein Data Bank PDB, dar 1TCA este cea mai precisă, cu o rezoluție de 1,55 Å. Această structură a fost utilizată pentru toate studiile computaționale din cadrul acestei teze de doctorat. Lipaza CalB (Figura 14) este o lipază cu masa moleculară de 33 kDa și aparține familiei α/β hidrolazelor cu o triadă catalitică conservată constând din serina 105, histidina 224 și acidul aspartic 187.

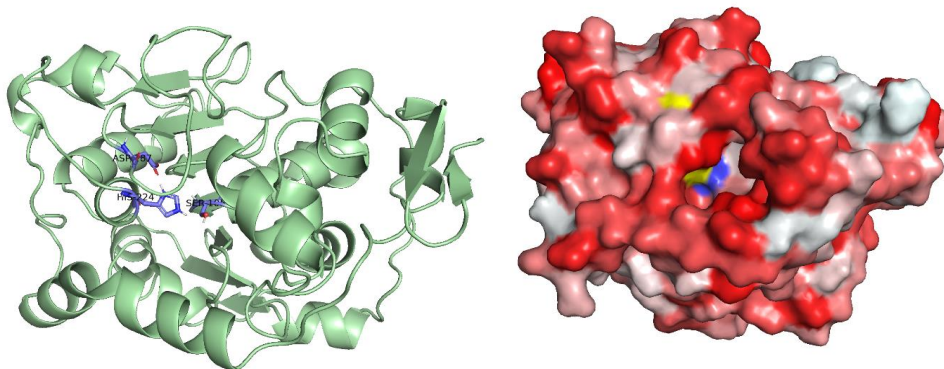


Figura 14 Structura tridimensională a lipazei din CalB (cod PDB:1TCA), aminoacizii triadei catalitice Ser 105, Asp 187 și His 224 sunt marcați cu albastru (a); Analiza suprafeței lipazei CalB, în roșu sunt reprezentate zonele hidrofobe ale suprafeței enzimei și în alb cele hidrofile, cu albastru este marcată Ser 105 iar cu galben Asp 187.

Situsul de legare care continuă triada catalitică constă dintr-un buzunar de formare a intermediarului acil-enzimă. Spre deosebire de majoritatea lipazelor, CalB are un capac (lid) foarte mic, care nu este suficient de mare pentru a acoperi total intrarea în situsul activ și, prin urmare, enzima nu prezintă activare interfacială.

Analiza rezultatelor obținute prin MD

Pentru a evalua stabilitatea conformațională, flexibilitatea și comportamentul lipazelor, în diferite condiții de temperatură și presiune, au fost efectuate diferite analize pentru simulările de MD. Cele mai uzuale analize sunt [313]:

- RMSD (Root Mean Square Deviation)- esențială pentru a estima stabilitatea proteinei în comparație cu structura inițială;
- RMSF (Root Mean Square Fluctuation) a fost determinat pentru a evalua fluctuațiile medii ale aminoacizilor în timpul simulării;
- Rg (Raza de rotație) și valori medii Rg este utilizată ca și criteriu de compactitate a proteinei.
- SASA Suprafața accesibilă la solvent este considerată un factor determinant în studiile privind stabilitatea și pliarea proteinelor;
- Numărul de legături de hidrogen (H bond).

Figura 15 prezintă valorile generale RMSD obținute din simulări ale lipazei CalB în diferite condiții de temperatură și presiune timp de 500 ns. Stabilitatea lipazei este demonstrată de valorile RMSD care indică atingerea unui echilibru conformațional în ambele condiții termice, evidențiată de stabilizarea în timp a lanțului proteic.

În primele nanosecunde ale celor patru dinamici moleculare există o fază de ajustare în care se observă fluctuații față de structura inițială demonstrând căutarea echilibrului conformațional. Aceste abateri se stabilizează treptat și RMSD-ul își asumă o valoare mai mult sau mai puțin constantă, indicând absența unor modificări conformaționale semnificative. Graficul corespunzător lipazei CalB la 70°C, 1 bar indică o deviație de 0,2 nm la început care s-a echilibrat în primele nanosecunde, iar pe măsură ce simularea a continuat nu au apărut fluctuații mai mari de 0,3 ns. Aceste

rezultate sunt în concordanță cu cele raportate de Trodler și Pleiss [314] în studiul comportării lipazei la 300 K și presiune de 1 bar.

Cele mai mari fluctuații se pot observa în cazul temperaturii de 85°C și presiune de 0,1 bar, când valoarea RMSD a atins valori de 0,5 nm iar fluctuația s-a menținut la această valoare până la sfârșitul simulării.

În ceea ce privește presiunea, se observă o creștere invers proporțională a fluctuațiilor cu valoarea presiunii astfel că la presiuni mai scăzute fluctuațiile au fost cu aproximativ 0,1 nm mai mari la ambele temperaturi în comparație cu valorile obținute la valori ale presiunii de 1 bar.

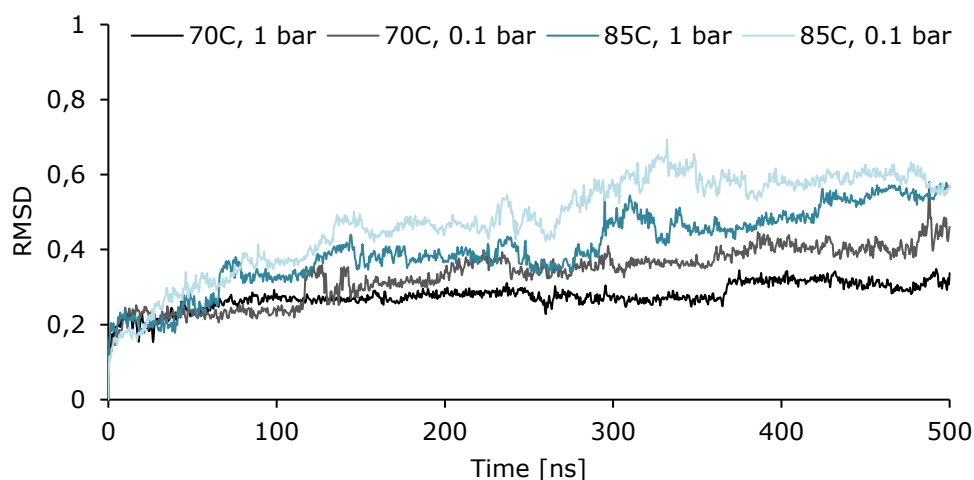


Figura 15 Evoluția RMSD în timp pentru lipaza CaLB în diferite condiții de temperatură și presiune

Mobilitatea aminoacizilor (reziduurilor) în timpul simulării MD de 500 ns a fost testată prin calculul RMSF pentru fiecare lipază. RMSF este un instrument simplu de măsurare a rigidității lanțului polipeptidic. Acesta calculează abaterile coordonatelor atomilor C-alfa din poziția lor medie. Modelul de flexibilitate reflectă locația elemente de structură secundară din structura proteinei.

Lipaza din CaLB prezintă un domeniu mic al capacului, care poate fi identificat aproximativ cu un helix cuprinzând reziduuri de la Thr142 la Ala146. Capacul mic al CaLB este caracterizat de un RMSF sub 0,4 nm, în timp ce valorile RMSF de 0,75 nm sunt atribuibile reziduurilor 1-20 ale unei bucle terminale și superficiale și un C-terminal lung, α -helix (reziduurile 268–287). S-a raportat că acesta din urmă este implicat în accesibilitatea activă a situs-ului [315]. De remarcat este faptul că triada catalitică și aminoacizii oxianionului sunt stabile și cu mobilitate redusă, atât simulările cât și distanțele necesare stabilirii activității enzimatică sunt menținute pe parcursul tuturor celor 500 ns.

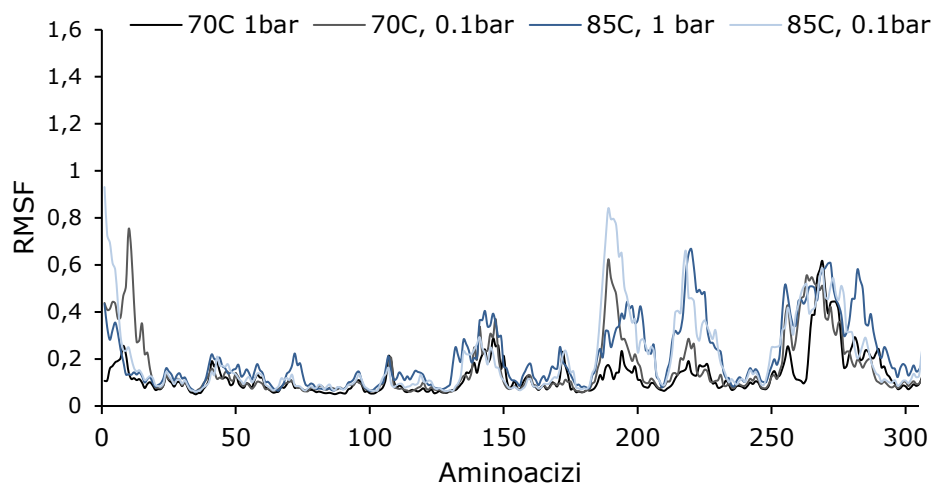


Figura 16 Evoluția RMSF în timp pentru lipaza CalB în diferite condiții de temperatură și presiune
Raza de rotație

Figura 17 prezintă raza de rotație (R_g) a lipazei CalB la diferite valori ale temperaturii și presiunii. Valorile obținute în toate cele 4 cazuri au fost de aproximativ 1,85 nm, observându-se valori R_g maximizate la 1,95 nm ocazional pentru temperatura de 85°C. În primele 300 ns valorile R_g au fost mai ridicate pentru valoarea mai mare a temperaturii, urmând o inversare în ultimele 100 ns pentru experimentul realizat la 70°C și presiune 0,1 bar.

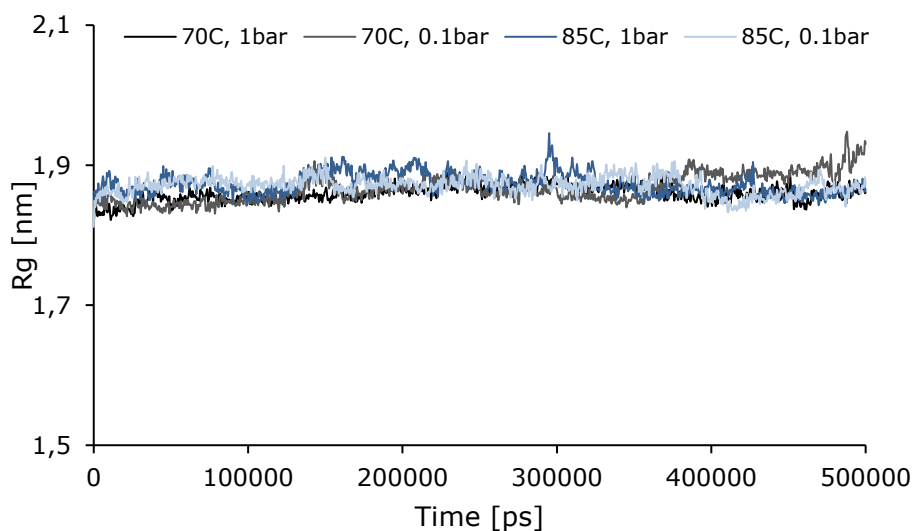


Figura 17 Evoluția razei de rotație în timp pentru lipaza CalB în diferite condiții de temperatură și presiune

Suprafață accesibilă la solvenți (SASA)

După cum sugerează și numele, zona de suprafață accesibilă la solvent (SASA) este o măsură a suprafeței unei biomolecule (de exemplu, proteină) sau a altor structuri moleculare care este accesibilă moleculelor de solvent. Este definită ca măsura în care atomii de pe suprafața unei proteine pot intra în contact cu solventul și se măsoară în general în nanometri pătrați (nm^2).

SASA este un parametru de interes deosebit în plierea proteinelor și studiile funcționale. Joacă un rol important în înțelegerea relației structură-funcție a proteinelor și a reziduurilor acestora și este utilizat în mod obișnuit în studiile computaționale ale plierii proteinelor și legării proteină-ligand. De exemplu, acoperirea reziduurilor hidrofobe poate fi un factor cheie în plierea proteinei, iar expunerea acestor reziduuri la solvent este direct legată de stabilitatea proteinei. SASA se calculează luând în considerare suprafața moleculei ca o serie de puncte și apoi folosind o sondă, de obicei o sferă, pentru a urmări suprafața accesibilă [316].

Rezultatele obținute pentru lipaza CalB indică valori de aproximativ 130 nm^2 constante pe toată perioada de 500 ns în condițiile de temperatură și presiune selectate. O ușoară creștere se observă pentru rezultatele obținute la 85°C , dar aceste modificări pot fi considerate ne semnificative.

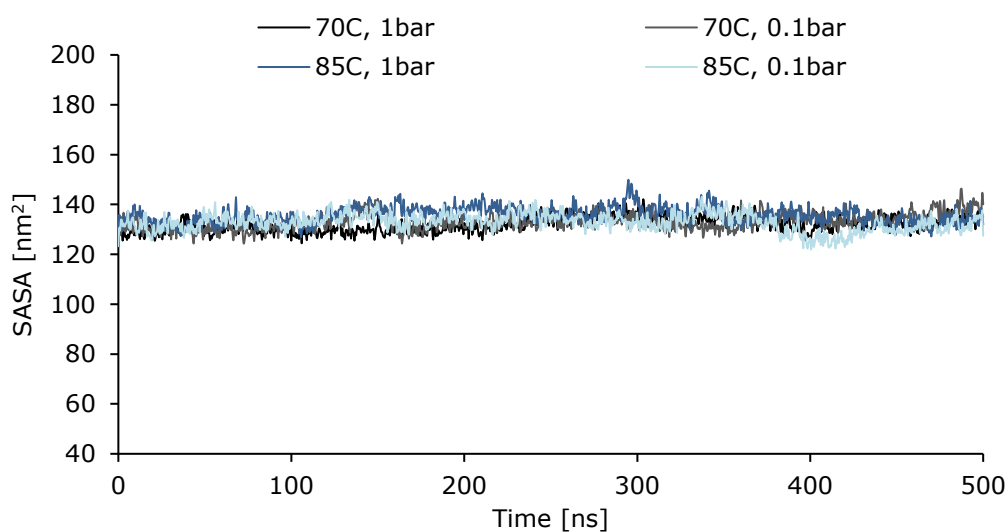


Figura 18 Evoluția SASA în timp pentru lipaza CalB în diferite condiții de temperatură și presiune

Legăturile de hidrogen (HB) se formează între posibili atomi donor și acceptor cu criterii geometrice, în care distanța și unghiul trebuie să fie mai mici de $3,5 \text{ \AA}$, respectiv 30° . Programul Hbond existent în pachetul GROMACS determină numărul de legături de hidrogen al grupurilor dorite în timpul simulării. Rolul cheie al interacțiunilor legăturilor de hidrogen în stabilitatea structurală a proteinei a fost bine studiat [317]. Aceste interacțiuni sunt în special responsabile pentru formarea structurii secundare, cum ar fi α -helix și β -sheet. Prin urmare, îmbunătățirea acestor

interacțiuni are un efect pozitiv asupra stabilității proteinelor [316]. Creșterea temperaturii promovează mișcarea structurală a proteinelor, cât și formarea și ruperea interacțiunilor, care joacă un rol în stabilitatea structurală. Prin urmare, este de așteptat ca numărul de interacțiuni să sufere mai multe modificări. Cu toate acestea, odată cu creșterea temperaturii, lipaza CalB nu a prezentat comportamente distinctive care să indice vreo diferență drastică în condiții diferite de temperatură și presiune [316].

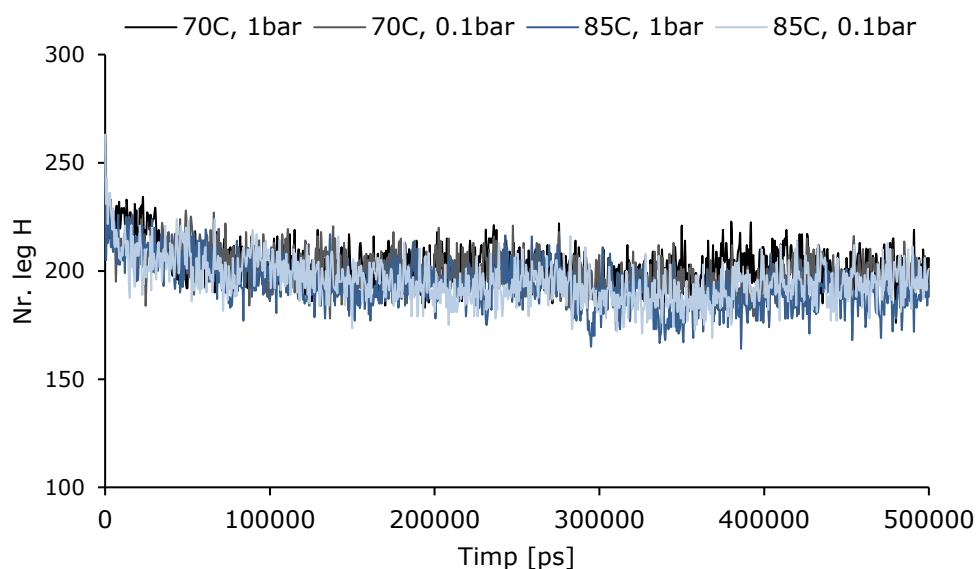


Figura 19 Evoluția numărului de legături de hidrogen în timp pentru lipaza CalB în diferite condiții de temperatură și presiune

RMSD-dist calculează deviația pătrată medie a distanțelor atomilor. Structura de referință este preluată din fișierul de structură. RMSD la momentul t este calculat ca RMS al diferențelor de distanță dintre perechile de atomi din structura de referință și structura la momentul t . Conform Figura 19 se poate observa că pentru CalB valorile obținute au fost între 2.5-3.2 Å, cu ușoare fluctuații în condiții de temperatură ridicată și presiune scăzută.

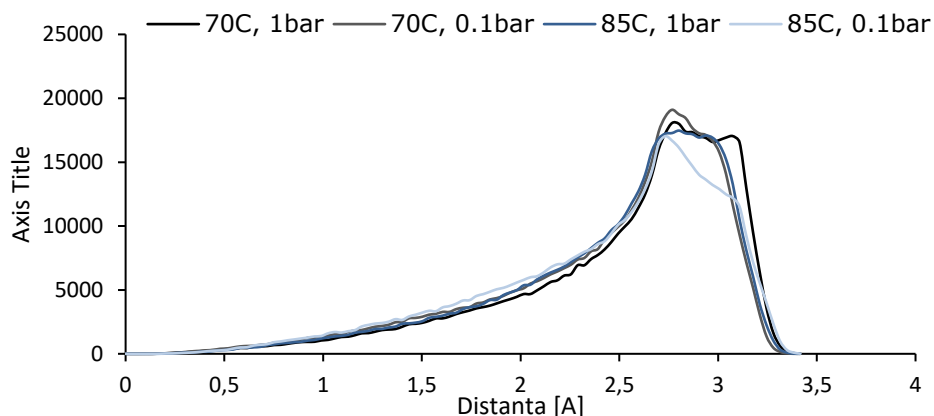


Figura 20 Evoluția RMSD-dist în timp pentru lipaza CalB în diferite condiții de temperatură și presiune

Toate aceste rezultate confirmă faptul că lipaza din CalB este o enzimă foarte stabilă la temperaturi ridicate, ele fiind în concordanță cu rezultatele experimentale publicate de diferite grupuri de cercetare din domeniul biocatalizei.

Pentru o vizualizare în detaliu a modificărilor structurale rezultate în urma studiilor de MD, în Figura 21 au fost suprapuse structura inițială (cristalografică) și conformația atinsă după simulare. Conformația după simulare a fost obținută prin gruparea (clustering-ul) tuturor conformațiilor obținute, fiind selectată conformația cu numărul cel mai ridicat (conformație medie).

Analiza conformației CalB confirmă faptul că, după 500 ns, domeniul mic al capacului suferă unele modificări conformaționale modeste, dar acest lucru nu sugerează închiderea site-ului activ din cauza dimensiunii mici a capacului. Suprapunerea structurilor arată că situsul activ rămâne accesibil în ambele conformații.

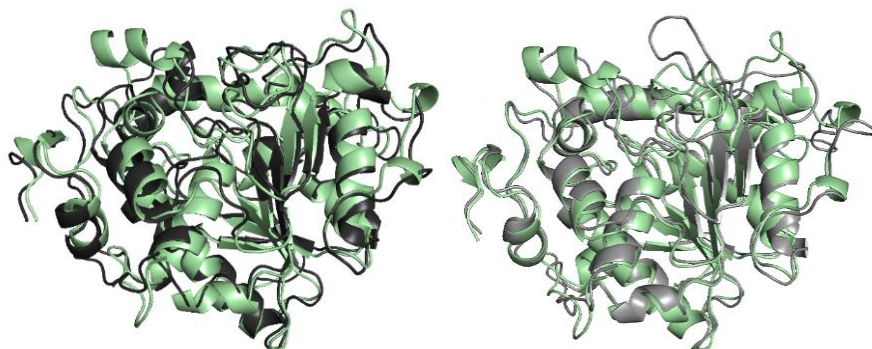


Figura 21 Suprapunerea conformațiilor lipazei CalB, inițială (verde) și după dinamica moleculară la 70°C și 1 bar (negru), respectiv la 70°C și 0.1 bar (gri).

Vizualizarea modificărilor la suprafață în termeni de hidrofobicitate s-a realizat utilizând programul PyMol. În Figura 22 sunt prezentate structurile rezultate după MD la 70°C și se poate observa că la presiunea de 1 bar conformația finală nu a dus la nicio variație semnificativă în suprafața hidrofobă și în zona accesibilă solventului în comparație cu structura inițială (Figura 14). Scăderea presiunii a determinat anumite modificări la nivelul situsului catalitic, dar nu se observă modificări importante în ceea ce privește hidrofobicitatea.

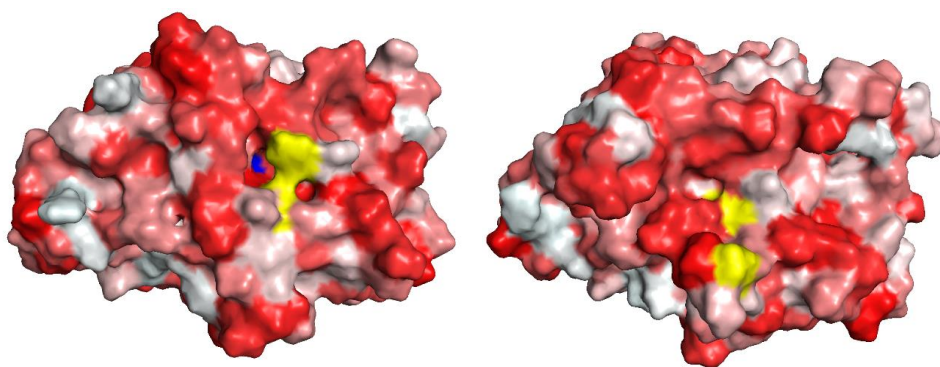


Figura 22 Analiza suprafeței după dinamica moleculară a lipazei CalB la 70°C, 1 bar (a) și la 70°C, 0,1 bar (b); în roșu sunt evidențiate zonele hidrofobe ale suprafeței enzimei și în alb cele hidrofile.

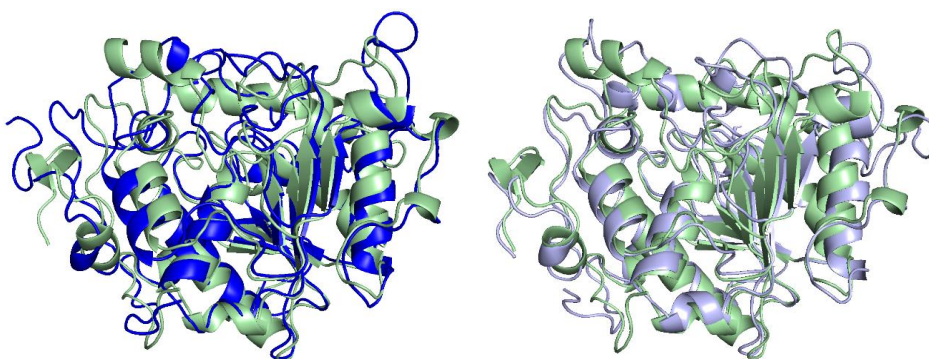


Figura 23 Suprapunerea conformațiilor lipazei CalB, inițială (verde) și după dinamica moleculară la 85°C, 1 bar (albastru), respectiv la 85°C, 0.1 bar (mov).

În Figura 23 sunt prezentate structurile rezultate după MD la 85°C și se poate observa că la presiunea de 1 bar conformația finală nu a dus la nicio variație semnificativă în suprafața hidrofobă și în zona accesibilă solventului în comparație cu structura inițială (Figura 24). Scăderea presiunii a determinat anumite modificări la nivelul situsului catalitic în principal la orientarea acidului aspartic, care ar putea avea efect asupra activității.

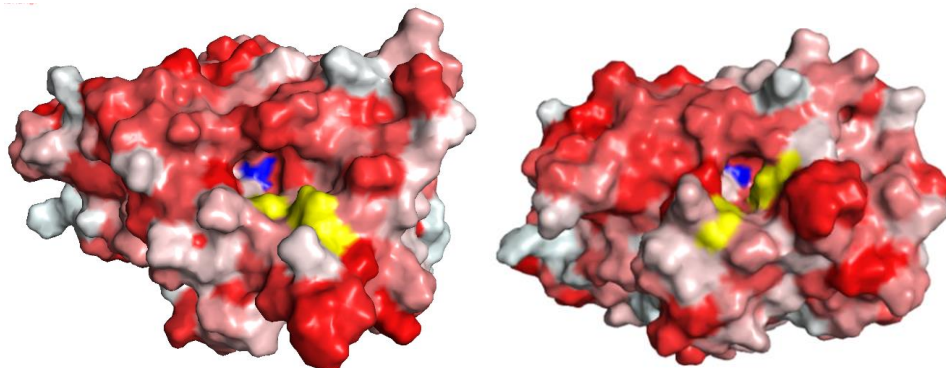


Figura 24 Analiza suprafeței după dinamica moleculară a lipazei CalB la 85°C, 1 bar (a) și la 85°C, 0.1 bar (b); în roșu sunt evidențiate zonele hidrofobe ale suprafeței enzimei și în alb cele hidrofile.

2.2.2 Calcule de dinamică moleculară pentru lipaza din *Pseudomonas stutzeri*

Analiza structurii 3D a lipazei din *Pseudomonas stutzeri*

Obținerea structurii tridimensionale a lipazei Ps. stutzeri prin modelare de homologie

Deoarece structura cristalină a lipazei din *Ps. stutzeri* nu a fost disponibilă pe Protein Data Bank, modelul de homologie a fost obținut utilizând secvența FASTA (raportată anterior [318]) ca start pentru software-ul SWISSMODEL, care generează automat secvența 3D reconstruită prin modelarea homologiei folosind structuri cristalografice 3D din baza de date PDB ca șabloane. Fișierul .pdb rezultat a fost apoi utilizat pentru analizele de dinamică moleculară și andocare.

Secvența FASTA utilizată pentru generarea structurii 3D a fost următoarea:

```
MNKNKTLALCLGSALALSGQFAATGSGYTATKYPIVLAHGMLGFDSLLGIDYWYGIPALRR
DGAQVYVTEVSQLNTSELRGEELLAQVEEIVAISGKPKVNLIGHSHGGPTIRYVAGVRPDLIAS
VTSVGAPHKGSVDVADLIRKVPEGSSGEAIIAGLVNAMGAFINFSVSGSSSTAPQNSLGSLESLN
SEGAARFNAKFPHGIPPTACGEGAYKVDGVDVHYYSWSGTSPLTNPLDVSDAMMGAGS—
LAFSGPNDGLVGRCSSHLGMVIRDNYRMNHLDEVNQFMG
LTSLFETDPVSVYRQHANRLKNAGL
```

Lipaza din *Ps. stutzeri* este o lipază cu masa moleculară de aproximativ 27 kDa cu triada catalitică conservată și formată din următorii aminoacizi: Ser-109, Asp-255, His-277. În regiunea situsului activ s-a identificat un buzunar hidrofob compus în principal din reziduurile Gly-45, Phe-46, Tyr-54, Trp-55, Leu-278, Val-281 și Phe-284, căruia i se poate atribui un rol important în recunoașterea substratului [318].

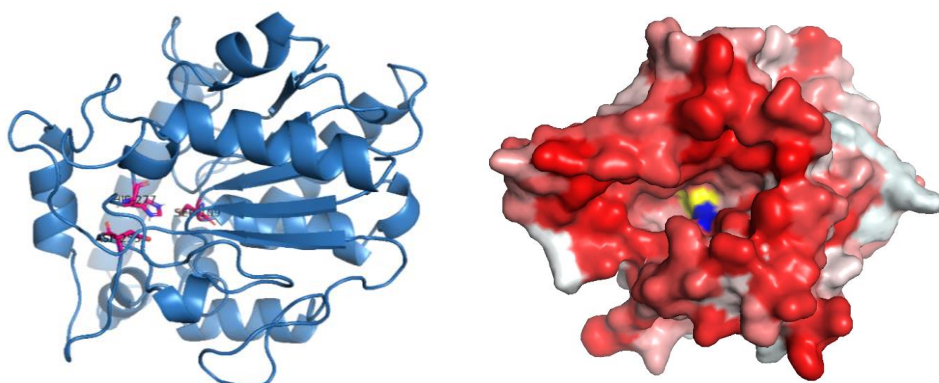


Figura 25 Structura tridimensională a lipazei din *Ps. stutzeri*, aminoacizii triadei catalitice Ser 109, Asp 255 și His 277 marcați cu roșu (a); Analiza suprafeței lipazei *Ps. stutzeri*, în roșu sunt reprezentate zonele hidrofobe ale suprafeței enzimei și în alb cele hidrofile, cu albastru este marcat Ser 109 iar cu galben His 277 (b).

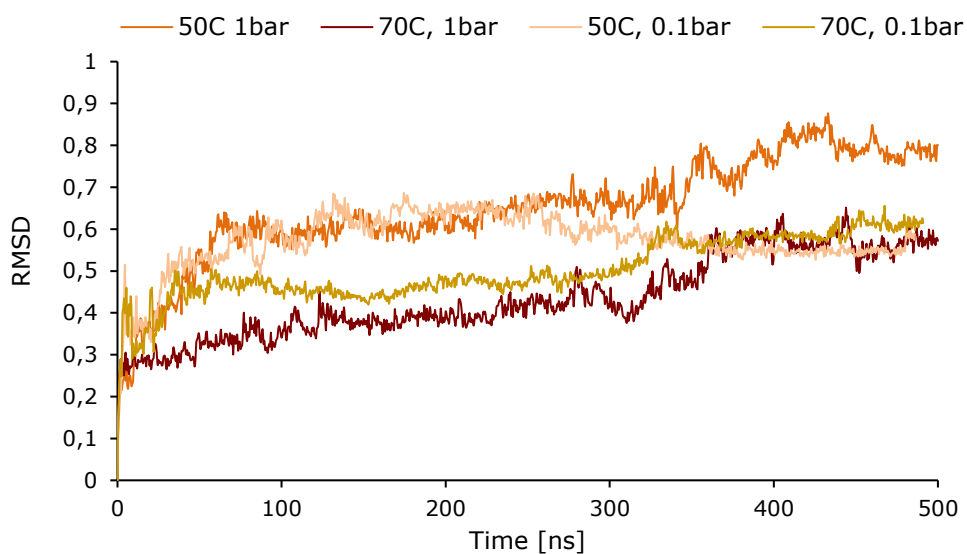


Figura 26 Evoluția RMSD în timp pentru lipaza din *Ps. stutzeri* în diferite condiții de temperatură și presiune

Din Figura 27, în care sunt reprezentate valorile RMSF în funcție de aminoacizi se observă că lipaza din *Ps. stutzeri* prezintă două lid-uri care acoperă situsul activ, unul dintre ele (reziduurile 145-181) fiind mai mare decât celălalt (reziduurile 200-250). Prezența motivului cu capac dublu a fost observată și în structura cristalină 3D a lipazei din *P. aeruginosa*, șablonul utilizat în modelarea omologiei, cât și în unele alte lipaze cristalizate, cum ar fi cele din *S. hyicus*, *Staphylococcus simulans*, *Pseudomonas sp. MIS38* sau lipaza T1 din *Geobacillus zalihae*, făcând astfel aceste

lipaze foarte atractive pentru studii de modelare. De remarcat este faptul că triada catalitică este stabilă și cu mobilitate redusă pe parcursul tuturor celor 500 ns [318].

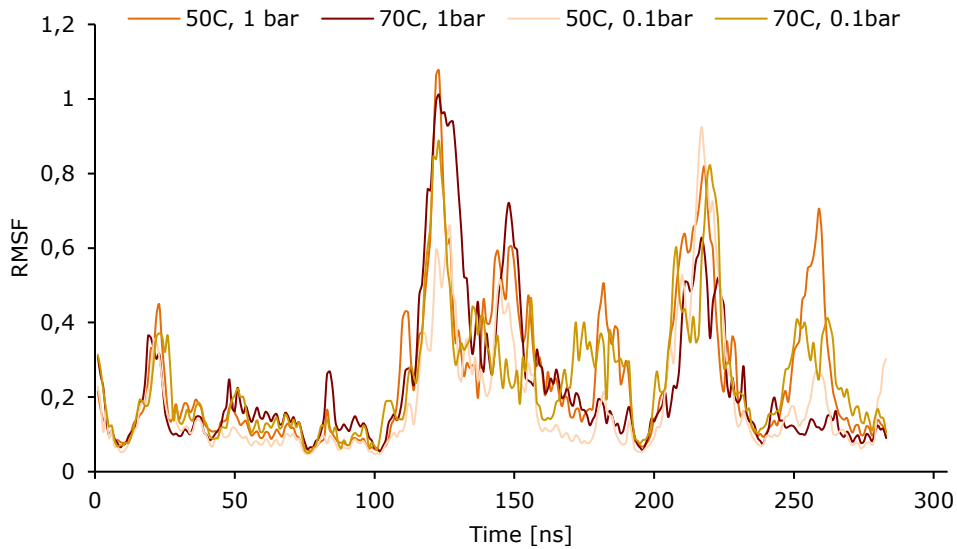


Figura 27 Evoluția RMSF în timp pentru lipaza din *Ps. stutzeri* în diferite condiții de temperatură și presiune

Raza de rotație

Figura 28 prezintă raza de rotație (R_g) a lipazei din *Ps. stutzeri* la diferite valori ale temperaturii și presiunii. Valorile obținute în toate cele 4 cazuri au fost de aproximativ 1,85 nm, comparabile cu valorile obținute pentru lipaza din CalB (Figura 17), observându-se valori R_g maximizate 1,95 nm ocazional pentru temperatura de 50°C. Pe toată durata celor 500 ns valorile R_g au fost mai ușor mai scăzute pentru valoarea temperaturii de 70°C și presiune 0,1 ns.

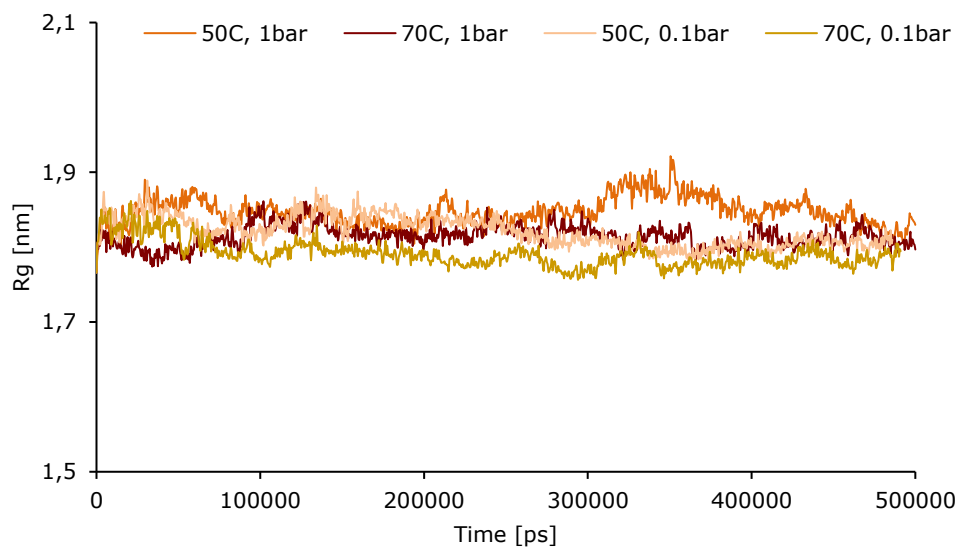


Figura 28 Evoluția razei de rotație în timp pentru lipaza din *Ps. stutzeri* în diferite condiții de temperatură și presiune

Suprafață accesibilă la solvenți (SASA)

Rezultatele obținute pentru lipaza *Ps. stutzeri* (Figura 29) indică valori de aproximativ 140 nm^2 cu mici fluctuații pe perioada celor 500 ns în condițiile de temperatură și presiune selectate. Față de rezultatele obținute pentru lipaza CalB se observă că la temperatura de 70°C valorile sunt ușor mai scăzute. O ușoară creștere se observă pentru rezultatele obținute la 50°C dar aceste modificări pot fi considerate ne semnificative.

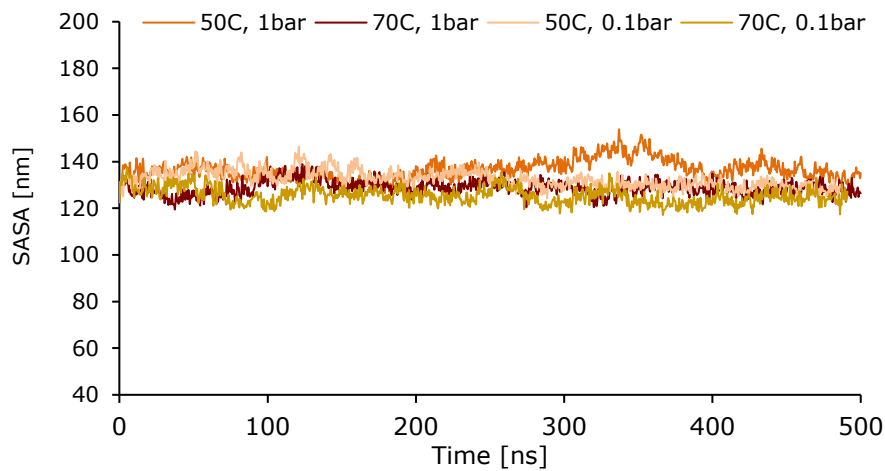


Figura 29 Evoluția SASA în timp pentru lipaza din *Ps. stutzeri* în diferite condiții de temperatură și presiune

Evoluția numărului legăturilor de hidrogen în funcție de timp este prezentată în Figura 30. Similar cu lipaza din CalB, creșterea temperaturii sau scăderea presiunii nu au generat comportamente distinctive care să indice vreo diferență drastică pentru lipaza din *Ps. stutzeri*.

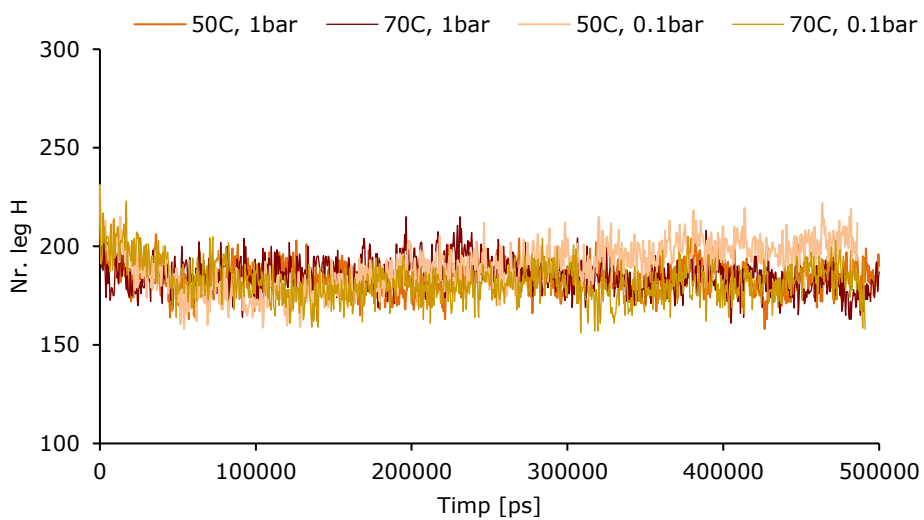


Figura 30 Evoluția numărului de legături de hidrogen în timp pentru lipaza din *Ps. stutzeri* în diferite condiții de temperatură și presiune

Analiza conformațiilor lipazei din *Ps. stutzeri* confirmă faptul că, după 500 ns, domeniul mic al capacului suferă modificări conformaționale care sunt uzuale structurilor obținute prin homologie. Suprapunerea structurilor arată cum situsul activ rămâne accesibil în ambele conformații (Figura 31).

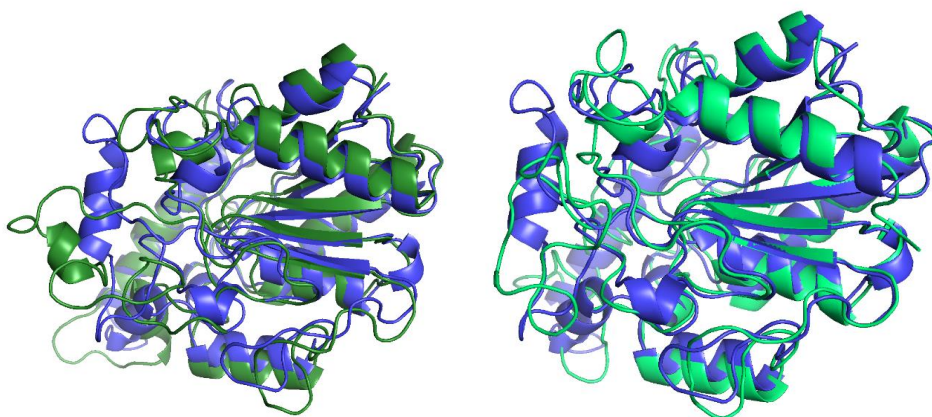


Figura 31 Suprapunerea conformațiilor lipazei din *Ps. stutzeri*, inițială (verde) și după dinamica moleculară la 50°C și 1 bar (verde închis), respectiv la 70°C și 0.1 bar (verde deschis).

În Figura 32 sunt prezentate suprafețele structurilor rezultate după MD la 50°C și se poate observa că la presiunea de 1 bar conformația finală nu a dus la nici o variație semnificativă în suprafața hidrofobă și în zona accesibilă solventului în comparație cu structura inițială (Figura 25). Scăderea presiunii a determinat anumite modificări la nivelul situsului catalitic, în principal o micșorare a acestuia și o scădere a accesibilității substratului către serina catalitică.

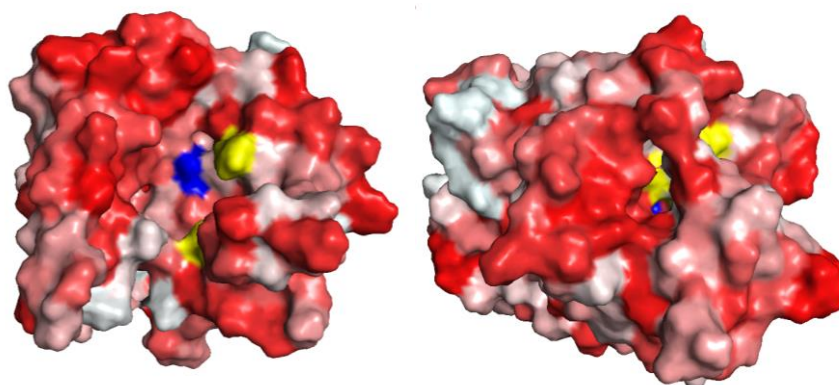


Figura 32 Analiza suprafeței după dinamica moleculară a lipazei din *Ps stutzeri* la 50°C, 1 bar (a) și la 50°C, 0,1 bar (b); în roșu sunt evidențiate zonele hidrofobe ale suprafeței enzimei și în alb cele hidrofile.

La temperatura de 70°C analiza conformațiilor lipazei din *Ps. stutzeri* confirmă faptul că, după 500 ns, domeniul mic al capacului suferă modificări conformaționale care sunt uzuale structurilor obținute prin homologie. Suprapunerea structurilor arată cum situsul activ rămâne accesibil în ambele conformații. Se observă că la 70°C, 0.1 bar unul dintre capace are o mobilitate mai ridicată, care ar putea avea efect asupra activității lipazei (Figura 33).

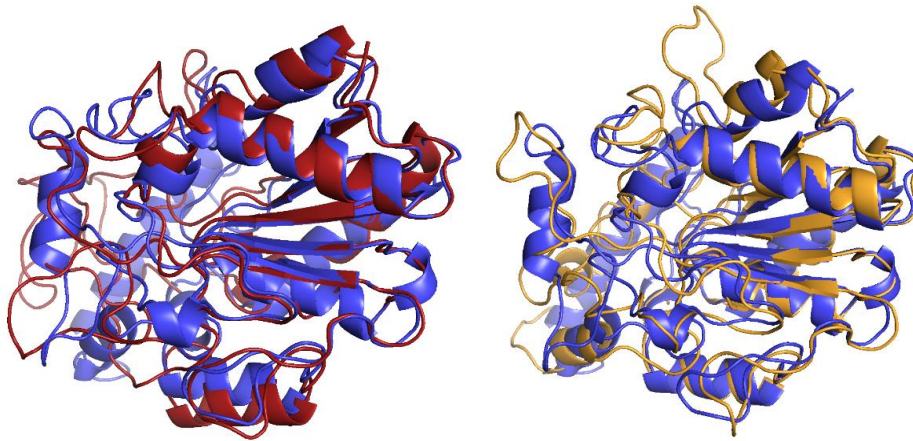


Figura 33 Suprapunerea conformațiilor lipazei din *Ps stutzeri*, inițială (albastru) și după dinamica moleculară la 70°C, 1 bar (roșu), respectiv la 70°C, 0,1 bar (galben).

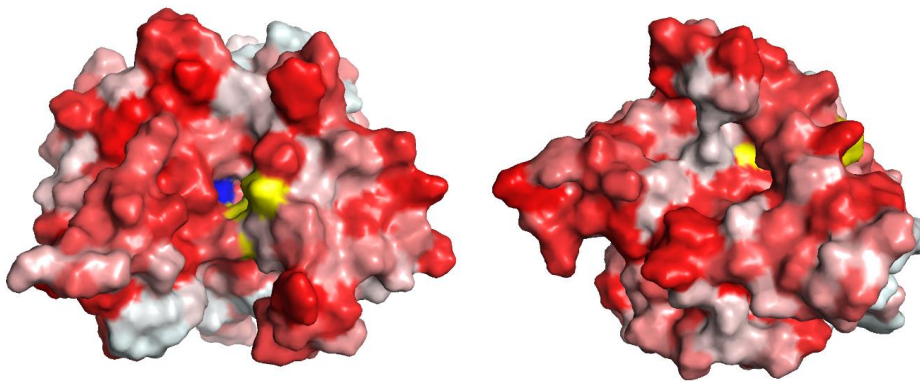


Figura 34 Analiza suprafeței după dinamica moleculară a lipazei din *Ps stutzeri* la 70°C, 1 bar (a) și la 70°C, 0.1 bar (b); în roșu sunt evidențiate zonele hidrofobe ale suprafeței enzimei și în alb cele hidrophile.

Analiza situsului catalitic cu ajutorul descriptorilor moleculari

Pentru a obține informații suplimentare despre situsurile active ale lipazelor din CalB și *Ps. stutzeri* s-a utilizat software-ul GRID. Procedura de calcul GRID, dezvoltată de Goodford în 1985, detectează situsuri de legare favorabile energetic pe molecule cu structură tridimensională cunoscută. Acest instrument permite estimarea energiilor de interacțiune între grupuri chimice mici (sonde) și o țintă, cum ar fi situsul catalitic al lipazelor, prin stabilirea unei serii regulate de puncte ale grilei de-a lungul și în jurul țintei. Rezultatul calculului este un câmp de interacțiune moleculară (MIF), care constă dintr-o matrice tridimensională a energiilor de interacțiune dintre țintă și sonde, calculate pentru fiecare nod al grilei [319].

Pentru acest studiu au fost luate în considerare trei sonde chimice pentru generarea descriptorilor moleculari:

- Sondă DRY (carbon aromatic) care descrie interacțiunile nepolare cu cavitatea aleasă
- Sondă N1 (azot amidic) care descrie capacitățile acceptorului H-Bond ale cavității alese
- Sondă H care descrie forma cavității care înconjoară locul activ;

În plus, s-a realizat o evaluare a flexibilității situsului catalitic dar și a gradului de acoperire (incluziune) a acestuia în structura enzimei.

Din Figurile 35a (pentru CalB) și 36 (pt *Ps. stutzeri*) se poate observa că situsul catalitic (cavitatea în care este inclusă triada catalitică) al lipazei din *Ps. stutzeri* este mai mare și mai accesibil în raport cu structura proteinei față de cel identificat pentru lipaza din CalB. În ceea ce privește flexibilitatea (Figurile 35, 36b) lipaza din CalB prezintă 3 zone mai flexibile în comparație cu lipaza din *Ps. stutzeri* care prezintă doar două, ceea ce ar putea avea un efect important în selectivitatea lipazelor față de diferite substraturi.

În comparație cu rezultatele publicate anterior [320] în analiza situsurilor catalitice utilizând softul GRID pentru un set de 42 de serin-hidrolaze, lipaza din *Ps. stutzeri* prezintă cu o capacitate extinsă de a stabili interacțiuni cu donorii de legături H într-o zonă mai largă a situsului activ.

În ceea ce privește sonda DRY pentru lipaza din *Ps. stutzeri* (Figura 36d) au fost identificate mai multe zone de interacțiune nepolare ale enzimei cu cavitatea care conține situsul catalitic. Contururile galbene indică regiunile în care o interacțiune hidrofobă crește selectivitatea.

Sonda N1 (azot amidic) pentru lipaza din CalB (Figura 35 e) ocupă suprafețe mai mari în comparație cu suprafețele identificate pentru lipaza din *Ps. stutzeri*. (Figura 35a).

În ceea ce privește sonda H se observă diferențe importante. Contururile cyan indică regiunile în care energiile de interacțiune sunt mai favorabile. Se poate observa că în cazul lipazei din *Ps. stutzeri* forma cavității care înconjoară situsul activ este mai puțin conservată în comparație cu lipaza din CalB.

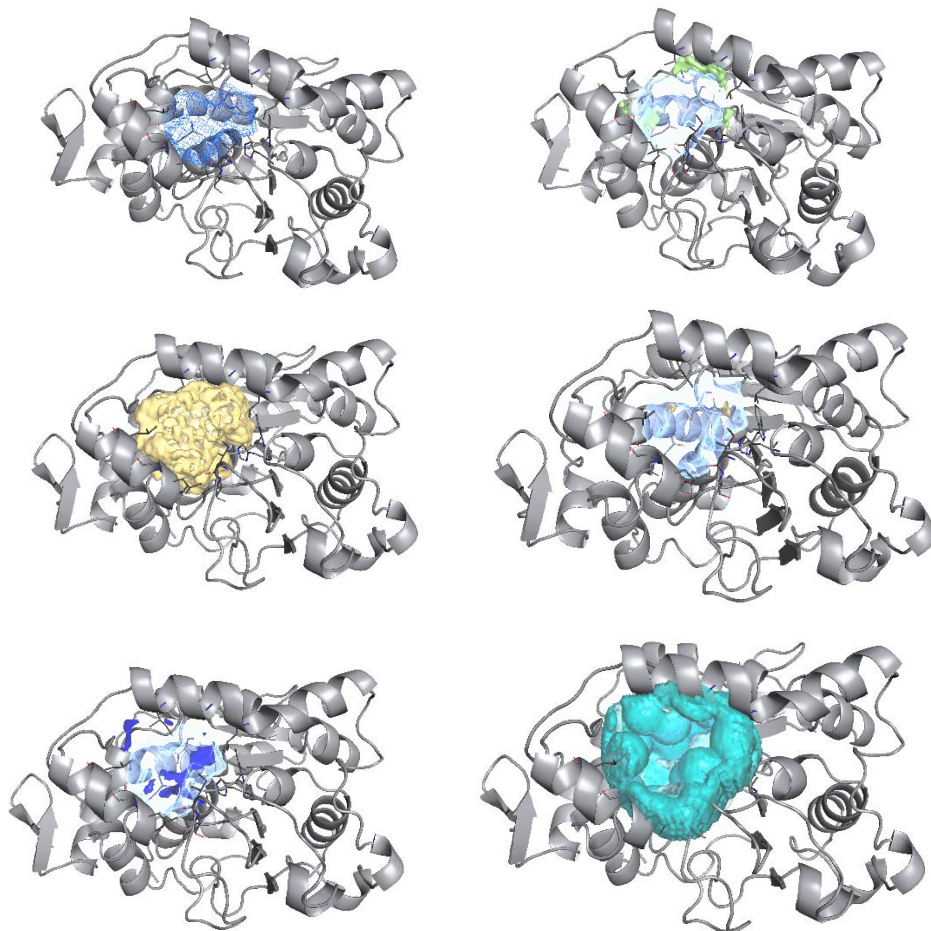


Figura 35 Analiza situsului activ al lipazei din CalB cu software-ul GRID, evidențiind buzunarul identificat (a), flexibilitatea (b), acoperirea situsului catalitic în structura enzimei (c), sonda DRY (d), sonda N2 (e), sonda H2 (f)

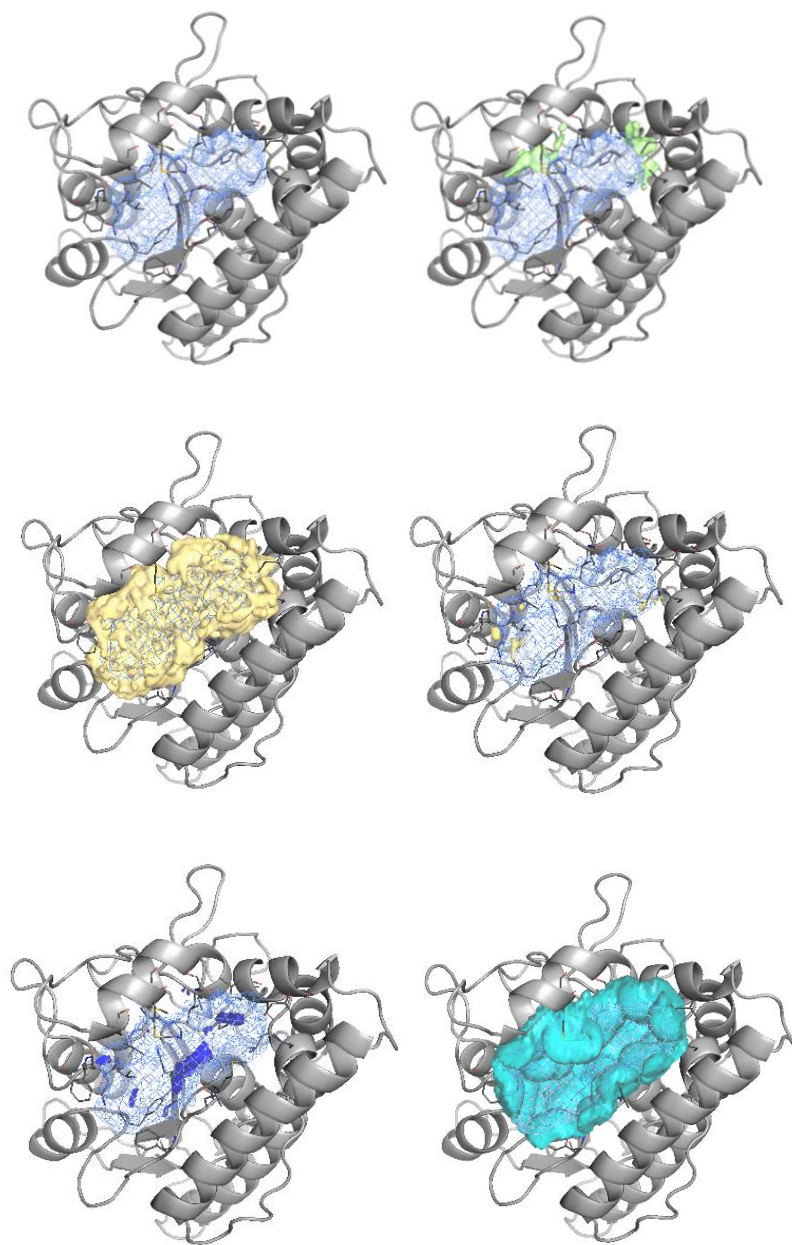


Figura 36 Analiza situsului activ al lipazei din *Ps. stutzeri* cu software-ul GRID, evidențiind buzunarul identificat (a), flexibilitatea (b), acoperirea situsului catalitic în structura enzimei (c), sonda DRY (d), sonda N2 (f), sonda H2 (g)

2.2.3 Studii de andocare

Pentru studiile de andocare moleculele de substrat (liganzii) au fost generate cu programul ChemDraw și minimizează folosind programul MOPAC [315] cu metoda semiempirică AM1, înainte de andocare.

Andocările efectuate pe structurile enzimatiche neechilibrate ale celor două lipaze cu 20 heterodimeri au fost analizate pentru identificarea pozițiilor productive. Conformațiile astfel alese au fost salvate ca fișier .pdb. Pentru fiecare experiment s-au calculat 500 de andocări cu docking box (60x60x60) Å, Grid Point Spacing 0,250 Å centrat pe t folosind un algoritm genetic Lamarckian și softul Auto-Dock versiunea 4.2 [315] Dimensiunea populației GA a fost stabilită la 1500 și numărul maxim de evaluări la 25000000. Au fost generate 500 de generații de andocare, fiecare compusă din 250 de poziții de andocare.

Identificarea pozițiilor reactive

Din grupul de structuri generate, pozițiile productive au fost selectate prin identificarea celor în care substratul o conformație apropiată de cea de atac (near attack conformation, NAC), compatibilă cu atacul productiv al serinei catalitice (Ser105 din CalB sau Ser109 din *Ps. stutzeri*) la atomul de carbon al grupărilor acil ale liganzilor (fie la acid carboxilic, care duce la alungirea lanțului prin formare de ester, fie la reacția inversă a esterului). În NAC lungimea legăturii covalente unice dintre atomul de carbon al grupărilor acil și oxigen se presupune a fi între 1,43 și 2,15 Å, în timp ce distanța (d) dintre oxigenul serinic și carbonul acil a fost stabilită la o distanță maximă de 3,2 Å. În ceea ce privește buzunarul oxianionic, stabilizarea intermediarului oxianionic trebuie să aibă loc la o distanță de maxim 3 Å de NH (donorul de legătură H) al reziduurilor care formează buzunarul. În final, orientarea atomilor de carbon din grupările acil ai liganzilor către oxigenul serinic (θ) trebuie să fie astfel poziționată încât să nu depășească un unghi de 90° [315].

Rezultatele din Tabelul 12 prezintă numărul de poziții productive identificate luând ca referință cele două tipuri de atomi de carbon, grupări carboxilice și esterice, care conduc fie la extinderea catenei (esterificarea acidului carboxilic), fie la reacția inversă (hidroliza sau alcooliza legăturii esterice formate), cât și energiile libere medii corespunzătoare ale fiecărui grup. Rezultatele obținute sugerează că liganzii mai scurți (monomeri și dimeri) pot accesa cu ușurință situsul activ al CalB în conformații productive, așa cum este demonstrat de valorile energiilor și a numărului pozițiilor productive. Pentru toate substraturile există un procent considerabil de poziții productive pentru ambii atomi de carbon. Energiile libere de andocare corespund sumei energiilor intermoleculare (inclusiv energiile de desolvatare), energiilor interne și energiilor libere de torsiune. Valorile mari, negative, sunt asociate cu conformații favorabile. Energiile libere de andocare ridicate ale substraturilor 2-monoacilate evidențiază modul în care acilarea și hidroliza în poziția 2 sunt defavorizate în raport cu aceeași reacție care are loc în alte poziții. Aceste rezultate sunt în concordanță cu rezultatele recent publicate pentru oligoesteri ai glicerolului, iar corelarea cu datele experimentale se va realiza în capitolul 2.4.

În ceea ce privește rezultatele obținute pentru acidul ricinoleic și dimerul acestuia cu acidul 5-hidroximetil-2-furoic, se observă că pentru ambele lipaze considerate acidul ricinoleic este acceptat în situsul catalitic, la fel și dimerul furanic, în timp ce pentru lipaza din *Ps. stutzeri* numărul pozițiilor productive este mai ridicat iar valoarea energiilor este mai scăzută. Rezultatele experimentale pentru acest sistem de reacții sunt incluse în capitolul 2.3.

Tabelul 12 Numărul de poziții productive NAC și valorile energiilor libere de andocare obținute prin analiza atacului celor două grupări acil diferite, folosind softul Autodock

Lipaza	Substrat	C ESTER		C ACID	
		E^*_{abs} [kcal/mol]	poziții	E^*_{abs} [kcal/mol]	poziții
<i>CalB</i>	12BDODMA1	-2.77	293	-2.67	88
	12BDODMA2	-2.90	240	-2.65	48
	12HDADMA1	-3.59	284	-3.38	87
	12HDADMA2	-3.82	128	-3.25	49
	3M13BDODMA1	-3.22	220	-3.20	85
	3M13BDODMA3	-3.33	293	-3.07	59
	12ODODMA1	-4.00	99	-3.62	63
	12DODDMA2	-4.03	45	-3.50	51
	12PDODMA1	-3.47	309	-3.14	67
	12PDODMA2	-3.55	186	-3.05	40
	14BDODMA	-2.82	112	-2.82	196
	14PDODMA	-3.33	344	-3.05	49
	15HDODMA1	-3.86	275	-3.79	85
	15HDODMA5	-3.67	275	-3.55	52
	23BDODMA	-2.63	284	-2.61	46
	24BDODMA	-3.47	122	-2.99	100
	25HDODMA2	-3.60	319	-3.63	47
	25HDODMA5	-3.49	210	-3.49	110
	RCA	-	-	-2.73	289
	RCA-FDCA	-1.65	50	-1.92	61
<i>Ps</i>	RCA	-	-	-3.96	243
	RCA-FDCA	-3.78	90	-3.28	195

2.3. Biotransformarea uleiului de ricin în oligomeri nesaturați cu unități furanice prin metoda „one-pot”, utilizând lipaze native și imobilizate

Estolidele și macrolactonele pe bază de acid ricinoleic au fost utilizate în industria alimentară, dar și ca aditiv în amestecuri și compozite pentru a îmbunătăți proprietățile finale ale polimerilor, spre exemplu adezivi și învelișuri, dar și ca posibili candidați pentru aplicații în implanturi biomedicale, ingineria țesuturilor, medicamentele cu eliberare controlată [321].

Polimerizarea acidului ricinoleic (RCA) și a HFA a fost investigată ca o nouă cale biocatalitică verde pentru a sintetiza oligoesteri nesaturați care conțin unități de furan în cadrul grupului de Biocataliză din cadrul Universității Politehnica Timișoara. Producții de reacție identificați au fost amestecuri de copolimeri liniari sau ciclici, împreună cu homopolimeri liniari sau ciclici ai RCA, formați ca produși de reacție secundari (Figura 37). Cealți produși secundari posibili, homopolimerii HFA, nu au fost identificați. Alternanța unităților monomerice din lanțul de copolimer este aleatorie, cu probabilitate mai mare pentru încorporarea unităților provenite de la monomerul (RCA) pentru care enzima are afinitate mai ridicată. Reacția în condițiile optime a fost repetată pentru a avea un produs care să poată fi considerat drept standard.

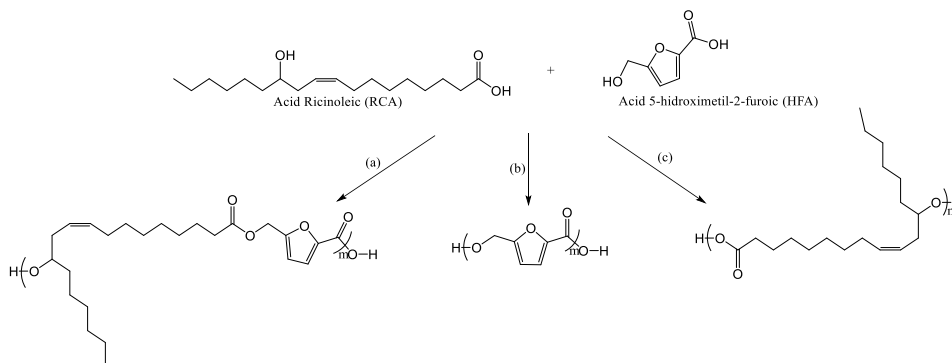


Figura 37 Formarea copolimerilor (calea a) și a homopolimerilor (căile b și c) ca posibili produși de reacție.

Formarea produșilor de reacție a fost monitorizată prin spectrometrie de masă MALDI-TOF. Un exemplu de spectru MALDI-TOF MS de poli(5-hidroxitmetil-2-furancarboxilat-co-ricinoleat) (RCA-co-HFA) este reprezentat în Figura 37, pentru un produs obținut în sistem de reacție fără solvent, folosind lipaza din *Pseudomonas stutzeri*. În toate spectrele, produșii identificați au fost fie copolimeri (Figura 37, calea a) fie estolide RCA (Figura 37, calea c). Astfel, seria aducțiilor de sodiu din seria de oligomeri ($[M+Na]^+$) indică formarea de copolimeri liniari sau ciclici care conțin unități HFA și RCA, așa cum este prezentat în Figura 37.

Astfel, semnalul de la m/z 1549,07 (Figura 38) corespunde aductului Na^+ al copolimerului ciclic cu cinci unități RCA și o unități HFA, în timp ce 1564,92 și 1586,72

corespund aductului de sodiu al copolimerilor liniari. Identificarea produşilor de reacţie oligoesterului poli(5-hidroximetil-2-furancarboxilat-co-ricinoleat) folosind spectrometria de masă MALDI-TOF MS demonstrează, pentru prima dată, inserţia de unităţi furanice într-un lanţ poli-ricinoleic, catalizată de lipază.

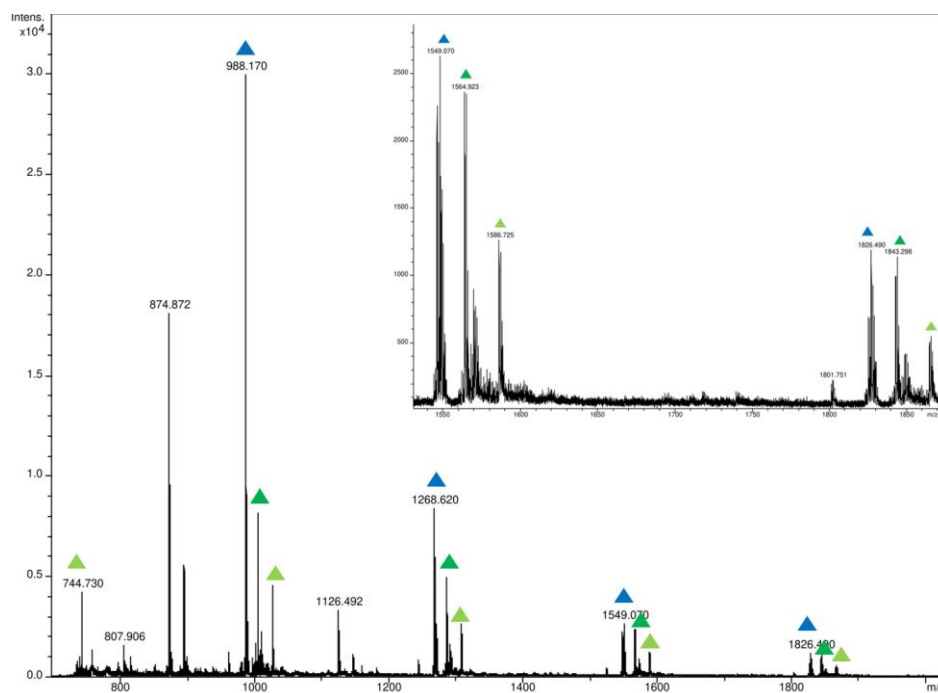


Figura 38 Spectrul MALDI-TOF MS al copolimerilor obţinuţi din HFA şi RCA (raport molar 1:1) sintetizaţi la 50°C şi 48 ore, folosind lipaza din *Ps. stutzeri* ca biocatalizator, în sistemul de reacţie cu *t*-BuOH. Este evidenţiată formarea copolimerilor ciclici (triunghiuri albastre) şi a copolimerilor liniari (triunghiuri verzi).

2.3.1 Sinteza enzimatică a poli(5-hidroximetil-2-furancarboxilat-co-ricinoleatului) în sistem „one-pot” utilizând uleiul de ricin ca materie primă

Un proces „one-pot” în trei etape, recent brevetat, descrie o metodă originală pentru sinteza oligoesterilor hidroxi-acizilor graşi în trei etape, prin acţiunea oleat-hidratazei pe un substrat de acid gras nesaturat cu o legătură dublă *cis* C9-C10 cât şi a unei lipaze pentru a cataliza hidroliza trioleinei (din uleiul de măsline) şi reacţia de poliesterificare. S-a demonstrat că în aceeaşi soluţie tampon apoasă este posibilă integrarea a trei reacţii consecutive prin acţiunea a două enzime, cu conversie mare sau totală a trigliceridelor şi a hidroxiacidului gras în oligoester [322].

Pornindu-se de la aceste rezultate, obiectivul prezentului studiu a fost evaluarea capacităţii biocatalitice a lipazei din *Pseudomonas stutzeri*, selectată pe baza unor experimente anterioare de policondensare, de a converti tricinoleina în RCA care să reacţioneze în continuare cu HFA prezent în amestecul de reacţie, rezultând un

oligoester. Acest sistem de reacție poate fi considerat de tip "one-pot" („într-un singur vas”), implicând două reacții succesive catalizate de aceeași enzimă (Figura 39). Utilizarea monomerilor proveniți din grăsimi sau uleiuri naturale ca materii prime pentru sinteza biopolimerilor (polimeri derivați din materii prime regenerabile) este tot mai intens studiată, datorită diversității lor structurale, proprietăților de biodegradabilitate și prețului scăzut [323].

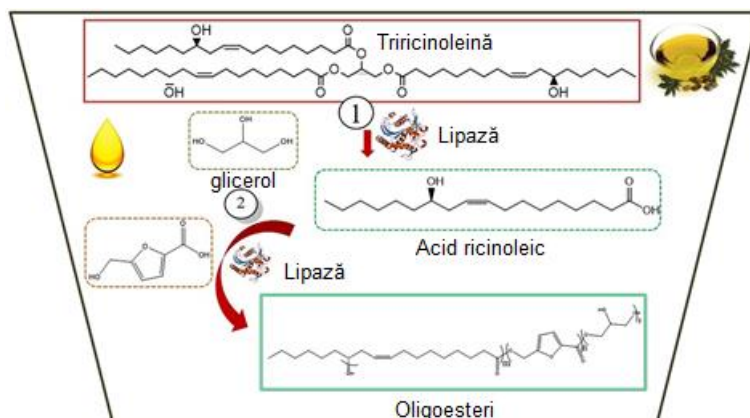


Figura 39 Schema reacției de sinteză a oligoesterilor în sistem "one-pot".

Deoarece utilizarea lipazei din *Ps. stutzeri* nu a fost raportată anterior pentru hidroliza trigliceridelor, mai întâi a fost necesară evaluarea selectivității sale pentru hidroliza tricinoleinei. Reacția de hidroliză a fost efectuată în soluție tampon fosfat 0,1 M, pH=7, la concentrație de substrat 50 mM și 50 °C, timp de 24 de ore. Produsul de reacție a fost extras cu CHCl_3 , iar spectrul $^1\text{H-RMN}$ (Figura 40) indică dispariția semnalului corespunzător glicerolului.

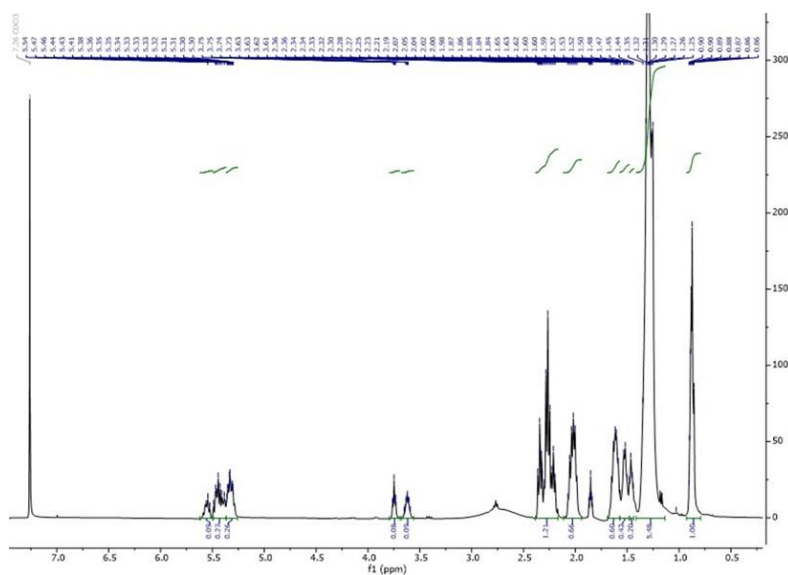


Figura 40 Spectrul RMN ale acidului ricinoleic recuperat după hidroliza enzimatică a triricinoleinei din uleiul de ricin

Într-un experiment preliminar, reacția „one-pot” a fost efectuată pornind de la ulei de ricin și HFA, în condiții de presiune redusă controlată pentru a se putea elimina ulterior, în etapa de poliesterificare apa adăugată inițial pentru etapa de hidroliză. Aparatura folosită a fost un sistem de evaporator rotativ la 100 mbar presiune, 50°C și 150 rpm. Analiza MALDI-TOF MS a produsului după un timp de reacție de 48 de ore Figura 41 a indicat valori ale masei moleculare medii M_n de 1200 Da și un conținut relativ liniar de copolimer de 63,4%. Se observă că a fost nevoie de adăugarea unei cantități mai mari de apă (1,1 mmoli) pentru a realiza în prima etapă hidroliza completă a uleiului de ricin, demonstrată de dispariția semnalului triricinoleinei de la m/z 956,6. În pasul următor, ingineria procesului a fost focalizată pe optimizarea unor variabile de proces selectate, pentru a identifica cele mai bune condiții de sinteză a oligoesterilor.

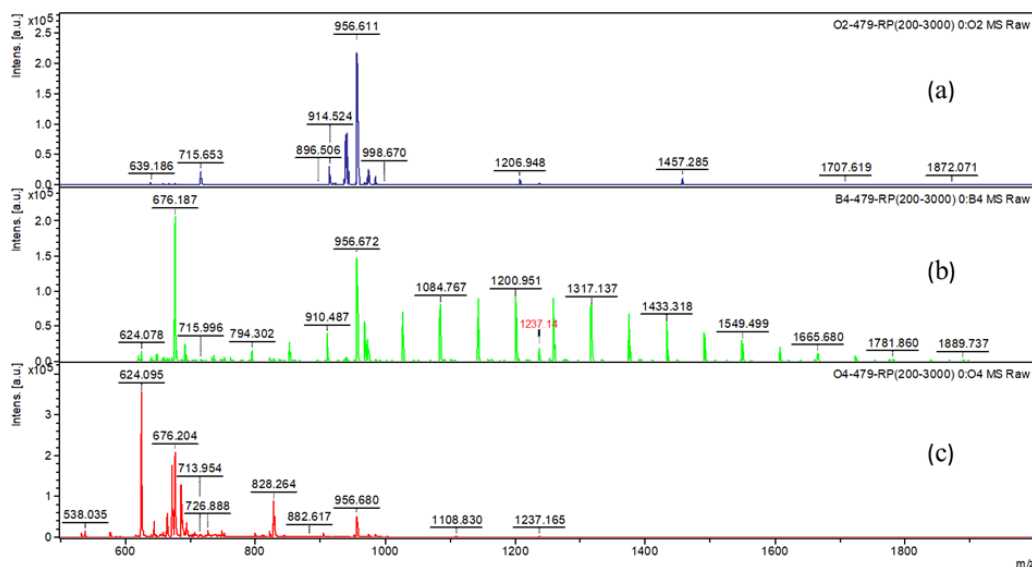


Figura 41 Spectrele MALDI-TOF MS ale produşilor de reacţie sintetizaţi pe bază de ulei de ricin şi 5OH2FA cu lipază din *Pseudomonas stutzeri*, după 48 de ore de reacţie (a) - ulei de ricin; (b) - produsul de reacţie după adăugarea a 5 µL apă; (c) - produsul de reacţie după adăugarea a 20 µL apă)

2.3.2 Optimizarea parametrilor de reacţie ai procesului „one-pot” printr-un program experimental factorial

Pentru a optimiza sinteza oligoesterului pornind de la acid 5-hidroximetil-2-furoic (HFA) şi ulei de ricin, a fost utilizată metoda Box-Behnken statistical Design of Experiments (DoE) (pachetul software de analiză multivariată a datelor Unscrambler®, AspenTech, SUA). O abordare similară a fost utilizată anterior pentru alte procese biocatalitice, inclusiv conversia lactozei în acid gluconic [324] şi sinteza de oligoesteri ai δ -gluconolactonei [101], [325]. Au fost selectate trei variabile independente (temperatura, procentul de biocatalizator raportat la cantitatea de monomeri şi raportul molar al monomerilor) şi s-a studiat influenţa lor asupra masei moleculare medii. Temperatura a fost stabilită în intervalul 60-80°C, cantitatea de biocatalizator între 15-45 U mmol⁻¹ substrat în raport cu materiile prime (în raport cu cantitatea totală de monomeri, exprimată în mmoli), iar raportul molar ulei de ricin:HFA a variat între 1:1 şi 5:1. Masele moleculare medii (M_n , M_w), au fost calculate pe baza analizei GPC şi utilizate ca variabile de răspuns. Condiţiile optime de reacţie au fost determinate pe baza rezultatelor DoE şi a analizei statistice. În primele trei coloane din Tabelul 13 Valorile medii numerice şi gravimetrice ale masei moleculare, calculate prin analiza GPC, ale oligoesterilor RCA cu 5OH2FA sintetizaţi în condiţiile de reacţie specificate sunt prezentate valorile variabilelor independente selectate, temperatura, cantitatea de enzimă şi raportul molar al comonomerilor, în timp ce ultimele două coloane conţin valorile M_n şi M_w , determinate experimental prin analiza GPC. Analiza statistică a datelor experimentale a fost realizată folosind tehnica ANOVA şi analiza de regresie.

Tabelul 13 Valorile medii numerice și gravimetrice ale masei moleculare, calculate prin analiza GPC, ale oligoesterilor RCA cu 5OH2FA sintetizați în condițiile de reacție specificate.

Nr. Exp.	Temperatura [°C]	Cantitatea de enzimă ¹ [U mmol ⁻¹]	Raport molar ulei	M _n [g/mol]	M _w [g/mol]
1	70	45	5	4520	7240
2	70	15	5	1170	1660
3	70	45	1	2790	4520
4	70	15	1	1850	3490
5	70	30	3	5440	6500
6	60	15	3	2230	3470
7	60	30	1	3570	5950
8	60	30	5	5530	8460
9	60	45	3	6050	9490
10	80	15	3	964	1310
11	80	30	1	1110	1460
12	80	30	5	1660	2980
13	80	45	3	3390	6090
14	70	30	3	2890	5410
15	70	30	3	3920	6180

¹ % masă, raportat la masa monomerilor

Pentru analiza de ansamblu a rezultatelor s-a ales modelul polinomial de ordinul 2, deoarece în majoritatea cazurilor valoarea p a fost <0,05, ceea ce arată că modelul este adecvat în raport cu datele experimentale din punct de vedere statistic. La alegerea modelului s-a luat în considerare coeficientul de corelație multiplă, a cărui valoare cât mai apropiată de 1 confirmă că modelul de regresie corelează satisfăcător datele eșantionului. Valorile R² au fost în intervalul [0,747 -0,940].

Tabelul 14 Rezultatele statistice generate de ANOVA, calculate pe baza masei moleculare gravimetrice Mw. C ca variabilă de răspuns

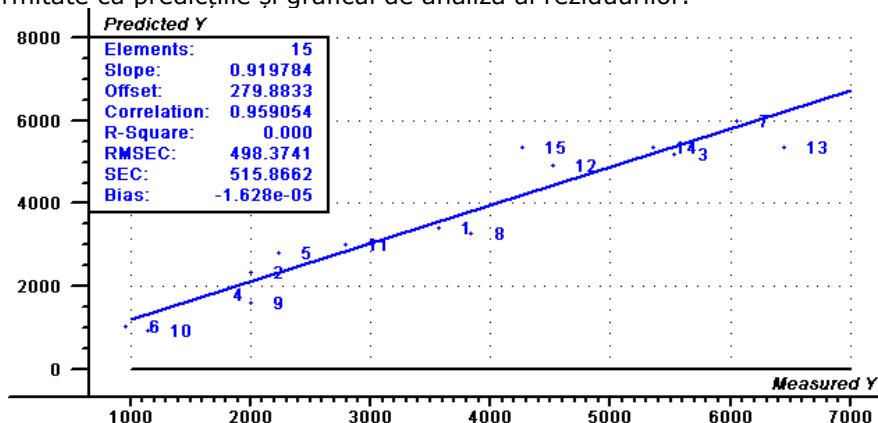
	SS	DF	MS	F	p
Rezumat					
Model	4.272e+07	9	4.747e+06	6.370	0.0277
Eroare	3.726e+06	5	7.451e+05		
Total	4.645e+07	14	3.318e+06		
Ajustat					
Variabil					
Intercepta	3.954e+06	1	3.954e+06	5.307	0.0695
Temperatură (A)	9.959e+06	1	9.959e+06	13.366	0.0147
Fracția molară (B)	7.745e+05	1	7.745e+05	1.039	0.3547
Cantitatea de enzimă (C)	1.474e+07	1	1.474e+07	19.778	0.0067
AB	1.330e+06	1	1.330e+06	1.785	0.2391
AC	2.224e+05	1	2.224e+05	0.298	0.6083
BC	1.674e+06	1	1.674e+06	2.247	0.1942
AA	2.088e+06	1	2.088e+06	2.802	0.1550
BB	7.349e+06	1	7.349e+06	9.863	0.0256
CC	6.505e+06	1	6.505e+06	8.730	0.0317
Model Check					

	SS	DF	MS	F	p
Main	2.547e+07	3	8.490e+06		
Int	3.226e+06	3	1.075e+06	1.443	0.3351
Int + Squ	1.402e+07	3	4.674e+06	6.273	0.0379
Squ	0.000	0	0.000	0.000	0.0000
Eroare	0.000	0	0.000		
Lack of Fit					
Lack of Fit	1.343e+02	3	4.477e+02	0.376	0.7835
Eroarea pură	2.383e+02	2	4.191e+02		
Eroarea totală	3.726e+02	5	7.451e+02		

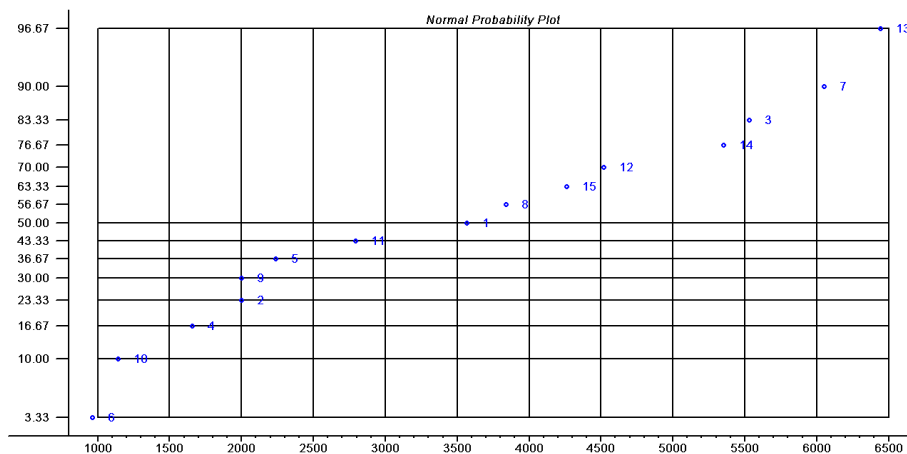
Rezultatele analizei ANOVA (Tabelul 14) sugerează că modelul ales este adecvat. Valoarea erorii pure determinată pentru parametrul M_n al copolimerului, măsurată în punctele centrale, a fost de 419 la trei repetări, corespunzând la $\sqrt{419} = 20,46\%$ din abaterea standard, ceea ce poate fi considerată satisfăcătoare.

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

Analiza reziduurilor este de o importanță deosebită pentru evaluarea eficienței modelului. Pentru această analiză au fost luate în considerare două grafice (Figura 42), cele mai relevante pentru analiza reziduurilor și diagrama de analiză a predicției modelului, care oferă informații despre modul în care valorile experimentale sunt în conformitate cu predicțiile și graficul de analiză al reziduurilor.



(a)



(b)

Figura 42 Comparația dintre masa moleculară medie măsurată și prezisă a copolimerului (a) și graficul probabilității reziduurilor (b).

2.3.3 Analiza suprafeței de răspuns și analiza graficelor de contur

Deși efectul raportului molar nu a fost semnificativ pentru întregul proces, atunci când M_n a fost reprezentat grafic atât în funcție de temperatură, cât și de cantitatea de enzimă, s-a obținut o valoare optimă (Figura 43).

Analiza suprafeței de răspuns indică faptul că, lucrând la un raport molar de 3,3:1 ulei de ricin:HFA, cea mai mare valoare M_n de 6000 g/mol va fi atinsă în punctul central corespunzător la 63°C și raport enzimă/substrat de 33 U mmol⁻¹. Această limitare a creșterii masei moleculare se datorează probabil conținutului ridicat de copolimer ciclic, care nu poate fi redus în condițiile date.

a

b

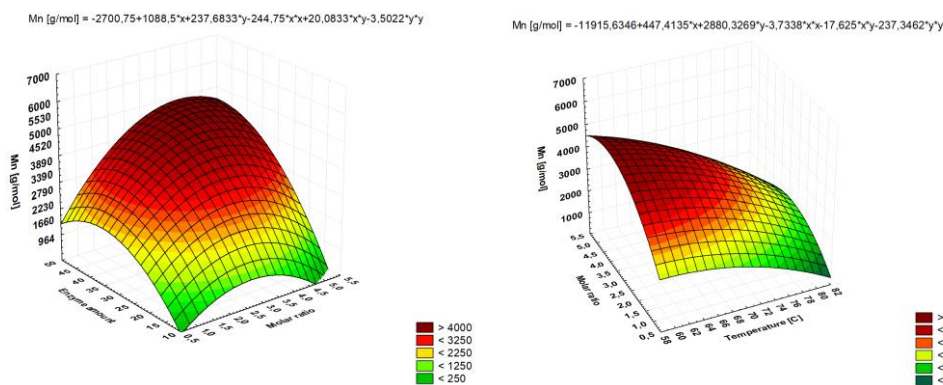


Figura 43 (a) Suprafețele de răspuns care descriu efectul variabilelor independente asupra masei moleculare medii a oligoesterului după 24 de ore de reacție; (b) efectul cantității de enzimă și al raportului molar RCA/5OH2FA

Rezultatele DoE au fost validate prin efectuarea unei reacții în condiții optime iar valoarea experimentală a M_n , determinată de GPC, a fost de 5869 g mol^{-1} , foarte apropiată de cea prezisă de model. Spectrul MALDI-TOF MS al probelor este prezentat în Figura 44.

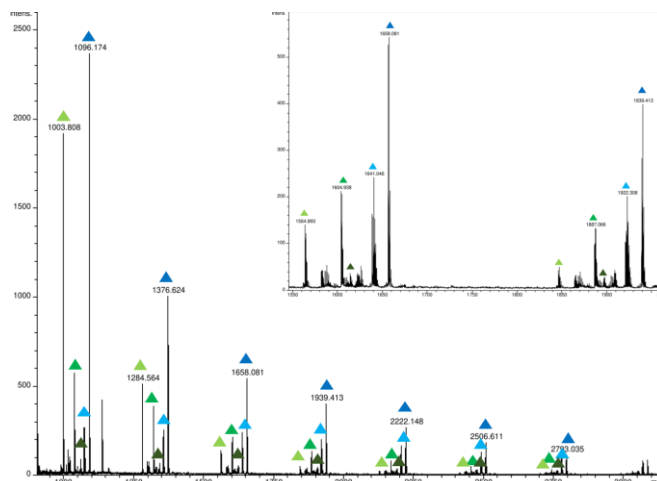


Figura 44 Spectrul MALDI-TOF MS al produsului obținut în condițiile optime rezultate din DoE.

Prođușii identificați au fost aducții K^+ ai terpolimerilor liniari și ciclici care conțin unități HFA, RCA și glicerol (culoare albastră), copolimeri ciclici (verde), dar și homopolimeri ciclici ai RCA (gri) prezenți ca produse secundare.

2.3.4 Caracterizarea structurală a produșilor de reacție

Caracterizarea structurală a materiilor prime și a produșilor de reacție a fost realizată prin mai multe metode spectroscopice, pentru a evidenția grupările funcționale caracteristice compușilor formați. În Figura 45, spectrele FT-IR corespunzătoare ale RCA (albastru), HFA (negru) și copolimerul (roșu) obținut după 48 de ore de reacție, la 50°C , în *t*-butanol, 1200 rpm, sunt prezentate suprapuse. Se poate observa deplasarea benzii corespunzătoare vibrației de valență a grupării carbonil de la $1710,2 \text{ cm}^{-1}$ în RCA la $1708,73 \text{ cm}^{-1}$ pentru ester.

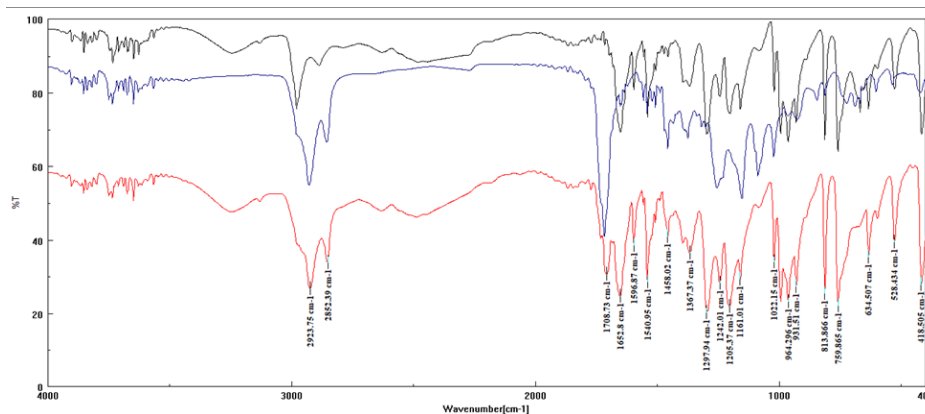


Figura 45 Spectrul FT-IR al copolimerului (roșu), suprapus peste spectrele monomerilor HFA (negru) și RCA (albastru).

Introducerea de unități de furan în lanțul de polihidroxiacid a fost demonstrată prin spectroscopie RMN 1D și 2D. Figura 46 prezintă spectrul 2D HMBC al produsului de reacție al RCA cu HFA obținut după 48 de ore de reacție la 50°C și 1200 rpm, în *t*-butanol.

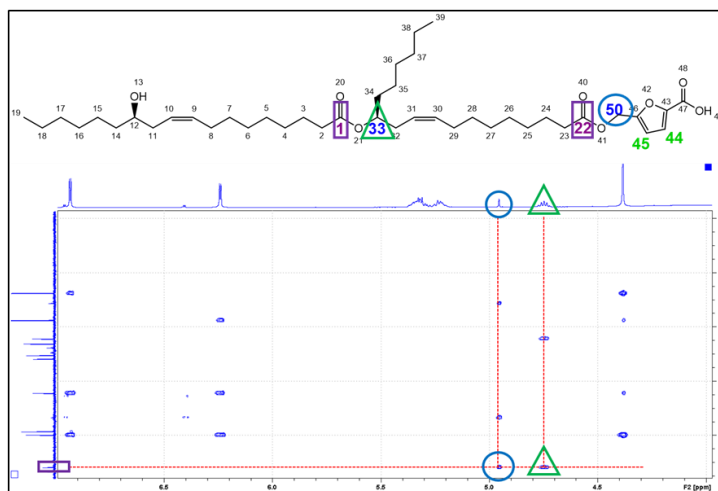


Figura 46 Spectrul 2D HMBC RMN al produsului de reacție RCA și HFA; interval (4-7 ppm/80-175 ppm).

Spectrul 2D HMBC arată cuplajele la distanță dintre semnalele corespunzătoare atomilor de carbon 1 (171,6 ppm) și 22 (171,6 ppm) cu semnalele de protoni de la carbonul 33 (4,74 ppm) și 50 (4,95 ppm).

Aceste două cuplaje îndepărtate demonstrează formarea legăturii esterice între gruparea carboxilică a RCA (C22) și gruparea hidroxil (O41) provenită din HFA, respectiv esterificarea între gruparea hidroxil (O21) a RCA de pe lanțul lateral cu o

altă moleculă RCA (C1). Numerotarea atomilor se referă la oligoesterul ipotetic cu două unități RCA și o unitate HFA, având structura chimică prezentată în Figura 47.

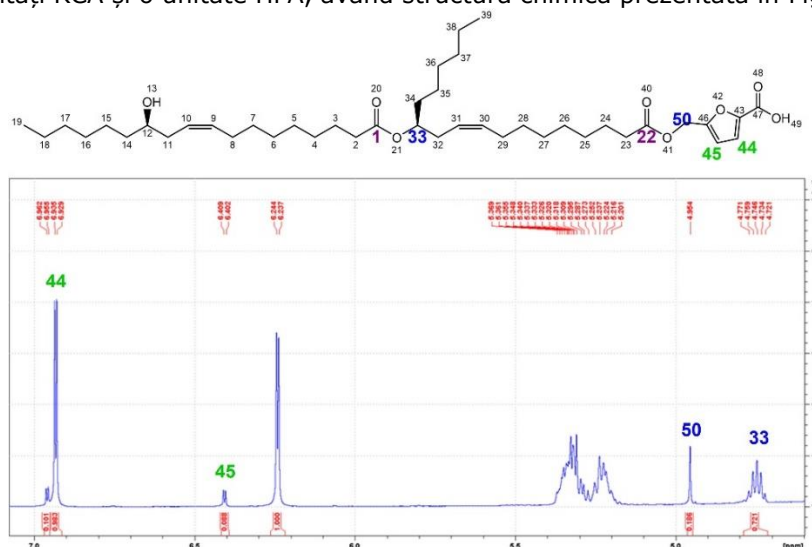


Figura 47 Spectrul ^1H RMN al produsului de reacție obținut din RCA și HFA obținut la 50°C , 48 h, în t-butanol, în prezența lipazei din *Ps. stutzeri*; interval (4-7,1 ppm).

Din spectrul ^1H RMN (Figura 47) al produsului de reacție obținut din RCA și HFA, singletul la 4,95 ppm corespunde protonilor metilen din reziduul HFA, iar cvintetul la 4,74 ppm corespunde protonului metinic (H33) din lanțul RCA. Semnalele la 6,95 ppm și 6,40 ppm corespund protonilor de vinil din HFA, fiecare având o constantă de cuplare egală cu 3,54 Hz. Raportul în care se găsesc protonii la 6,94 ppm și respectiv 6,40 ppm cu cvintetul la 4,74 ppm este de aproximativ 1:8, ceea ce demonstrează că unitățile HFA au fost incluse în scheletul principal de polihidroxiacid, fapt confirmat și de analizele MALDI-TOF MS.

2.3.5 Proprietățile termice ale copolimerilor RCA-CO-HFA

Proprietățile termice ale copolimerilor obținuți din RCA și HFA au fost evaluate prin analiză termogravimetrică, realizând o comparație cu materiile prime RCA și HFA.

Termogramele prezentate în Figura 48 indică o ușoară creștere a stabilității termice a copolimerului (roz) față de monomerii RCA (albastru) și HFA (violet). Pierderea de masă începe în jurul valorii de 166°C .

Atât copolimerul, cât și monomerii prezintă descompunere termică în două etape, așa cum este confirmat de cele două inflexiuni la 177°C , respectiv 324°C în cazul copolimerului.

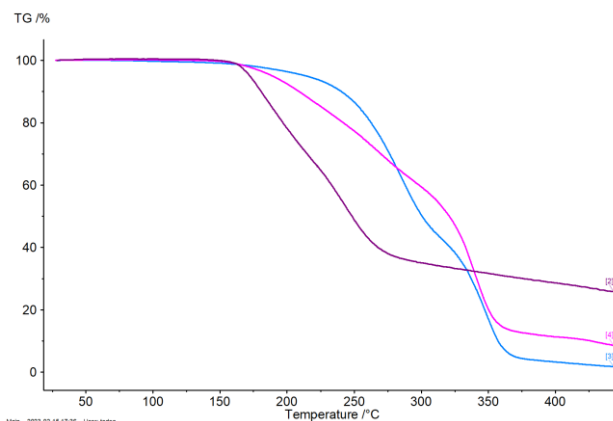


Figura 48 Termograme ale oligoesterului RCA-co-HFA (roz), RCA (albastru) și HFA (violet).

Din termogramele TGA au fost determinate temperaturile la pierderi de masă de 5%, 10% și 50% (TD_5 , TD_{10} și TD_{50}) și sunt raportate în Tabelul 15. Rezultatele arată că temperatura la care se înregistrează o pierdere de masă de 50% este în cazul poli(5-hidroximetil-2-furancarboxilat-co-ricinoleat)-ului cu 20°C mai mare față de RCA și cu 72°C mai mare față de HFA, ceea ce indică o stabilitate mai mare a oligoesterului față de materiile prime.

Tabelul 15 Determinarea TGA la TD_5 , TD_{10} și TD_{50} pentru poli(5-hidroximetil-2-furancarboxilat-co-ricinoleat), comparativ cu monomerii RCA și HFA

Probă	TD_5 [°C]	TD_{10} [°C]	TD_{50} [°C]
RCA	214	241	301
HFA	172	181	249
Copolimer	189	209	321

Aceste rezultate au fost publicate în revista Sustainable Chemistry and Pharmacy [326].

2.3.6 Obținerea organogelurilor. Testarea proprietăților termice, mecanice, reologice

Organogelurile sunt sisteme semi-solide cu o fază organică lichidă imobilizată pe o rețea tridimensională compusă din fibre gelificatoare, reticulate sau încurcate. Aplicațiile organogelurilor sunt diverse: industria chimică, biotehnologică, cosmetică și alimentară. În farmacologie, ele sunt utilizate drept platforme de eliberare a substanțelor active a medicamentelor și a vaccinurilor pe diverse căi, cum ar fi transdermic, oral sau parenteral [327]. În cadrul acestui subcapitol a fost testată capacitatea de formare a organogelurilor în diferiți solvenți organici utilizând oligoesteri cu unități furanice și acid ricinoleic. Pentru obținerea organogelurilor au fost testați solvenți organici cu diferite valori logP în intervalul 0,46-4,27. Testarea capacității de formare a organogelurilor s-a realizat conform metodei prezentate în secțiunea experimentală iar ca materii prime s-au testat sisteme mono-component (oligoesterii sintetizați/hidroxiacid gras) sau bi-component (oligoesteri și hidroxiacid gras).

Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 16 și se poate observa că formarea organogelurilor a fost favorizată în solvenți cu valori ale logP mai mari decât 2 (cu polaritate scăzută).

Tabelul 16 Solvenții testați pentru obținerea organogelurilor.

Nr.	Solvent	Gelifiere	LogP
1	Ciclohexan	Y	3,44
2	Toluen	Y	2,11
3	n-Heptan	Y	4,27
4	Benzen	Y	2,13
5	2-Metiltetrahidrofuran	N	1,08
6	Tetrahidrofuran	N	0,46
7	Acetat de etil	N	0,71
8	Cloroform	N	1,97

Proprietățile reologice ale organogelurilor s-au determinat utilizând vâscozimetru Brookfield AMETEK DV2T.

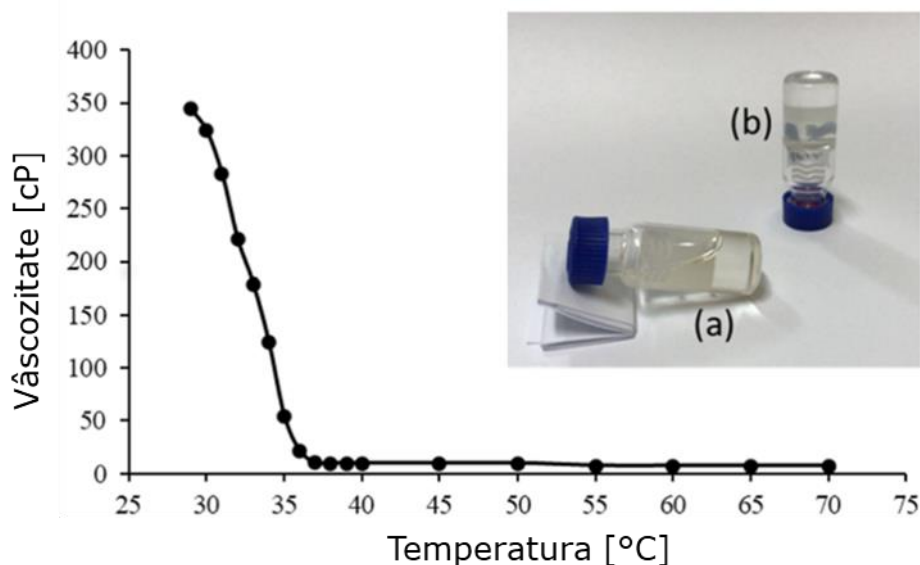


Figura 49 Curba de vâscozitate a organogelului obținut din oligoesteri RCA-co-HFA folosind ciclohexan ca solvent. Imaginea inset a probei solubilizată în ciclohexan la (a) 70°C și (b) 30°C.

Un exemplu de organogel obținut din oligoesteri cu unități furanice în ciclohexan este prezentat în Figura 49. În care se poate observa că în intervalul de temperatură 30-35°C vâscozitatea crește până la valori de aproximativ 350 cP.

2.3.7 Stabilitatea termică a organogelurilor

În Figura 50 sunt prezentate curbele TG și DSC ale organogelului obținut utilizând copolimerul RCA-co-HFA și 1% 12HSA în ciclohexan.

Termograma organogelului prezintă un peak endoterm la 352,3°C, fapt ce dovedește că poate fi utilizat în diverse aplicații la temperaturi ridicate.

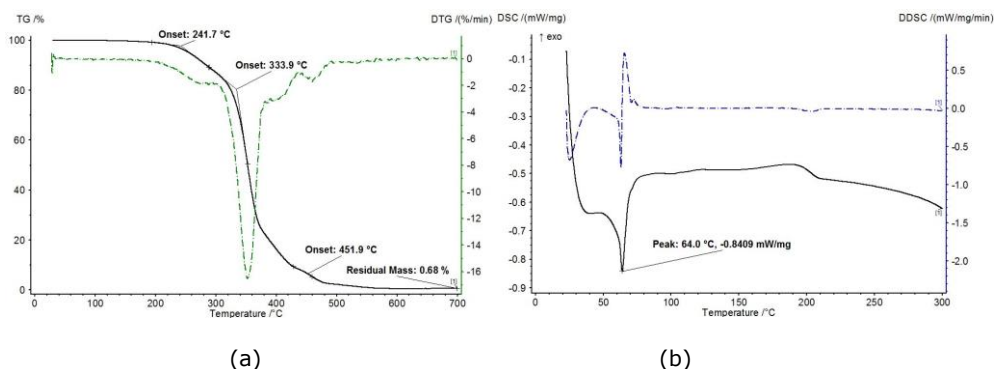


Figura 50 (a) Termograma și (b) Curba DSC corespunzătoare organogelului obținut din copolimeri obținuți în sistem „one-pot” din ulei de ricin și 5OH2FA.

Curba DSC a organogelului obținut din oligoesterul sintetizat în sistem “one-pot” prezintă un comportament de topire în două etape în intervalul 40-60°C, cu un pic endoterm pronunțat la 64°C ((a) (b)

Figura 50b).

În Tabelul 17 sunt prezentate pierderile de masă ale organogelului, pe intervalul 30-700°C. Rezultate obținute confirmă stabilitatea ridicată prin valoarea temperaturii de 255.4 °C corespunzătoare unei pierderi de masă de 5%.

Tabelul 17 Pierderile de masa pe diferite intervale de temperatură a organogelului AP7

Interval temperatură [°C]	Pierderea de masă [%]	DTG peak T [°C]	T ₅ [°C]	T ₅₀ [°C]
193 - 289	10.09	274.7		
295 - 385	66.94	352.3	255.4	352.6
434 - 492	6.23	459.0		

2.3.8 Caracterizarea morfologică a organogelurilor

Morfologia probelor rezultate după evaporarea solventului din organogel a fost investigată folosind un microscop electronic de scanare/transmisie Quanta FEG 250 prevăzut cu detector de electroni secundar (SED). Studiile au fost efectuate la vid scăzut, la 5 kV și la dimensiuni de 1,5 puncte. Imaginile SEM indică morfologie diferită a probelor obținute în heptan și ciclohexan în comparație cu probele obținute în solvenți aromatici (toluen și benzen), a căror microstructură a fost afectată (Figura 51 a-d).

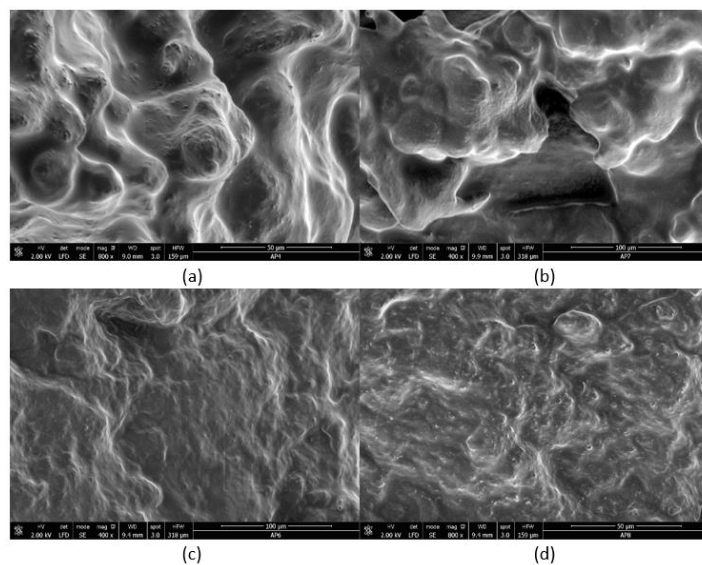


Figura 51 Imaginile SEM ale organogelurilor obținute în n-heptan (a) ciclohexan (b) toluen (c) și benzen (d)

Probele obținute în ciclohexan și n-heptan (Figura 51 a, b) prezintă morfologie neîntreruptă cu porozități de aproximativ 50 μm . Această diferență în morfologia supramoleculară din geluri poate fi atribuită modului de agregare și depinde puternic de solventul folosit pentru gelifiere.

2.4. Sinteza enzimatică și caracterizarea unor oligoesteri ai acidului adipic cu dioli alifatici, ciclici, sau aromatici

Evaluarea selectivității lipazelor față de diferiți dioli alifatici, ciclici și aromatici în reacții de poliesterificare

Obiectivele acestui studiu au fost:

- investigarea selectivității lipazelor din CalB și *Ps. stutzeri* pentru diferiți dioli disponibili comercial în reacția de policondensare cu acidul adipic, folosind ca mediu de reacție un solvent organic verde (ecologic) sau în sistem fără solvent;
- caracterizarea produșilor de reacție prin diferite tehnici cromatografice, spectrometrie de masă, spectroscopie RMN și analiza termică;

Deși lipaza din CalB s-a dovedit a fi un catalizator eficient pentru transformarea unei game largi de substraturi cu grupări funcționale alifactice în poliesteri (de ex. poliesteri cu funcțiuni vinil sau hidroxi), pentru lipaza din *Ps. stutzeri* nu există studii sistematice pentru evaluarea unei asemenea selectivități. În cazul lipazei din CalB studiile au fost orientate mai ales spre obținerea de poliesteri derivați din monomeri regenerabili, de exemplu acizii 2,5-furandicarboxilic, adipic sau succinic și 1,4-butandiolul [180].

În cadrul acestui studiu au fost selectați 15 dioli a căror structură este prezentată în Figura 52, iar ca și co-substrat în toate reacțiile de policondensare studiate s-a utilizat dimetil adipatul. Principala caracteristică urmărită a fost gradul de polimerizare obținut în reacțiile studiate.

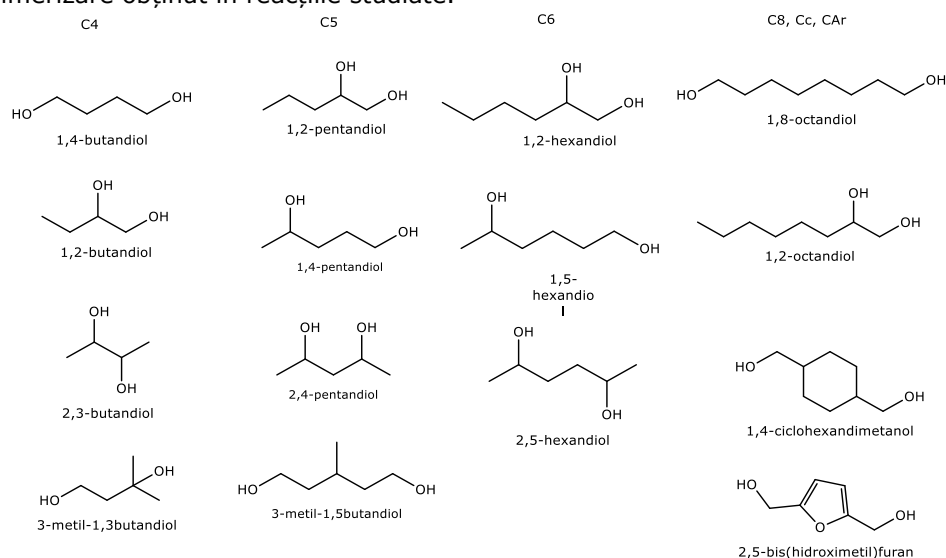


Figura 52 Structurile chimice ale diolilor selectați pentru reacții de poliesterificare.

2.4.1 Influența biocatalizatorului asupra gradului de polimerizare

Pentru acest studiu cei 15 dioli menționați au fost selectați ca donori de acil iar reacțiile au fost efectuate în mediu fără solvent la temperatura de 50°C utilizând ca biocatalizator lipaza din CalB, respectiv *Ps. stutzeri*. Pentru o evaluare cât mai riguroasă a capacității specifice a acestor lipaze de a forma lanțuri polimerice mai

lungi în condițiile date, rezultatele au fost prezentate ca și grad de polimerizare (DP) calculat pe baza maselor moleculare medii numerice, determinate prin cromatografie de exclusiune sterică. Masele moleculare au fost determinate folosind o curbă de calibrare realizată cu standarde de polistiren în domeniul 580–12500 Da. Reacțiile fără catalizator nu au dus la identificarea unor produși de poliesterificare detectabili. Toate sintezele au fost efectuate în duplicat.

Rezultatele obținute sunt prezentate în Figura 53 și indică în majoritatea cazurilor valori ale DP mai ridicate când s-a utilizat lipaza din CalB pentru obținerea oligoesterilor diolilor alifatici, cu excepția produșilor obținuți utilizând 1,8 octandiol ca substrat. Lipaza din *Ps. stutzeri* s-a dovedit mai eficientă pentru produșii obținuți pe bază de dioli ciclici și diolul derivat din furan.

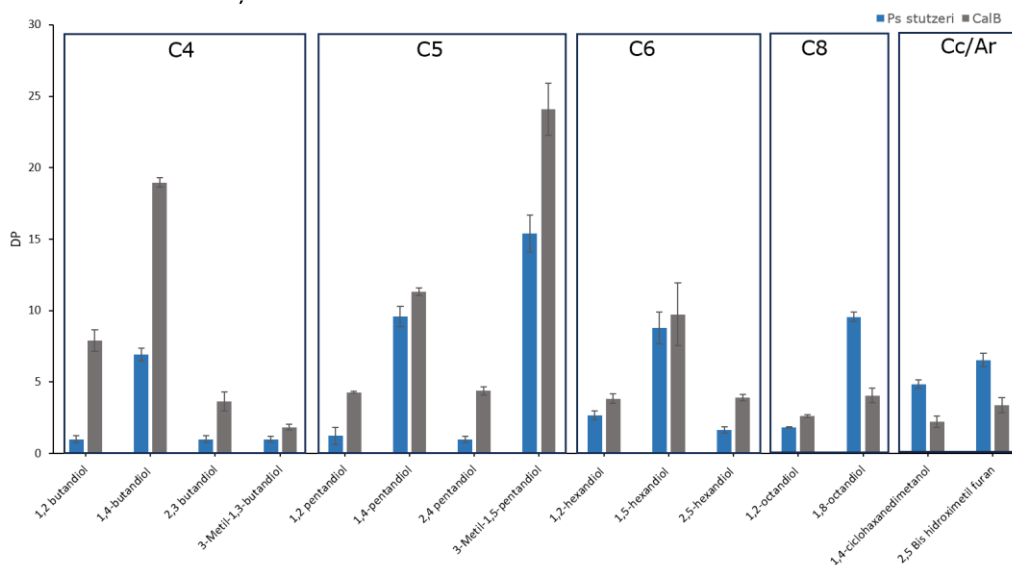


Figura 53 Gradul de polimerizare (DP) determinat pentru produșii obținuți la 50°C în prezența lipazelor din *Ps. stutzeri* și CalB, calculat pe baza analizelor GPC a produșilor de policondensare.

În continuare a fost studiat efectul mediului de reacție asupra reacțiilor de policondensare.

2.4.2 Efectul mediului de reacție asupra gradului de polimerizare

În prima parte a acestui studiu reacțiile au fost efectuate utilizând lipaza din CalB imobilizată (GF-CalB), disponibilă comercial și toți diolii menționați ca substrat, iar ca mediu de reacție a fost testat un solvent ecologic, 2-metil-tetrahidrofuranul (2-MeTHF), acesta are avantajele de a fi ușor disponibil, ieftin și neoteric, fiind deja utilizat într-o gamă largă de procese chimice, inclusiv pentru obținerea de substanțe chimice de sinteză fină, policondensări enzimatică și polimerizări cu deschidere de ciclu [328]. Celelalte condiții de reacție au fost identice ca în studiul precedent.

Rezultatele obținute (Figura 54) indică faptul că s-au obținut grade de polimerizare mai mari când s-au utilizat ca substrat diolii alifatici C4, C5 și C8 cu grupări OH primare. Această selectivitate a fost demonstrată anterior și pentru alte substraturi, dar trebuie remarcat că pentru substratul C4, dar mai ales pentru

substratul C8, rezultatele au fost semnificativ mai ridicate în reacțiile efectuate în 2-MeTHF, comparativ cu sistemul fără solvent. În cazul substratului C5, valoarea DP a fost puțin mai mare pentru reacțiile efectuate fără solvent. În cazul substraturilor cu grupări OH vicinale (în pozițiile 1 și 2 sau 2 și 3) rezultatele au fost asemănătoare, indiferent de numărul atomilor de carbon din molecula diolilor, iar valorile DP nu au depășit 5. Pentru diolii C4 și C5 se poate observa că valorile DP au fost mai ridicate pentru substraturile în care grupările OH au fost distanțate (1,4 sau 1,5), fiind înregistrată o dublare a acestora în comparație cu valorile obținute pentru diolii vicinali.

În cazul substraturilor ciclice sau aromatice în condițiile de reacție studiate nu s-au obținut valori DP mai mari decât 5, ceea ce denotă o selectivitate slabă pentru aceste structuri în condițiile studiate.

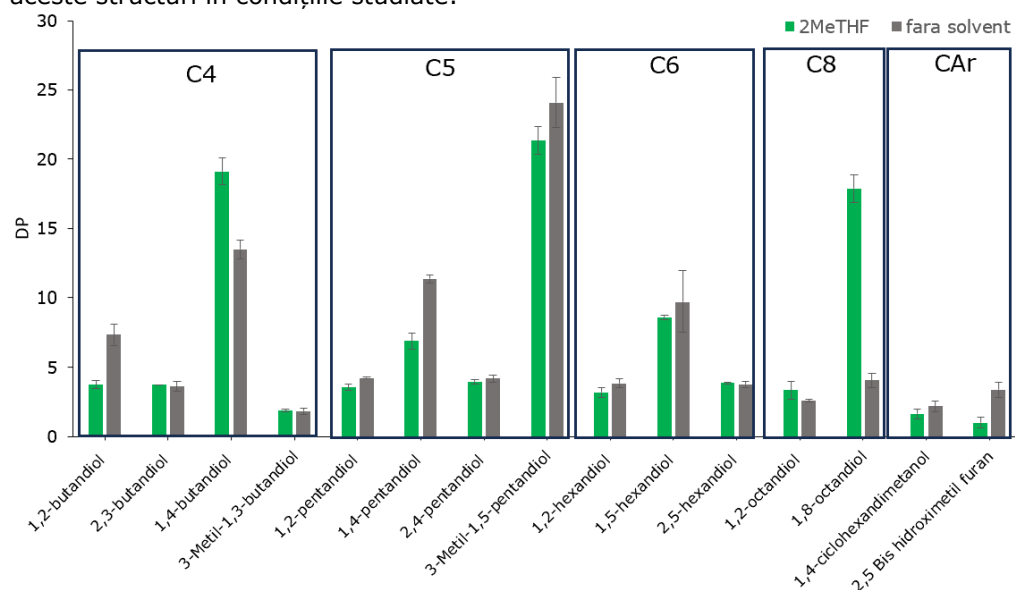


Figura 54 Gradul de polimerizare (DP) al oligoesterilor acidului adipic cu dioli, obținuți în prezența lipazei din CalB imobilizate, în 2-MeTHF sau în mediu fără solvent.

Pentru studiul similar realizat cu lipaza din *Ps. stutzeri* au fost selectate 7 dioli, cei pentru care s-au obținut cele mai mari grade de polimerizare în mediu fără solvent. Rezultatele prezentate în Figura 55 indică faptul că în acest caz utilizarea 2-MeTHF ca mediu de reacție nu favorizează creșterea maselor moleculare medii, valorile DP fiind mai scăzute pentru toți cei 7 dioli studiați, comparativ cu sistemul de reacție fără solvent.

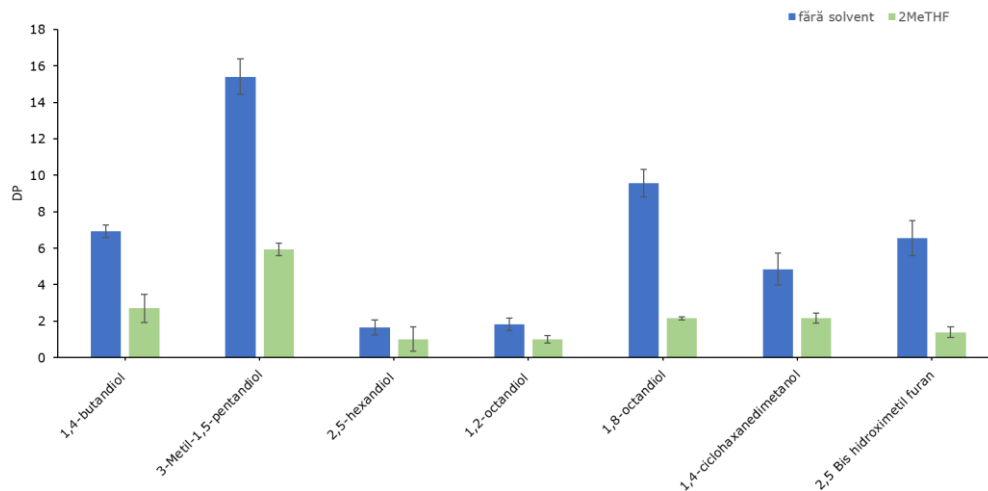


Figura 55 Gradul de polimerizare (DP) al oligoesterilor acidului adipic cu dioli, obținuți în prezența lipazei din *Ps stutzeri*, în 2-MeTHF sau în mediu fără solvent, calculat pe baza analizelor GPC a produșilor de policondensare.

2.4.3 Influența temperaturii de reacție asupra gradului de polimerizare

Pentru a evalua efectul temperaturii au fost selectați 8 dioli cu structuri diferite, iar reacțiile au fost efectuate în mediu fără solvent la două temperaturi, 50°C și 85°C, folosind lipaza din CalB. Această valoare de 85°C a temperaturii a fost selectată pe baza datelor de literatură, fiind valoarea optimă pentru lipaza din CalB imobilizată pe rășini acrilice [180]. Rezultatele obținute, exprimate și de data aceasta ca valori ale DP, sunt prezentate în Figura 56 și indică creșteri semnificative odată cu creșterea temperaturii de reacție, în special pentru substraturile C6, C8 ciclic și aromatic, unde valorile DP au determinate au fost de 3 pana la 6 ori mai mari.

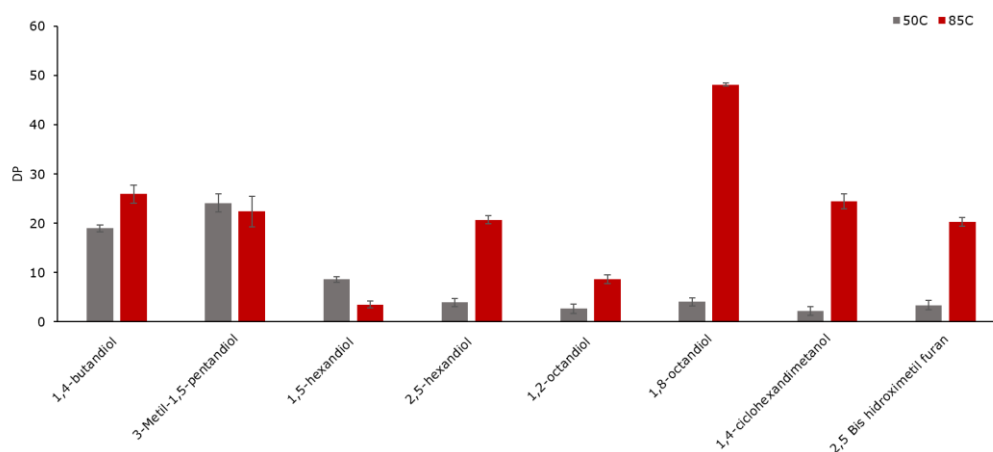


Figura 56 Gradul de polimerizare (DP) al oligoesterilor acidului adipic cu dioli, obținuți cu lipaza din CalB la diferite temperaturi de reacție, calculat pe baza analizelor GPC a produșilor de policondensare.

Rezultatele obținute în prezența lipazei din *Ps. stutzeri* sunt prezentate în Figura 57 iar efectul temperaturii se poate observa la fel ca și în cazul CalB pentru substraturile C8, ciclic și aromatic.

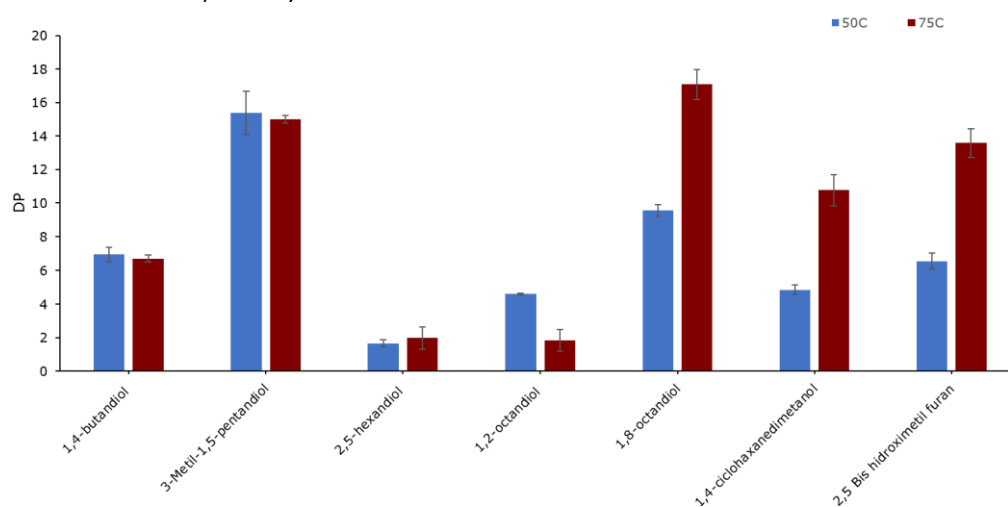


Figura 57 Gradul de polimerizare (DP) al oligoesterilor acidului adipic cu dioli, obținuți cu lipaza din *Ps. stutzeri* la diferite temperaturi de reacție, calculat pe baza analizelor GPC a produșilor de policondensare.

2.4.4 Caracterizarea structurală a produșilor de reacție

Produșii de reacție au fost caracterizați prin spectroscopie MALDI-TOF MS iar pentru exemplificare în Figura 58 este prezentat spectrul produsului poli(3-metil-1,5-

pentandiol adipat) în care se poate observa prezența semnalelor m/z 897.44 corespunzătoare aductului de K^+ al produsului cu 7 unități (4 unități de acid adipic și 3 unități de 3-metil-1,5-pentandiol), cât și a semnalelor de la 983.51 m/z corespunzătoare aductului de K^+ al oligoesterului cu 8 unități (4 unități de acid adipic și 4 unități de 3-metil-1,5-pentandiol). Se poate observa prezența celor 2 serii de produși, cu număr par și număr impar de unități de monomer, diferența dintre semnale fiind de 228,28 m/z , valoarea corespunzătoare unității dimerice.

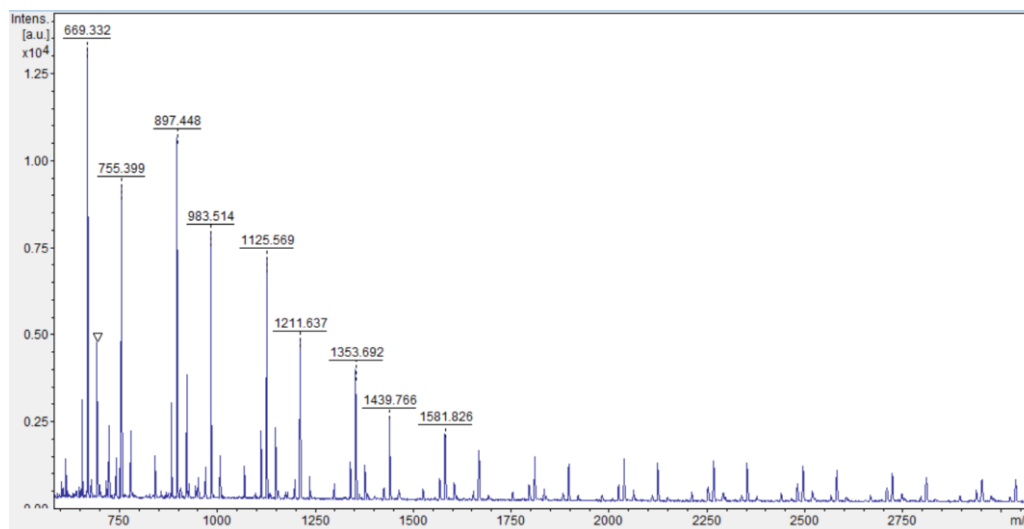


Figura 58 Spectrul MALDI-TOF MS corespunzător oligoesterilor obținuți utilizând ca materii prime dimetil adipat și 3-metil-1,5-pentandiol, la 50°C, în sistem fără solvent cu lipază din CalB drept catalizator.

Conversia substraturilor, dar și confirmarea structurii produșilor de reacție s-au demonstrat prin spectroscopie 1H -RMN, iar pentru exemplificare în Figura 59 este prezentat spectrul 1H -RMN al produsului poli(3-metil-1,5-pentandiol adipat). Din semnalele corespunzătoare acidului adipic din regiunea 2,3-2,0 ppm s-a determinat conversia substratului ca fiind 88%.

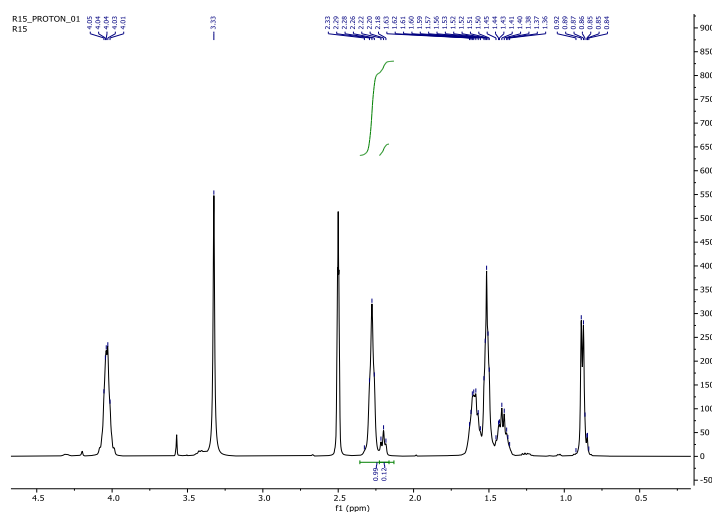


Figura 59 Spectrul ^1H -RMN corespunzător oligoesterilor obținuți utilizând dimetil adipat și 3-metil-1,5-pentandiol ca materii prime, la 50°C , în sistem fără solvent, cu lipază din CalB drept catalizator

2.4.5 Caracterizarea produșilor de reacție prin analiză termică

Analiza termică a produșilor de reacție s-a realizat prin TG și DSC, în atmosferă de azot. În acest sens s-a realizat o selecție a produșilor cu masele moleculare cele mai ridicate, iar termogramele corespunzătoare sunt prezentate în Figura 60. Rezultate obținute indică cea mai ridicată stabilitate termică pentru poliesterul cu unități ciclice poli(1,4-ciclohexandimetanol adipat) reprezentat cu negru, iar stabilitatea cea mai scăzută corespunde la poli(2,5-bis-hidroximetilfuran adipat), reprezentat cu verde închis în figură. Pentru restul probelor analizate stabilitatea termică a crescut în următoarea ordine: poli(1,8-octandiol adipat) > poli(1,4-butilen adipat) > poli(3-metil-1,5-pentandiol adipat) > poli(1,2-octandiol adipat) > poli(1,5-hexandiol adipat) > poli(2,5-hexandiol adipat).

Prezența unui singur punct de inflexiune pe fiecare termogramă indică existența unei singure etape de descompunere a poliesterilor evaluați.

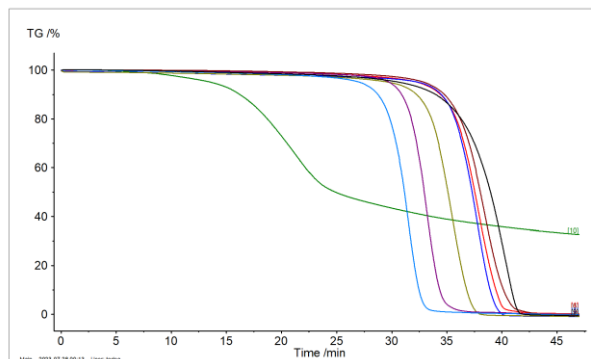


Figura 60 Termogramele TG ale poliesterilor sintetizați pe cale enzimatică: Poli(1,4-butilen adipat)-roșu, Poli(3-metil-1,5-pentandiol adipat)-albastru închis, Poli(1,2-octandiol adipat)-verde deschis, Poli(1,5-hexandiol adipat)-violet, Poli(2,5-hexandiol adipat)-albastru deschis, Poli(1,8-octandiol adipat)-maro, Poli(1,4-ciclohexandimetanol adipat)-negru, Poli(2,5-*bis*-hidroximetilfuran adipat)-verde închis

În Tabelul 18 sunt incluse valorile temperaturilor corespunzătoare pierderilor de masă la diferite procente, 5, 10 și 50%. Cu excepția valorilor corespunzătoare Poli(2,5bisfuranadipat), valorile Td_5 s-au situat în intervalul 299-354°C. Tendința de degradare termică a rămas similară pe tot parcursul analizei pentru toate probele considerate. Nu au fost observate diferențe semnificative între poliesterii alifatici cu unități C6 și C8, mai ales în prima parte a degradării.

Tabelul 18 Valorile temperaturilor corespunzătoare pierderilor de masă de 5, 10 și 50% pentru oligoesterii acidului adipic cu dioli sintetizați pe cale enzimatică

Proba	Td_5 [°C]	Td_{10} [°C]	Td_{50} [°C]
Poli(1,4-butilen adipat)	352.8	373.3	405.4
Poli(3-metil-1,5-pentandiol adipat)	354.3	373.9	402.6
Poli(1,2-octandiol adipat)	325.2	351.8	380.7
Poli(1,5-hexandiol adipat)	326.7	338.8	358.1
Poli(2,5-hexandiol adipat)	299.4	316.3	341.2
Poli(1,8-octandiol adipat)	299.6	330.7	390.4
Poli(1,4-ciclohexandimetanol adipat)	336.3	369.7	419.2
Poli(2,5- <i>bis</i> -hidroximetilfuran adipat)	165.7	192.1	277.7

Pentru analiza DSC au fost selectați 4 dintre oligoesterii evaluați prin termogravimetrie. Figura 61 a-d. Din curba de răcire (albastră) se poate observa prezența picurilor exoterme care demonstrează că toate probele analizate sunt cristaline.

Rezultatele obținute indică valoarea cea mai ridicată a temperaturii de vitrifiere în cazul poli(1,8-octandiol adipat)-ului. Punctul de topire și temperatura de cristalizare cele mai mari s-au obținut pentru poli(2,5-*bis*-hidroximetilfuran adipat) și se pot datora prezenței ciclului aromatic furan în moleculă.

Tabelul 19 prezintă parametrii determinați prin analiza DSC realizată în atmosferă de azot, cu o viteză de încălzire de 10°C/min, în două cicluri consecutive de răcire-încălzire. Termogramele DSC sunt prezentate în Figura 61 a-d. Din curba de răcire (albastră) se poate observa prezența picurilor exoterme care demonstrează că toate probele analizate sunt cristaline.

Rezultatele obținute indică valoarea cea mai ridicată a temperaturii de vitrifiere în cazul poli(1,8-octandiol adipat)-ului. Punctul de topire și temperatura de cristalizare cele mai mari s-au obținut pentru poli(2,5-*bis*-hidroximetilfuran adipat) și se pot datora prezenței ciclului aromatic furan în moleculă.

Tabelul 19 Parametrii DSC determinați pentru oligoesterii acidului adipic cu dioli sintetizați pe cale enzimatică

Proba	T _g [°C]	T _m [°C]	ΔH _m [J/g]	T _c [°C]
Poli(1,4-butilen adipat)	-16.7	48	-10.46	30.2
Poli(1,8-octandiol adipat)	-67.8	65	-93.21	47.2
Poli(2,5- <i>bis</i> -hidroximetilfuran adipat)	-25.8	125.6	-23.02	82.1
Poli(1,4-ciclohexandimetanol adipat)	-51.0	82.6	-33.70	40.1

T_g – temperatura de vitrifiere; T_m – temperatura de topire; ΔH – entalpia; T_c – temperatura de cristalizare.

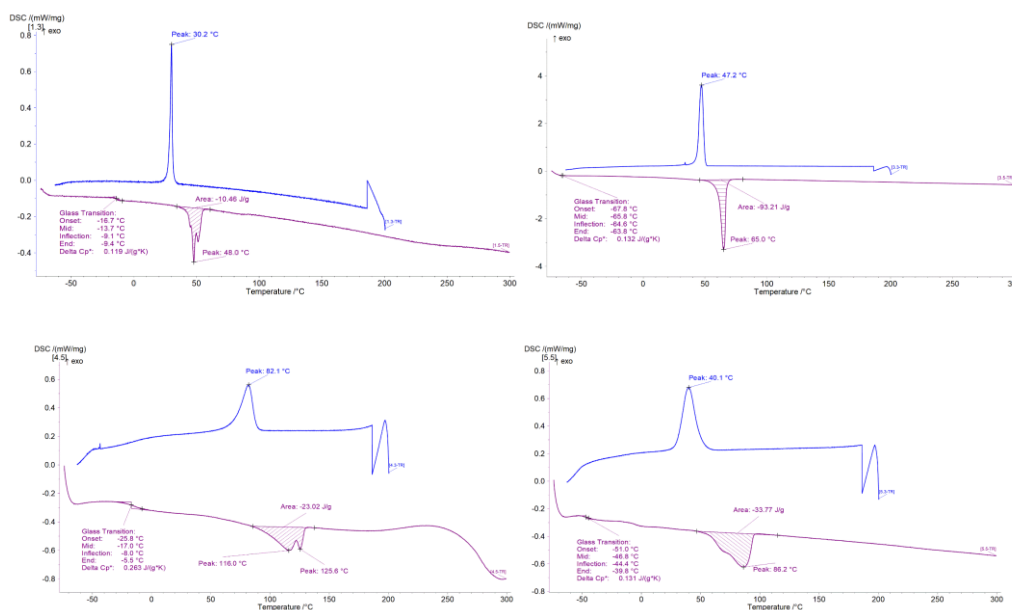


Figura 61 Termogramele DSC de răcire (albastru), respectiv a doua încălzire (violet) corespunzătoare produșilor poli(1,4-butilen adipat) (a), poli(1,8-octandiol adipat) (b), poli(2,5-*bis*-hidroximetilfuran adipat) (c), poli(1,4-ciclohexandimetanol adipat) (d)

2.5. Evaluarea impactului ecologic al unor oligoesteri obținuți pe cale enzimatică: studii de biodegradare în medii lichide cu apă dulce și apă sărată

Condițiile necesare pentru ca un poliester să fie utilizat în aplicații cosmetice sunt biocompatibilitatea, biodegradabilitatea și non-toxicitatea. Biodegradabilitatea materialelor plastice într-un mediu lichid se referă la degradarea în apă dulce (lacuri, râuri), în apă sărată (mări, oceane) sau în nămolurile aerobe și anaerobe (tratarea apelor uzate) [192].

Există diferite raportări legate de studiile de degradabilitate a materialelor plastice în laboratoare în amestecuri sintetice definite sau amestecuri complexe nutritive, care pot fi considerate drept studii preliminare de degradare în mediu lichid. Biodegradarea oligoesterilor acidului 2-hidroxiacetil-2-furancarboxilic cu ϵ -caprolactonă în apă de râu a fost raportată anterior de Todea și colab. [102], când s-au obținut rezultate promițătoare, dar a fost evaluată doar o pierdere de masă.

Scopul acestui studiu a fost de a realiza o evaluare preliminară a biodegradabilității oligoesterilor sintetizați în subcapitolele 2.3 și 2.4 în mediu lichid, utilizând sisteme de monitorizare a consumului de oxigen, respectiv inocul de microorganism din apă sărată (apă de mare) și apă dulce (apă din râu).

Spre deosebire de alte studii de degradare raportate în literatură, care se rezumă în general la degradarea polimerilor formulați sub formă de film iar analizele se rezumă la observarea eroziunii suprafețelor sau a resturilor de plastic, în cadrul acestui studiu s-au considerat două fenomene diferite:

- i) faza inițială a biodegradării, implicând ruperea celor mai labile legături, corespunzătoare în general hidrolizei legăturilor esterice;
- ii) biodegradarea monomerilor individuali și a unor trigliceride model.

Comparația dintre cele două informații distincte de biodegradare oferă informații utile despre modul în care componentele structurale specifice, dar și natura conexiunii chimice a blocurilor de construcție afectează biodegradabilitatea fiecărui produs.

Este important de subliniat că rezultatele biodegradării sunt considerate valide atunci când se referă la inoculul specific utilizat, variabilitatea geografică și sezonieră și temperatura de incubare. Cu toate acestea, ele permit o evaluare comparativă a efectelor atribuibile reactivității legăturilor chimice și proprietăților fizico-chimice ale moleculelor. Se știe că procesele abiotice și biotice decurg lent și depind de o serie de factori, cum ar fi masa moleculară și raportul suprafață-volum, sau solubilitatea în apă [329].

Biodegradabilitatea oligoesterilor selectați a fost studiată utilizând dispozitivele specifice OxiTop (Xylem Analytics, Germania), care sunt prevăzute cu senzori ce măsoară consumul biochimic de oxigen (CBO) necesar microorganismelor aerobe să degradeze materia organică dintr-un anumit mediu. Studiul s-a realizat în medii de cultură lichide, în care s-a utilizat ca inocul apă colectată din râul Bega din Timișoara, România și apă colectată din Marea Adriatică, Italia. O parte din aceste experimente au fost realizate la Universitatea din Trieste în cadrul proiectului European Marie Skłodowska-Curie, RenEcoPol: Sustainable route for circularity of renewable polyesters. Experimentele s-au realizat la 21°C, iar determinarea consumului biochimic de oxigen s-a realizat timp de 21 zile, din 24 în 24 de ore.



Figura 62 Sistemul Oxytop pentru determinarea oxigenului dizolvat

Pentru acest studiu au fost selectați produși de reacție sintetizați și caracterizați în capitolele precedente, iar pentru a oferi o imagine cât mai clară despre biodegradabilitatea lor în medii lichide de apă dulce și apă sărată aceștia au fost grupați în 3 categorii.

- oligoesteri derivați de furan
- oligoesteri alifatici
- monomeri alifatici sau aromatici

Evoluția concentrației de oxigen consumat, exprimată în mg/L în funcție de timp, este prezentată în Figurile 63-65.

Poliesterii cu unități furanice selectați pentru acest studiu au fost: poli(5-hidroximetil-2-furancarboxilat-co-ricinoleat)-ul sintetizat în subcapitolul 2.3, poli(2,5-*bis*-hidroximetilfuran adipat)-ul sintetizat în subcapitolul 2.4, și poli(butilen-2,5-furanoat)-ul, cu rol de moleculă model, sintetizat tot pe cale enzimatică, utilizând 1,4-butandiol și 2,5-dimetilfuranoat ca materii prime.

Valorile cele mai ridicate ale BOD [mg/L], prezentate în Figura 63, au fost obținute pentru toți cei trei oligoesteri considerați în mediu de apă sărată, iar creșterea s-a realizat în următoarea ordine: poli(5-hidroximetil-2-furancarboxilat-co-ricinoleat) > poli(2,5-*bis*-hidroximetilfuran adipat) > poli(butilen-2,5-furanoat). Aceeași tendință s-a observat și în cazul studiului experimental realizat în apă colectată din râul Bega. Diferența dintre valorile obținute în apă sărată respectiv în apă dulce sunt de 10-15 mg/L.

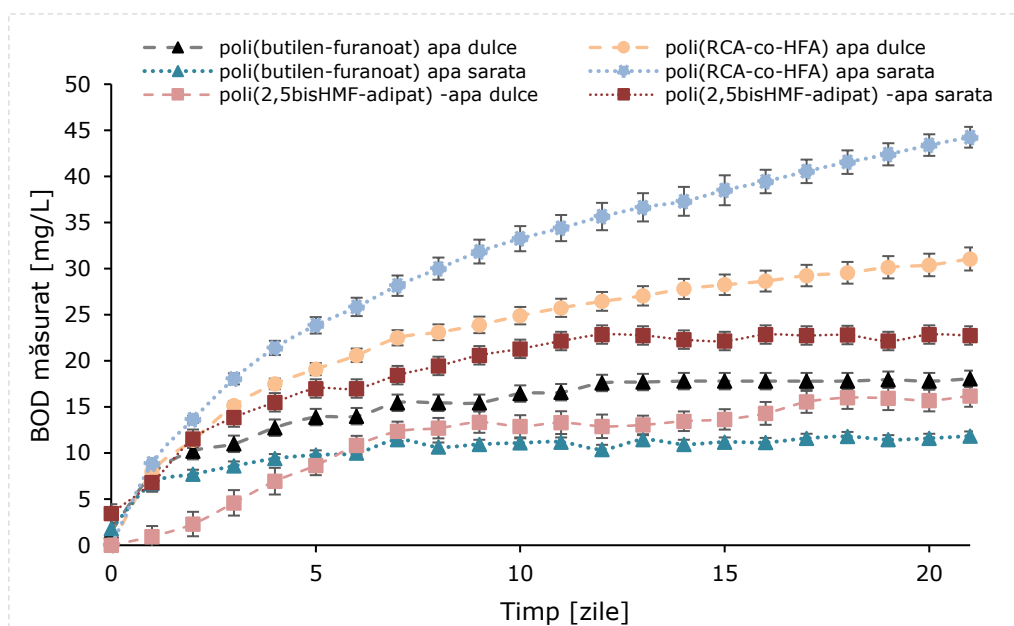


Figura 63 Valorile BOD în funcție de timp determinate în mediu de apă dulce și mediu de apă sărată pentru trei tipuri de oligoesteri furanici ai acidului adipic cu dioli

Poliesterii alifatici considerați în cadrul acestui studiu au fost: poli(1,8-octandiol adipat)-ul, poli(1,5-hexandiol adipat)-ul, poli(1,4-ciclohexildimetanol adipat)-ul, sintetizați în subcapitolul 2.4. Selecția acestor oligoesteri parțial formați din unități regenerabile (acidul adipic fiind un diacid de origine bio) s-a realizat pe baza maselor moleculare obținute dar și luând în considerare structura catenei comonomerului: liniară, ramificată sau ciclică. La fel ca și în cazul derivaților furanici, valorile cele mai ridicate ale BOD [mg/L], prezentate în Figura 64, au fost obținute pentru toți cei trei oligoesteri după incubare în mediu de apă sărată, iar creșterea s-a realizat în următoarea ordine: poli(1,8 octandiol adipat) > poli(1,5-hexandiol adipat) > poli(1,4-ciclohexildimetanol adipat). În comparație cu derivații furanici valorile sunt ușor mai scăzute, dar diferența dintre valorile obținute în apă sărată respectiv în apă dulce rămân în intervalul 10-15 mg/L.

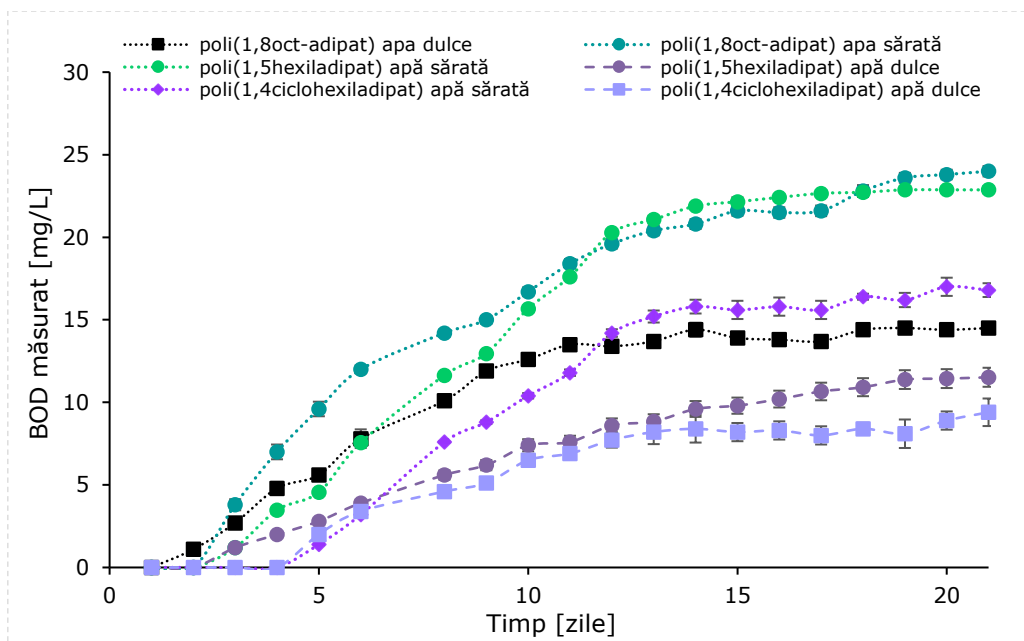


Figura 64 Valorile BOD în funcție de timp determinat în mediu de apă dulce și mediu de apă sărată pentru oligoesterii alifatici ai acidului adipic cu dioli

A fost studiată și biodegradarea și a unor materii prime utilizate pentru obținerea oligoesterilor, fiind selectate următoarele trei: uleiul de ricin, acidul 2,5-furandicarboxilic și acidul 5-hidroximetil-2-furoic. Degradarea acidului adipic și a 1,4-butandiolului în apă sărată a fost anterior raportată de grupul de la Universitatea din Trieste, Italia, utilizând o metodă similară [329]

Pentru uleiul de ricin valorile au fost comparabile cu cele anterior raportate iar aceste valori mai scăzute se datorează probabil insolubilității acidului ricinoleic rezultat după hidroliza tricinoleinei în mediu apos. Tot solubilitatea redusă, dar și rigiditatea moleculelor poate fi responsabilă și pentru diferențele de degradare obținute pentru acidul furan 2,5-dicarboxilic și pentru acidul 5-hidroximetil 2-furoic. Valorile BOD pentru acidul 2,5-furandicarboxilic au fost 0 în primele zile, urmând apoi o creștere dar ulterior rata de biodegradare a fost lentă (Figura 65).

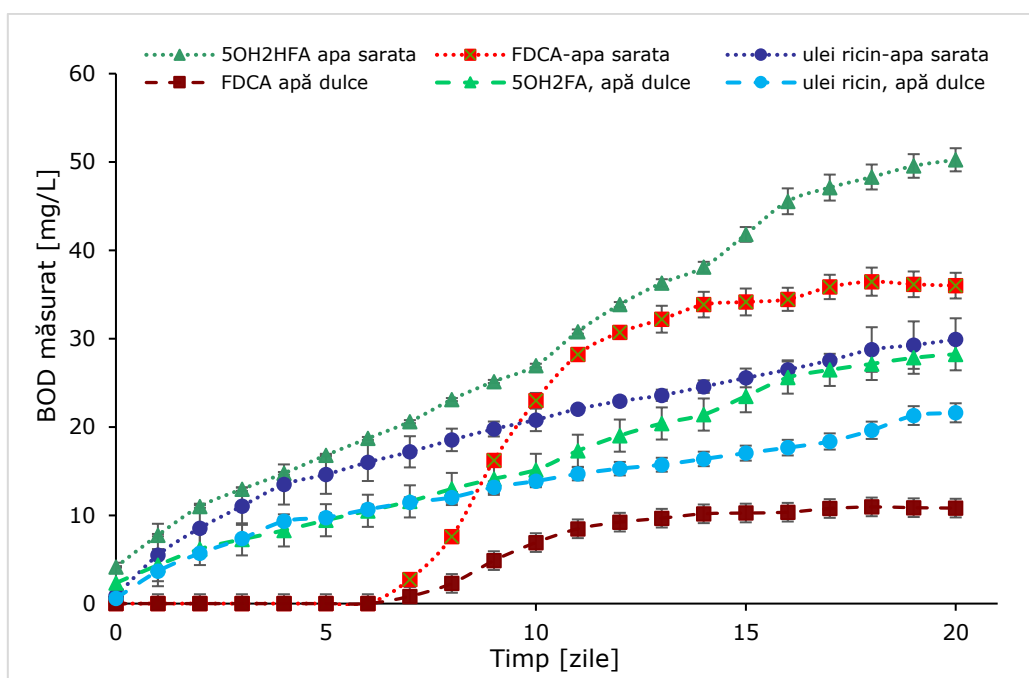


Figura 65 Valorile BOD în funcție de timp determinat în mediu de apă dulce și mediu de apă sărată pentru monomerii furanici și uleiul de ricin.

În Tabelul 20 sunt prezentate rezultatele exprimate în procente de biodegradabilitate pentru poliesterii considerați în acest studiu. Compozițiile procentuale ale elementelor C, H și O au fost calculate pentru fiecare poliester luând în considerare un tetramer. Cu ajutorul compoziției procentuale s-a calculat consumul biochimic de oxigen teoretic (TOD) și gradul de biodegradabilitate (D_t).

Tendențele de biodegradare ale compușilor testați, la fel ca și în alte cazuri, sunt diferite. În unele cazuri, peste 50% din biodegradarea totală a avut loc în primele 10 zile de la expunere. De fapt, valorile determinate pentru $D_{t_{21}}$ în toate cazurile au fost mai ridicate în comparație cu valorile $D_{t_{10}}$ cu mai puțin de 50%. Valorile $D_{t_{21}}$ obținute pentru oligoesterii au fost în intervalul 6,12-74,23%.

Datele de biodegradabilitate obținute pentru oligoesterii cu unități furanice (pozițiile 1-6 din tabel) indică faptul că după 5 zile biodegradabilitatea oligoesterilor pe bază de acid adipic și 2,5-HMF a fost de aproximativ 2 ori mai mare în comparație cu valoarea D_t a oligoesterilor care conțin PBF și de 1,5 ori mai mari decât la oligoesterii cu acid ricinoleic. Diferențele dintre oligoesterii cu acid adipic se datorează și maselor moleculare, care în acest caz au fost diferite iar pentru calculul procentului de biodegradare masa moleculară are un rol major.

După 21 de zile raportul dintre valorile D_t a fost mai scăzut pentru probele 3 și 5 din apă sărată, dar aceeași tendință s-a menținut și pentru probele 4 și 6, evaluate în apă dulce.

Pentru oligoesterii alifatici (pozițiile 7-12) cele mai mari valori D_t au fost obținute pentru oligoesterul cu unități de 1,8-octandiol, urmat de oligoesterii ciclici cu unități de ciclohexan. În comparație cu oligoesterii cu ramificați sau ciclici se poate observa ca pentru oligoesterul liniar (poziția nr. 7) procentul de degradare în primele 5 zile atinge valoarea de aproximativ 30%, cu 10% mai ridicată decât valoarea

raportată anterior pentru poli(1,4-butilen adipat). Cu toate acestea, după primele 10 zile de incubare viteza de degradare scade. Comportamentul de biodegradare observat poate fi corelat cu valorile temperaturilor de degradare determinate prin TG și DSC și este în concordanță cu datele raportate anterior, unde valorile mai mici ale T_g și T_m sunt corelate cu o viteză de degradare mai mare [330].

Rezultatele obținute pentru monomerii testați (Tabelul 20 nr 13-18) indică faptul că după 21 de zile compusul cu cea mai scăzută biodegradabilitate au fost acidul 2,5-furandicarboxilic ($D_{t21}=4,34\%$ în apă sărată și $2,86\%$ în apă dulce). Cele mai mari valori D_t s-au obținut pentru uleiul de ricin ($D_{t21}=12,60\%$ în apă sărată).

Conform ghidurilor US-EN ISO 14851:2019, o substanță poate fi considerată biodegradabilă dacă BOD este mai mare de 60% ThOD. Chiar dacă în literatură s-au propus timpi de degradare mai lungi față de cei raportați în acest studiu (adică 60-180 de zile, ISO 19679; ISO 23977-2; ASTM D7991-15), timpii de expunere mai mari sunt, de asemenea, asociați cu o probabilitate crescută de erori experimentale [329].

Tabelul 20 Valorile D_t obținute după 5, 10 și 21 de zile de degradare în apă sărată și apă dulce ale monomerilor și oligoesterilor luați în considerare pentru biodegradare.

Nr	Proba	D_{t5} [%]	D_{t10} [%]	D_{t21} [%]
1	PBFs	12.86	15.22	16.70
2	PBFd	9.06	10.28	10.97
3	P2,5HMFs	36.35	45.55	48.65
4	P2,5HMFd	18.49	27.58	34.64
5	PRCA-HFAs	22.5	31.36	41.74
6	PRCA-HFAd	18.01	23.49	29.29
7	P1,8As	29.97	52.13	74.93
8	P1,8Ad	17.48	39.33	45.27
9	P1,5As	2.42	8.32	12.15
10	P1,5Ad	1.48	3.93	6.12
11	P1,4As	1.70	12.64	20.70
12	P1,4Ad	2.16	7.02	9.62
13	Ulei ricin s	6.16	8.76	12.60
14	Ulei ricin d	4.10	5.84	9.10
15	FDCAs	0.00	0.84	4.34
16	FDCAd	0.00	1.58	2.48
17	2,5HMFs	2.54	4.08	7.62
18	2,5HMFd	1.43	2.29	4.28

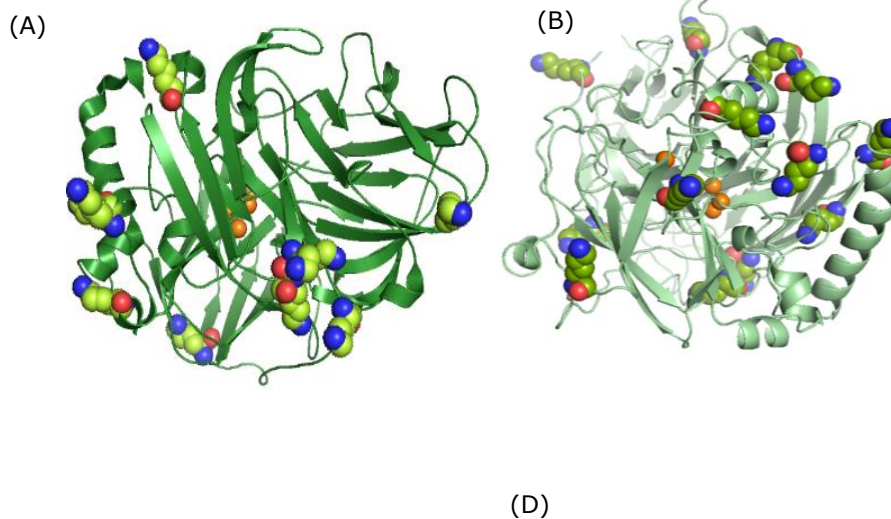
PBF- poli(1,4-butilen-2,5-furanoat); P2,5HMF- poli(2,5-bis-hidroximetilfuran adipat); PRCA-HFA- poli(5-hidroximetil-2-furancarboxilat-co-ricinoleat); P1,8A-poli(1,8-octandiol adipat); P1,5A- poli(1,5-hexandiol adipat); P1,4A- poli(1,4-ciclohexildimetanol adipat); s- apa sărată și d-apă dulce

2.6. Oxidarea enzimatică a glicerolului utilizând lacaze immobilizate prin legare covalentă.

În cadrul acestui capitol a fost studiată oxidarea enzimatică a glicerolului. În acest sens au fost investigate pentru oxidarea glicerolului patru lacaze native disponibile comercial din *Aspergillus* sp., *Trametes versicolor*, *Rhus vernicifera* și *Agaricus bisporus*, folosind cinci mediatori diferiți. Cele mai active lacaze au fost immobilizate covalent pe șase suporturi solide funcționalizate: trei matrici magnetice și trei pe bază de polimeri metacrilici cu grupări active epoxidice sau aminice (Lifetech™). În comparație cu binecunoscutele particule magnetice Fe_3O_4 , în cadrul acestui capitol au fost utilizate particule magnetice pe bază de Ni-Zn sau Ni-Zn-Co ferite spinel (MFe_2O_4) cu diferiți cationi metalici (M: Zn, Co, Ni). Activitatea celor 18 preparate enzimatică rezultate a fost evaluată și cei mai activi biocatalizatori, care au fost caracterizați în detaliu în ceea ce privește stabilitatea și reutilizarea, demonstrând stabilitate la depozitare, pH și stabilitate termică îmbunătățite în comparație cu enzimele native. Biocatalizatorii au fost utilizați cu succes pentru oxidarea glicerolului la 50°C, demonstrând o selectivitate ridicată pentru sinteza acidului gliceric. Aceste rezultate au fost publicate în revista *Enzyme and Microbial Technology* [331].

2.6.1 Analiza structurală și de suprafață a lacazelor

În prima etapă a cercetărilor s-a efectuat o analiză computațională a celor patru lacaze disponibile comercial care au fost utilizate în studiile experimentale, din *Trametes versicolor*, *Aspergillus* sp., *Rhus vernicifera* și *Agaricus bisporus*, pentru a evalua posibilitățile de formare a legăturilor covalente cu suportul, fără implicarea regiunii situsului activ și permițând atașarea suplimentară a enzimei prin interacțiuni hidrofobe. La început au fost evaluate numărul și pozițiile resturilor de lizină potențial implicate în legarea covalentă. Această analiză indică faptul că lacaza din *T. versicolor* (Figura 66A) are 8 reziduuri Lys superficiale, *Aspergillus* sp. (Figura 66B) și *A. bisporus* (Figura 66C) au 12, iar lacaza de la *R. vernicifera* (Figura 66D). În acest ultim caz, cel puțin șase reziduuri sunt localizate în apropierea situsului activ, o caracteristică care poate afecta activitatea enzimei după immobilizare, deoarece formarea legăturii covalente poate bloca situsul activ [332].



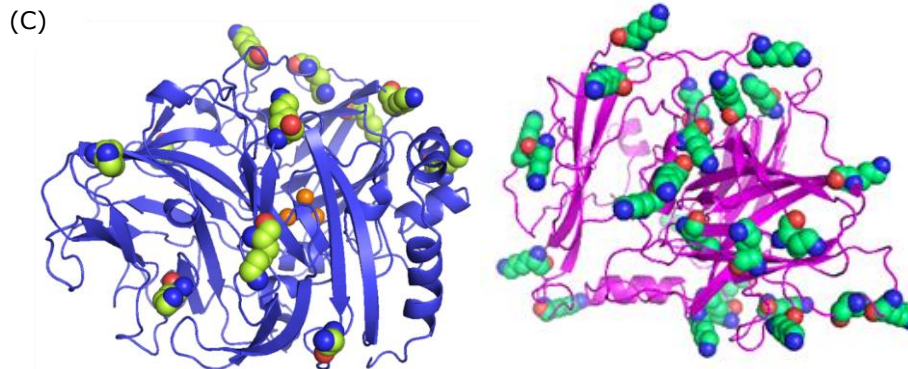


Figura 66 Structurile lacazelor din *T. versicolor* (PDB 1GYC) (A) *Aspergillus* sp. (Cod PDB 6F5K) (B) și modele de omologie ale *A. bisporus* (C) și *R. venicifera* (D), cu evidențierea structurilor secundare α -helicale și β -pliate. Reziduurile Lys sunt evidențiate în verde (mod sferă), în timp ce ionii Cu^{2+} sunt portocalii.

2.6.2 Selecția lacazelor native pentru oxidarea glicerolului

Toate lacazele native menționate anterior au fost testate pentru oxidarea enzimatică a glicerolului. Până în prezent, conform datelor de literatură, din această serie de lacaze doar cea din *T. versicolor* a fost studiată anterior pentru oxidarea glicerolului [333], [334]. Experimentele au fost efectuate la valoarea optimă a pH-ului, determinată experimental pentru fiecare lacază (Figura 67): pH 5 pentru *T. versicolor*, pH 3 pentru *Aspergillus* sp., pH 7,0 pentru *R. vernicifera* și pH 8,0 pentru *A. bisporus*.

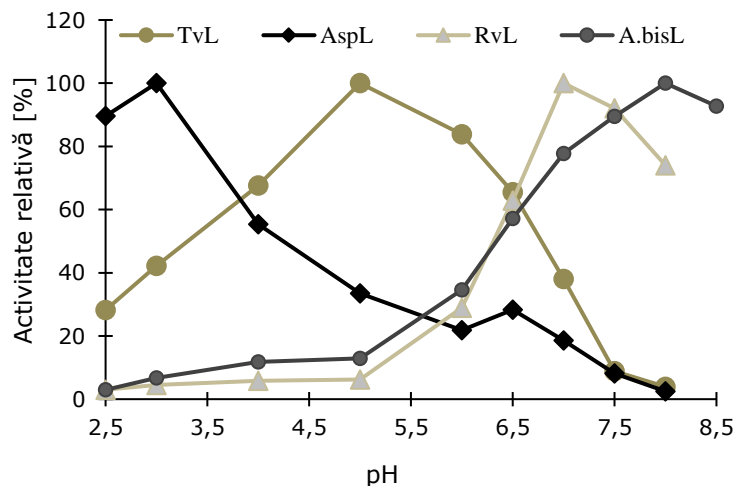


Figura 67 pH-ul optim al lacazelor native, determinat folosind 2,6-dimetilfenol (DMP) ca substrat

Reacțiile au fost monitorizate prin RI-HPLC până la 96 de ore de reacție, iar în Figura 68 sunt prezentate două exemple de cromatograme, una pentru demonstrarea eficacității separării amestecului de posibili produși de reacție (A) și o cromatogramă rezultată după reacția de oxidare a glicerolului în prezența lacazei din *T. versicolor* (B).

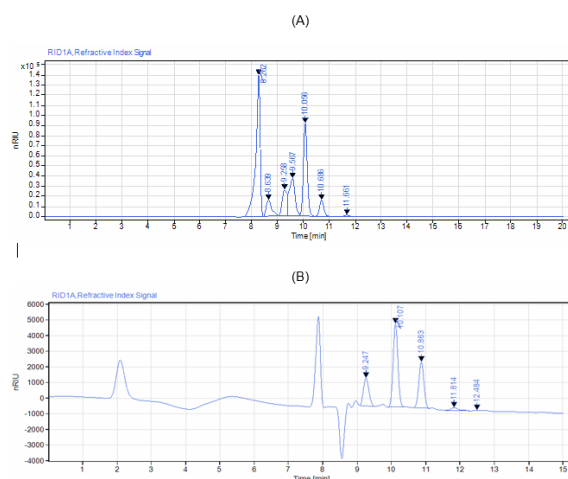


Figura 68 Cromatograma (A) unui amestec sintetic de acid mezoxalic ($R_t = 8,262$ min), gliceraldehidă ($R_t = 9,258$ min), glicerol ($R_t = 10,056$ min), acid tartronic ($R_t = 9,567$ min) și acid gliceric ($R_t = 9,567$ min), după optimizarea condițiilor de separare pe coloana HPLC Luna Omega 5 μm Polar C18 100 \AA 250 x 4,6 mm; (B) produsul de reacție al oxidării glicerolului cu lacaza din *Trametes versicolor*, la un timp de reacție de 72 de ore, evidențiind formarea gliceralhidei ($R_t = 9,247$ min) și acidului gliceric ($R_t = 10,863$ min).

În Figura 69 este inclus un exemplu în care sunt prezentate valorile concentrațiilor de glicerol, gliceraldehidă și acid gliceric obținute folosind lacaza din *T. versicolor* drept catalizator. Concentrația de glicerol a scăzut constant odată cu progresia reacției, în timp ce prezența gliceralhidei și a acidului gliceric este evidentă deja după 2 ore. Trebuie remarcat și faptul că nu a fost observată formarea acidului tartronic sau a acidului mezoxalic, produși secundari posibili ai reacției de oxidare.

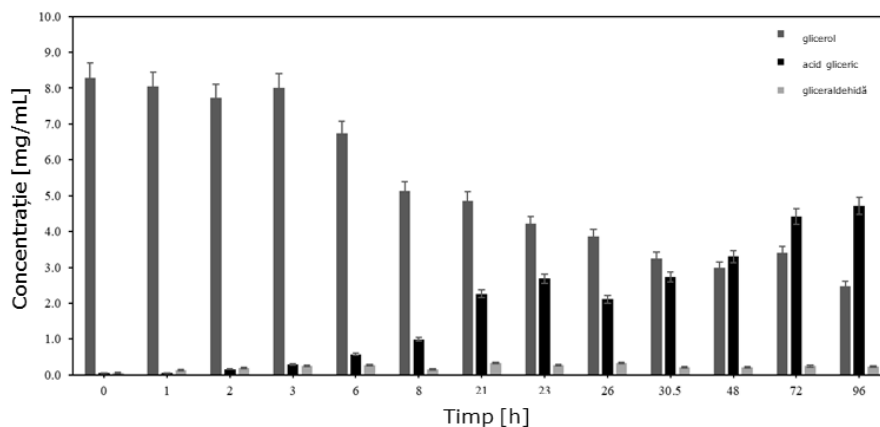


Figura 69 Oxidarea glicerolului în timp catalizată de lacaza nativă din *T. versicolor* (10 U/mL) la pH 5, 30°C. Concentrațiile de glicerol și ai produșilor de reacție au fost determinate prin analiză RI-HPLC.

Rezultatele obținute, exprimate ca și conversii ale glicerolului pentru toate cele 4 lacaze selectate, după de 96 de ore de reacție, au fost incluse în Tabelul 21. Se observă că lacaza din *T. versicolor* a fost cea mai eficientă, deoarece valoarea conversiei glicerolului după 96 de ore a atins 70%. În prezența lacazei din *Aspergillus* sp. valoarea conversiei a fost de numai aproximativ 10%, în timp ce în cazul lacazelor din *R. vernicifera* și *A. bisporus* nu a depășit 5%. Pe baza acestor rezultate, lacazele din *T. versicolor* și *Aspergillus* sp. au fost luate în considerare pentru experimentele de optimizare ulterioare.

Tabelul 21 Conversiile glicerolului obținute în reacțiile de oxidare catalizate de lacaze native din diverse surse, folosind 30 mM TEMPO la 25 °C, 1000 rpm și 96h.

Sursă lacază	Conversie glicerol [%]
<i>T. versicolor</i>	70.1 ± 4.6
<i>Aspergillus</i> sp.	10.2 ± 2.8
<i>R. vernicifera</i>	4.9 ± 1.6
<i>A. bisporus</i>	4.8 ± 1.4

Oxidarea glicerolului folosind lacaze din *Trametes hirsuta* a fost raportată anterior de Guebitz și colab., identificând formarea ca produși a unor acizi organici cu masă moleculară mică (acid glicerol, acid tartronic, acid mezoxalic), dar și a gliceraldehidei ca produs secundar de reacție. Gliceraldehida a fost principalul produs de reacție în prima etapă, confirmând selectivitatea oxidativă ridicată a inițiatorului pentru grupa hidroxil primară [335]. Rezultatele din acest au confirmat această selectivitate și pentru lacaza din *Trametes versicolor*, deși concentrația de gliceraldehidă nu a prezentat modificări semnificative după 3 ore de reacție, în timp ce concentrația de acid glicerol a crescut constant, până la 70% randament la 96 de ore de reacție.

2.6.3 Efectul inițiatorilor asupra reacției de oxidare a glicerolului catalizată de lacazele din TvL și AspL

Studii anterioare asupra mediatorilor și inițiatorilor utilizați în reacțiile de oxidare catalizate de lacaze a diferitelor substraturi nearomatice au indicat faptul că un rol important în mecanismul de oxidare îl joacă stabilitatea formei oxidate a inițiatorului și potențialul redox al acestuia [336].

În cadrul acestui studiu, pe lângă TEMPO, au fost testați alți patru inițiatori, raportați anterior ca fiind eficienți pentru substraturi nearomatice [337]. Rezultatele obținute (Tabelul 22) confirmă eficiența mai ridicată a inițiatorului TEMPO pentru ambele lacaze studiate. S-au obținut conversii de aproximativ 10% în prezența N-hidroxifthalimidei sau 1-hidroxibenzotriazolului (pentru lacaza *T. versicolor*), în timp ce pentru ceilalți inițiatori conversiile nu au depășit 10%. Deși pentru *Aspergillus* sp. în cazul în care conversiile obținute cu N-hidroxifthalimidă și TEMPO ca inițiator au fost similare, valorile au fost în ambele cazuri considerate nesatisfăcătoare. Prin urmare, TEMPO a fost selectat ca inițiator pentru experimentele ulterioare de oxidare a glicerolului.

Tabelul 22 Efectul inițiatorilor asupra reacției de oxidare a glicerolului folosind lacaze de la *T. versicolor* și *Aspergillus* sp.

Lacază	Inițiator	Conversie glicerol [%]
<i>Trametes versicolor</i> (TvL)	TEMPO	70.04 ± 4.3
	N-hidroxiftalimidă	10.22 ± 3.2
	Acid violuric	7.46 ± 1.8
	Acid 3-hidroxiantranilic	0.00 ± 0.0
	1-hidroxibenzotriazol	13.00 ± 2.7
<i>Aspergillus</i> sp. (AspL)	TEMPO	10.93 ± 3.5
	N-hidroxiftalimidă	10.47 ± 2.1
	Acid violuric	4.41 ± 1.8
	Acid 3-hidroxiantranilic	7.75 ± 1.6
	1-hidroxibenzotriazol	8.05 ± 0.9

2.6.4 Imobilizarea lacazelor prin legarea covalentă pe rășini metacrilice și suporturi magnetice funcționalizate

Avantajul major binecunoscut al imobilizării enzimelor pe diferite suporturi este că preparatul enzimatic poate fi reutilizat, ceea ce duce la reducerea costurilor de producție în procesele cu funcționare atât continuă, cât și discontinuă [338]. În comparație cu alte tehnici de imobilizare, legarea covalentă a enzimei pe suporturi împiedică detașarea proteinei făcând biocatalizatorul adecvat pentru aplicații în medii apoase [332]. Deoarece activitatea lacazelor este crescută în medii de reacție apoase [339],[340], atașarea covalentă la suporturi adecvate poate rezolva recuperarea ușoară a biocatalizatorului din amestecul de reacție și problemele de reutilizare a acestuia.

Nouă suporturi diferite (Figura 70) au fost investigate pentru imobilizarea prin legare covalentă a celor două lacaze selectate. Trei suporturi au fost rășini metacrilice, două dintre ele funcționalizate cu grupări epoxidice și una cu grupări amino, iar șase au fost suporturi magnetice, ferite mixte funcționalizate cu grupări amino prin reacție cu NH₂-TMOS sau NH₂-TEOS, așa cum este descris în secțiunea Metode. Ca suporturi magnetice au fost considerate, pentru prima dată, feritele Ni-Zn și feritele Ni-Co-Zn ca suporturi pentru imobilizarea covalentă a lacazelor. Ele au provenit de la Institute of Materials and Environmental Chemistry, Research Centre for Natural Sciences din Budapesta (Ungaria). Deși proprietățile optice și magnetice specifice care au făcut ca aceste materiale să fie adecvate pentru o gamă largă de aplicații sunt probabil mai puțin importante pentru biocataliză, s-a presupus că interacțiunile fizice cu enzima de la suprafața microparticulelor ar putea influența conformația și proprietățile catalitice ale enzimei. Eficiența catalitică a enzimelor imobilizate rezultate a fost evaluată utilizând 2,6-dimetilfenol (2,6-DMP) ca substrat.

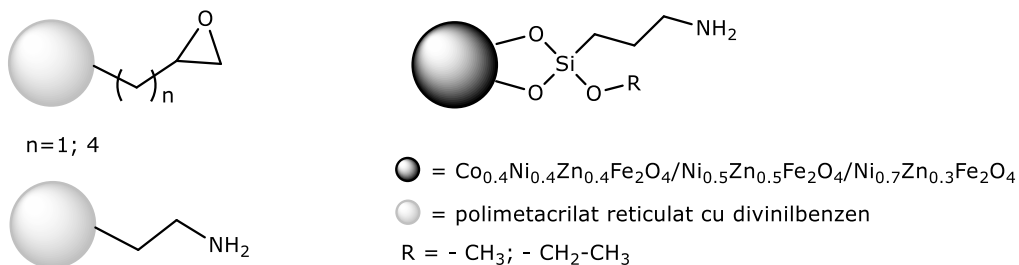


Figura 70 Reprezentarea schematică a suporturilor utilizate în studiul imobilizării lacazelor

2.6.5 Imobilizarea lacazelor prin legarea covalentă pe rășini metacrilice funcționalizate cu grupări amino și epoxidice

Rezultatele obținute folosind suporturile din rășină metacrilică sunt prezentate în Figura 71, indicând că cele mai mari valori ale activității enzimaticе au fost obținute pentru preparatele cu lacază TvL. Preparatul obținut pe suportul funcționalizat cu grupări epoxi-butil a dovedit cea mai mare eficiență catalitică (760,99 U/g), urmat de suportul funcționalizat cu grupări amino (581,32 U/g). Dimpotrivă, pentru preparatele cu lacază din AspL., cea mai mare valoare de activitate a fost obținută pentru preparatul imobilizat pe rășină metacrilică funcționalizată cu grupări amino (156,33 U/g). Se poate observa, de asemenea, că activitatea ambelor enzime a fost mai mică dacă legarea covalentă s-a făcut pe suporturi cu grupări epoximetil (327,61 U/g și 28,80 U/g pentru TvL, respectiv AspL.), indicând o dependență a activității enzimei imobilizate de lungimea lanțului hidrocarbonat [341].

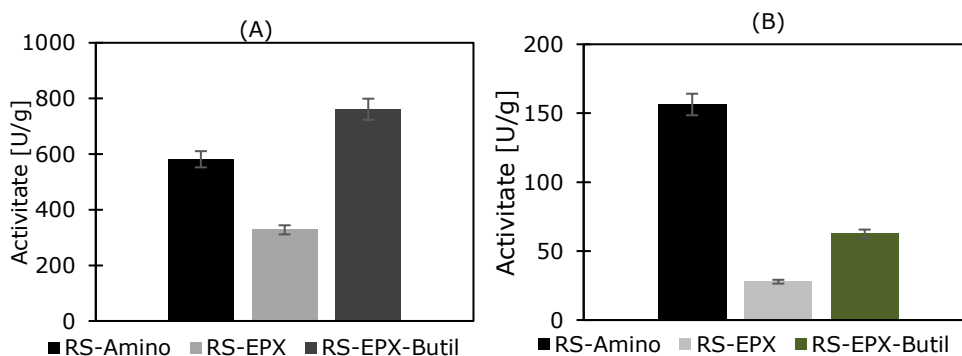


Figura 71 Activitatea lacazelor din TvL(A) și AspL (B) imobilizate prin legare covalentă pe rășini metacrilice Lifetech™ funcționalizate cu grupări amino (RS-Amino), epoxi (RS-EPX) și butil-epoxi (RS-EPX-Butil), determinată pe substratul model 2,6-DMP

2.6.6 Imobilizarea lacazelor prin legarea covalentă pe suporturi magnetice funcționalizate cu grupări aminice

Trei suporturi magnetice, ferite mixte care conțin cantități diferite de Co, Ni și Zn, au fost testate ca suporturi de imobilizare, așa cum s-a menționat. Deși au fost raportate o serie de suporturi pentru imobilizarea lacazelor, există doar câteva studii de imobilizare covalentă pe particule magnetice [342]. În comparație cu binecunoscutele particule magnetice Fe_3O_4 , microparticulele de ferită mixte Ni-Zn sau Ni-Co-Zn au atras interes datorită proprietăților lor magnetice precum superparamagnetismul, cu aplicații în diverse domenii [324]. Într-o lucrare anterioară a grupului nostru, particulele magnetice de ferită mixte au fost utilizate cu succes pentru imobilizarea lipazei, folosind o metodă combinată de entrapare și legare covalentă [343]. Mai mult, s-a demonstrat recent că utilizarea nanosuporturilor cu proprietăți magnetice pentru imobilizarea lacazelor are efect benefic asupra proprietăților optice și electrochimice, importante în extragerea performanțelor biosenzorului. În plus, proprietățile antibacteriene pot crește durata de valabilitate a senzorilor [344].

Înainte de imobilizare, suporturile magnetice au fost funcționalizate cu grupări amino prin utilizarea a doi derivați organosilanici, așa cum este descris în secțiunea experimentală. Rezultatele prezentate în Figura 72 indică valori mai ridicate ale activității pentru toate preparatele obținute folosind lacaza din *T. versicolor* și 3-NH₂-PrTMOS ca silan pentru funcționalizare. Dintre cele 3 tipuri de particule magnetice testate, cea mai mare valoare a activității a fost obținută pentru particulele MG-Zn2.

În cazul preparatelor obținute folosind lacaza din AspL, valorile activității au fost ușor mai ridicate atunci când 3-NH₂-PrTEOS a fost folosit ca precursor silanic, iar pentru suportul MG-Zn2 valoarea activității a fost de 250 U/g, cea mai mare obținută pentru acest tip de suport.

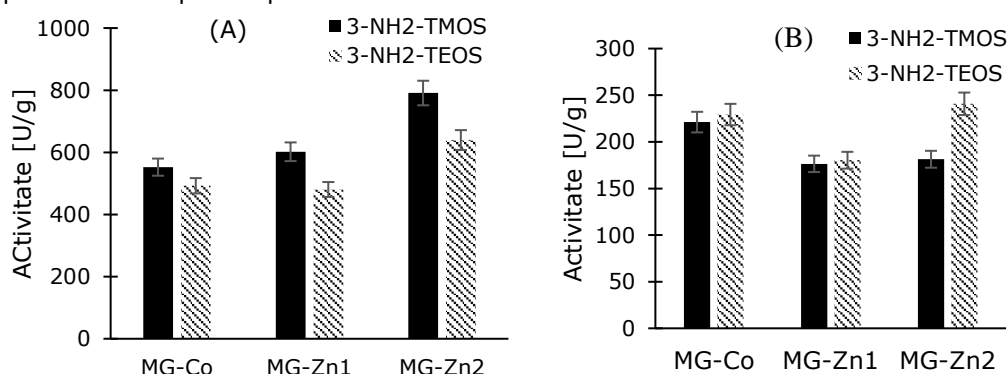


Figura 72 Activitatea lacazelor imobilizate TvL (A) și AspL. (B) pe suporturi magnetice funcționalizate cu grupări amino, determinată pe substratul model 2,6-DMP

2.6.7 Profilurile de pH și temperatură ale lacazelor native și imobilizate

pH-ul este unul dintre cei mai importanți parametri care pot afecta activitatea enzimatică în sistemele apoase. La valori extreme de aciditate sau bazicitate, activitatea enzimei poate fi inhibată, afectând starea ionică a aminoacizilor care formează situsul activ al enzimei, ducând în unele cazuri la inactivarea completă a acesteia. Valoarea optimă a pH-ului este punctul în care enzima are activitate maximă. Aceasta poate diferi în funcție de tipul de enzimă și se poate modifica în

urma imobilizării, datorită modificărilor conformaționale care apar la situsul catalitic al enzimei.

Prin urmare, investigarea profilului de pH în urma procesului de imobilizare a fost un obiectiv important. Rezultatele sunt prezentate în Figura 73 pentru TvL și Figura 74 pentru AspL. Rezultatele indică faptul că TvL imobilizat pe suport epoximetacrilat a avut o valoare optimă a activității la pH 4,0, în timp ce pentru aceeași enzimă imobilizată pe suport magnetic funcționalizat cu grupări 3-aminopropiltrimetoxisilan pH-ul optim a fost 6,5. De asemenea, se poate observa că ambele preparate imobilizate sunt mai stabile pe un interval mai larg de pH în comparație cu enzima nativă (Figura 73). O schimbare a pH-ului optim a fost observată atunci când TvL a fost imobilizat covalent pe nanoparticule de magnetită acoperite cu chitosan [345], pe caolinit [346] sau pe membrane de polipropilenă [347]. În comparație cu alți biocatalizatori, obținuți de alte grupuri de cercetare prin atașarea covalentă a TvL pe matrice de criogel [348], pe electrod de grafit [349] sau pe particule de poli(stiren-co-aceto-acetoxietil metacrilat) și analogii acestora cu maghemit la suprafață [350], biocatalizatorii obținuți în acest studiu au fost stabili pe un interval mai larg de pH (4-7).

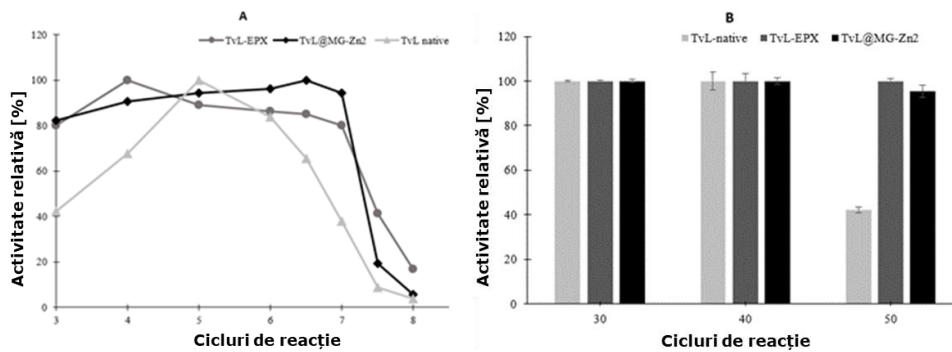


Figura 73 Profilul de pH (A) și influența temperaturii asupra activității (B) a lacazei din *Trametes versicolor*, nativă (TvL-native) sau imobilizate pe suport epoximetacrilat (TvL-EPX) și pe suport magnetic funcționalizat cu 3-NH₂-PrTMOs (TvL@MG-Zn₂).

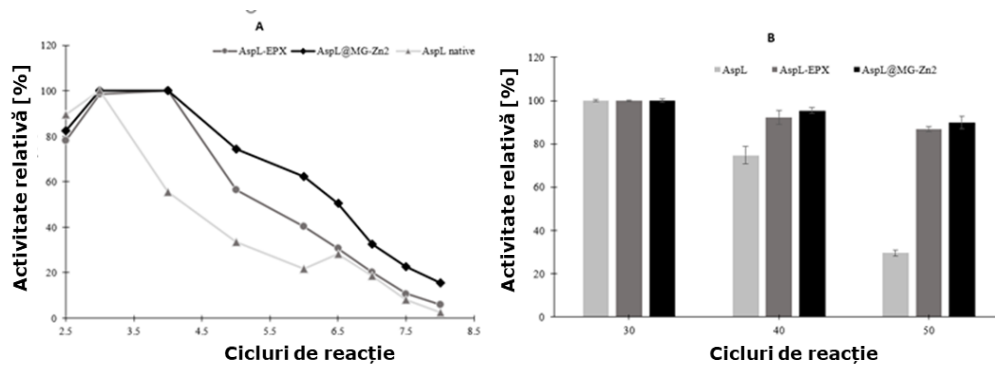


Figura 74 Profilul de pH (A) și efectul temperaturii asupra activității (B) a lacazei *Aspergillus* sp., native (AspLnative) sau imobilizate pe suport epoximetacrilat (AspL-EPX) și pe suport magnetic AspL@MG-Zn2 funcționalizat cu grupări 3-NH₂-PrTEOS

Efectul temperaturii a fost evaluat asupra activității lacazelor din TvL și AspL native și imobilizate prin legare covalentă pe suport de metacrilat funcționalizat cu grupări epoxi-butil, respectiv pe suport magnetic funcționalizat cu 3-aminopropiltrimetoxisilan, în intervalul de temperatură de la 30°C la 50°C (Figura 73B, Figura 74B). Pentru lacazele native activitatea a scăzut semnificativ la temperaturi mai mari de 40°C. Comparativ cu enzima nativă, ambele preparate enzimatic imobilizate au demonstrat o stabilitate termică excelentă chiar și la temperatura de 50°C, în special lacaza din TvL imobilizată pe suport de metacrilat funcționalizat cu grupări epoxi-butil.

2.6.8 Stabilitatea operațională a lacazelor imobilizate în cicluri de reacție consecutive

Stabilitatea operațională a tuturor celor 18 preparate imobilizate de lacază a fost studiată în cicluri consecutive de reacție discontinue ale substratului model 2,6-dimetilfenol. Rezultatele sunt prezentate în Figura 75 (A) pentru preparatele ApsL și în Figura 75 (B) pentru preparatele TvL. În general, stabilitatea în ciclurile de reacție consecutive ale lacazelor imobilizate a fost dependentă de suportul de imobilizare.

Pentru AspL imobilizat pe suporturi magnetice (Figura 75A și Figura 76), activitatea a scăzut dramatic (> 90%) după primul ciclu de reacție, în special când 3-NH₂-PrTEOS a fost utilizat pentru funcționalizarea suportului. Aceste rezultate sugerează că, deși activitatea după imobilizare a fost mai mare în comparație cu probele funcționalizate de 3-NH₂-PrTMOS, stabilitatea în ciclurile de reacție consecutive a fost mai mică. Dintre biocatalizatorii obținuți prin imobilizare pe rășini metacrilice, preparatul obținut prin utilizarea suportului funcționalizat cu grupări epoxibutil (Figura 75B) a fost cel mai stabil, păstrând peste 60% din activitatea inițială după 6 cicluri de reacție.

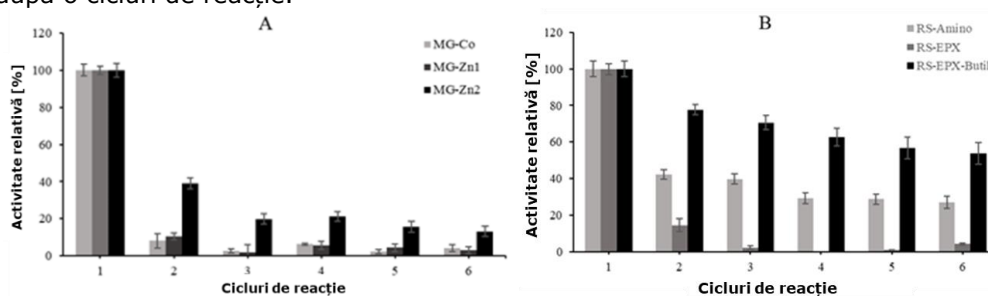


Figura 75 Stabilitatea operațională a lacazei din ApsL, imobilizate prin legare covalentă pe (A) microparticule magnetice funcționalizate cu 3-NH₂-PrTMOS; (B) pe rășini metacrilice Lifetech™ funcționalizate cu amino (RS-Amino), epoxi (RS-EPX) și epoxi-butil (RS-EPX-Butil). Activitatea din primul ciclu a fost considerată ca referință.

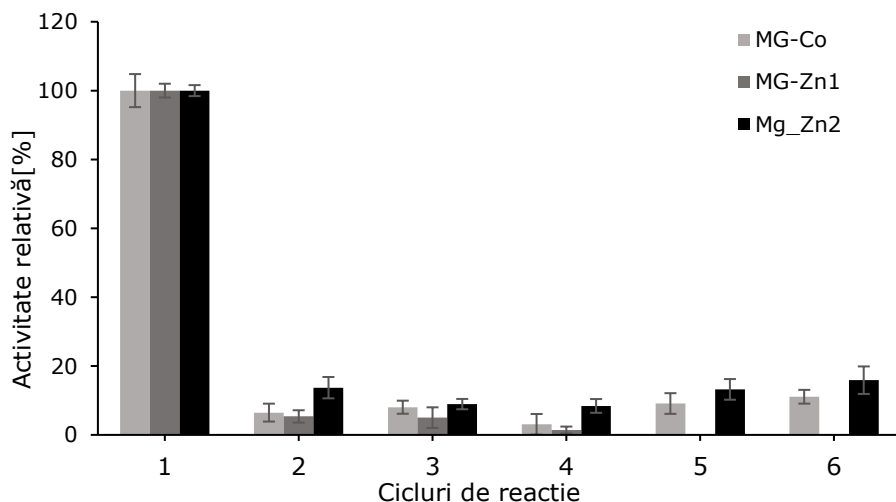


Figura 76 Stabilitatea operațională a lacazei din ApsL immobilizate pe nanoparticule magnetice funcționalizate cu 3-NH₂-PrTEOS

Pentru TvL immobilizată pe suporturi magnetice, cele mai bune rezultate s-au obținut atunci când s-a folosit pentru funcționalizare 3-aminopropiltrimetoxisilan (Figura 77 A), scăderea activității după primul ciclu de reacție a fost mai mică, indiferent de tipul suportului magnetic. În special în cazul biocatalizatorului MG-Zn2, menținerea a peste 47% din activitatea inițială după cinci cicluri de reacție poate fi apreciată ca o bună stabilitate operațională. În Figura 78 sunt prezentate rezultatele obținute atunci când 3-NH₂-PrTEOS a fost utilizat pentru funcționalizare. Stabilitatea operațională a preparatelor obținute prin immobilizare pe suporturi metacrilice funcționalizate cu grupări epoxidice și amino a fost puțin mai scăzută comparativ cu preparatele obținute cu lacază AspL iar dintre preparatele obținute prin immobilizare pe rășini metacrilice cea pe rășini epoxibutil a fost cea mai stabilă.

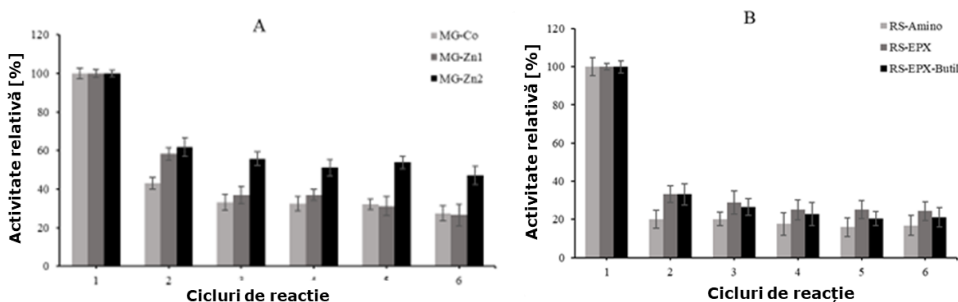


Figura 77 Stabilitatea operațională a preparatelor din TvL immobilizate prin legare covalentă pe (A) microparticule magnetice funcționalizate cu 3-NH₂-PrTMOS; (B) pe rășini metacrilice Lifetech™ funcționalizate cu grupări amino (RS-Amino), epoxi (RS-EPX) și butil-epoxi (RS-EPX-Butil). Activitatea din primul ciclu a fost considerată ca referință.

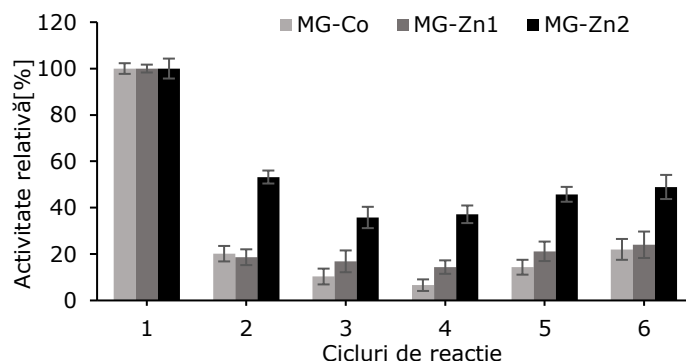


Figura 78 Stabilitatea operațională a preparatelor din TvL imobilizate pe nanoparticule magnetice funcționalizate cu 3-NH₂-PrTEOS

Rezultatele obținute în timpul evaluării stabilității operaționale au indicat o scădere semnificativă a activității după primul ciclu de reacție pentru toate preparatele imobilizate obținute prin formare de baze Schiff, probabil din cauza instabilității legăturii iminice la pH-ul ușor acid de 5. În consecință, s-a realizat o reducere a acestei dublei legături prin utilizarea ca agent de reducere a NaBH₄. Pe această cale, bazele Schiff sunt convertite în grupări amino secundare [351].

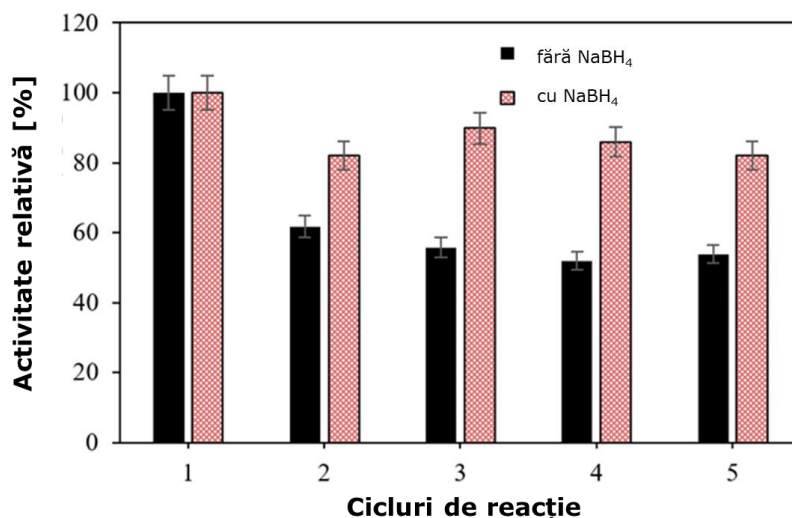


Figura 79 Stabilitatea operațională a preparatelor din TvL imobilizate pe microparticule magnetice funcționalizate cu 3-NH₂-PrTMOS fără treaptă de reducere și după reducere cu NaBH₄; 2,6-DMP a fost utilizat ca substrat.

Rezultatele arată că după 5 cicluri de reacție consecutive (Figura 79) peste 80% din activitatea inițială a fost recuperată pentru preparatele obținute prin reducere cu borohidru de sodiu. Această valoare este mai mare decât reutilizabilitatea raportată recent de Wang și colab. pentru aceeași lacază imobilizată pe un biosuport modificat din paie de orez (aproximativ 50% după 5 cicluri) și comparabilă cu alte rapoarte [352]. Considerând lacaza imobilizată pe același tip de suport, stabilitatea

operațională a fost cu cel puțin 20% mai mică fără treapta de reducere. Prin urmare, biocatalizatorul magnetic obținut prin reducerea cu borohidruură a fost utilizat în continuare pentru caracterizarea fizică și studiul oxidării glicerolului.

2.6.9 Caracterizarea lacazelor imobilizate

Compozițiile chimice în zona de suprafață ale celui mai performant biocatalizator, TvL@MG-Zn₂, au fost investigate în urma imobilizării și reducerii cu NaBH₄ după o singură utilizare și după 5 reutilizări, prin spectroscopie fotoelectronică cu raze X (XPS). Suportul inițial de imobilizare înainte de funcționalizare, MG-Zn₂, cât și o probă de ferită magnetică Ni_{0.7}Zn_{0.3}Fe₂O₄, au fost folosite ca referință. Spectrele XPS ale particulei magnetice și ale enzimei imobilizate pe particule magnetice sunt prezentate în Figura 80.

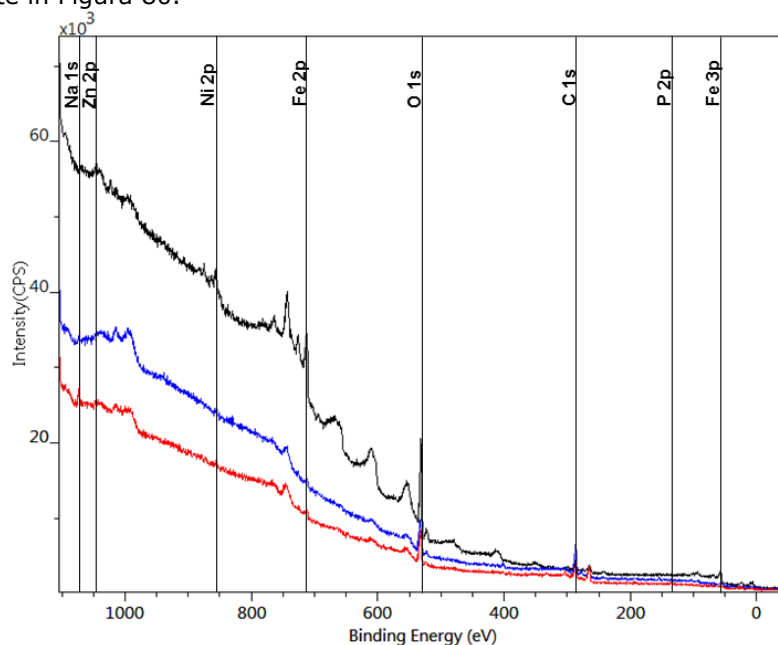


Figura 80 Spectrele suprapuse XPS ale particulei magnetice MG-Zn₂ (negru), lacazei imobilizate după o singură utilizare TvL@MG-Zn₂ (albastru) și lacazei imobilizate după 5 reutilizări TvL@MG-Zn₂-RT (roșu).

Pentru determinarea cantităților de metal tranzițional, s-au folosit pic-urile de metal 2_{p3/2} (Figura 81). În cazul picului 2_{p3/2} al fierului, s-a luat în considerare diviziunea multiplu pe baza metodei descrise anterior [353]. Cantitățile de nichel și zinc au fost determinate pe baza integrării regiunilor corespunzătoare. Conform rezultatelor XPS, compoziția de suprafață a particulelor de ferită este practic identică cu valoarea proiectată experimental.

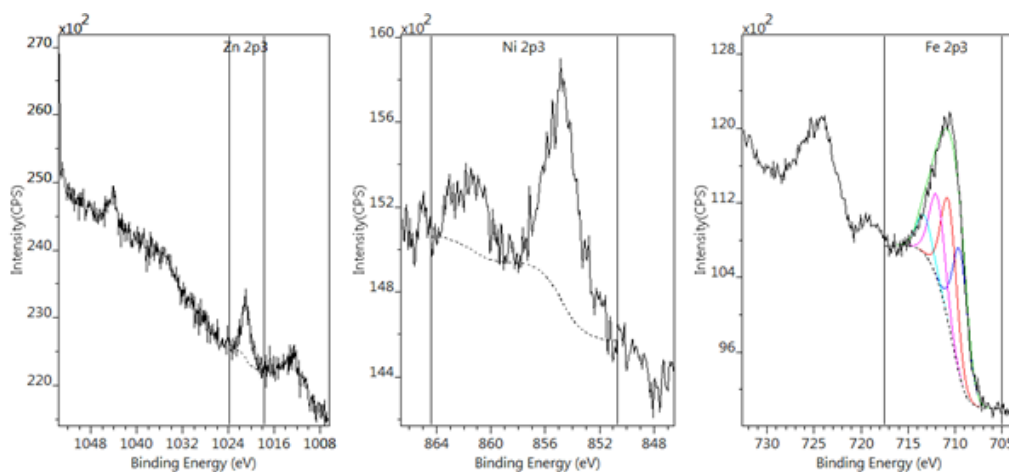


Figura 81 Spectrele Zn 2p, Ni 2p și Fe 2p ale probei MG-Zn2.

După imobilizarea lacazei pe suprafața particulelor magnetice, fierul era încă detectabil prin analiză XPS într-o cantitate redusă. Pe suprafața inițială MG-Zn2, fierul a fost prezent în 17 % atomice, care în cazul probelor acoperite cu enzimă a scăzut la 3 % atomice. După imobilizarea enzimei, nichelul și zincul nu au putut fi detectate pe suprafețele particulelor. Siliciul din agentul de funcționalizare NH₂-TMOS sau NH₂-TEOS nu a putut fi detectat nici pe suprafețele TvL@MG-Zn2 și nici pe TvL@MG-Zn2-RT prin intermediul XPS. Prezența Na și P (12,1% și respectiv 5,5%) pe suprafețele probei acoperite cu enzimă a fost și poate fi atribuită soluției tampon utilizate pentru reacții și etapelor de spălare.

În cazul probei de MG-Zn2, oxigenul de pe suprafață a fost găsit sub formă de oxid (BE 529,7 eV) și hidroxid (BE 531,204 eV) (Figura 82). Prezența grupărilor hidroxil este avantajoasă, deoarece acestea activează suprafața și favorizează aderența acoperirii. În proba TvL@MG-Zn2, deplasarea chimică a oxigenului se referă la forma originală de oxid și, în plus, la grupările carbonil (BE ≈ 530,4 eV) și hidroxil (BE ≈ 532,0 eV) ale fragmentului de enzimă imobilizat. În proba TvL@MG-Zn2-RT, după mai multe utilizări ale MP-urilor acoperite cu enzima în reacții catalitice, compușii carboxilici au apărut în probă cu o deplasare chimică crescută a liniei O 1s (BE ≈ 533,0 eV).

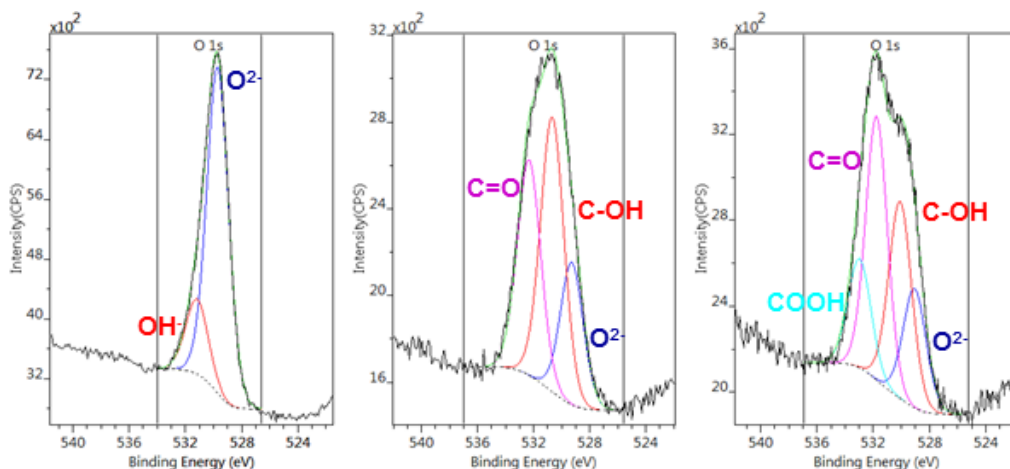


Figura 82 Spectrele Oxigen 1s ale probelor MG-Zn2 (A), TvL@MG-Zn2 (B) și TvL@MG-Zn2-RT (C)

Aceeași tendință poate fi observată și din spectrele carbonului 1 (Figura 83). În proba de MG-Zn2, numai hidrocarburile contaminante apar pe spectrul C 1s. În TvL@MG-Zn2, sunt prezente și două vârfuri de carbon oxidat care pot fi atribuite ca grupări carbonil (BE \approx 287,3 eV) și hidroxil (BE \approx 285,5 eV) ale enzimei. În TvL@MG-Zn2-RT, se poate observa și carbonul cu deplasare chimică mare (se poate presupune că este vorba de grupări carboxil).

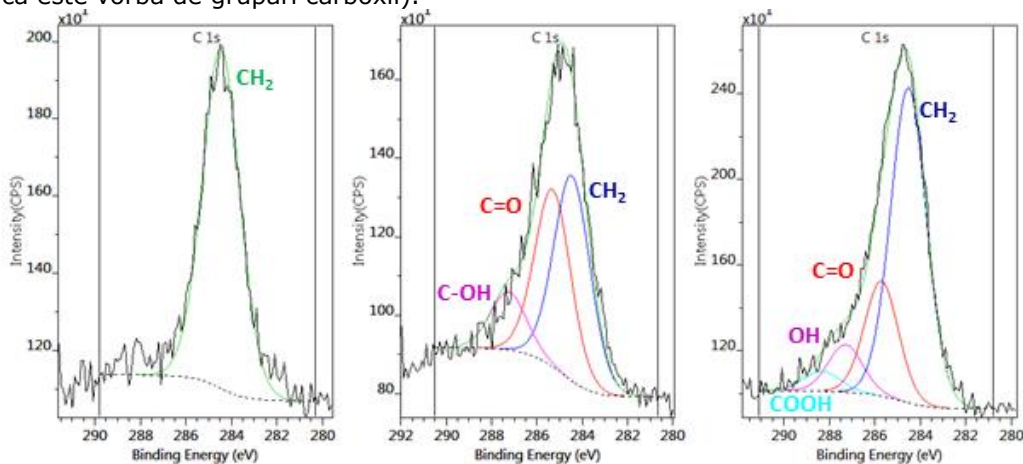


Figura 83 Spectrele Carbon 1s ale probelor MG-Zn2 (A), TvL@MG-Zn2 (B) și TvL@MG-Zn2-RT (C)

Pe suprafața probelor de enzime imobilizate, azotul poate fi găsit în proporție de 3 până la 6 % atomice, ceea ce se datorează conținutului de azot al enzimei. Spectrele de azot 1s ale probelor acoperite cu enzimă sunt prezentate în Figura 84.

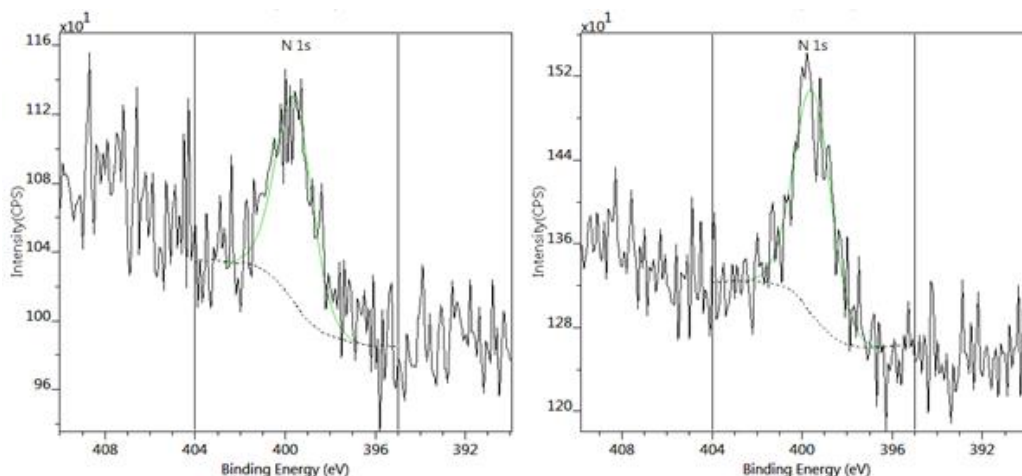


Figura 84 Spectrele de azot 1s ale probelor TvL@MG-Zn2 (A) și TvL@MG-Zn2-RT (B).

Grosimea stratului de enzimă pe suprafață pentru probele TvL@MG-Zn2 (A) și TvL@MG-Zn2-RT a fost calculată folosind software-ul XPS Multiquant. Metoda Tanuma-Powell-Penn și modelul straturi pe sferă a oferit cea mai bună concordanță cu datele experimentale. Presupunând acoperirea completă a suprafeței, grosimea stratului de enzimă poate fi estimată la 3-4 nm.

Imaginile SEM ale MG-Zn corespunzătoare particulelor magnetice înainte (Figura 85A) și după imobilizarea TvL (Figura 85B) cât și cele obținute după utilizarea TvL@MG-Zn2-RT în 5 cicluri de reacție, indică o morfologie similară a particulelor. Schimbări prea mari nu erau de așteptat, deoarece stratul de lacază gros de doar câțiva nanometri evaluat din calculele XPS nu afectează microstructura particulelor. Cu toate acestea, o concluzie importantă este că utilizarea pe termen lung a biocatalizatorului, în cicluri repetate de reacție (Figura 85C), nu a afectat morfologia suprafeței, prin urmare stabilitatea fizică este ridicată și reprezintă fundamentul unei bune stabilități operaționale.

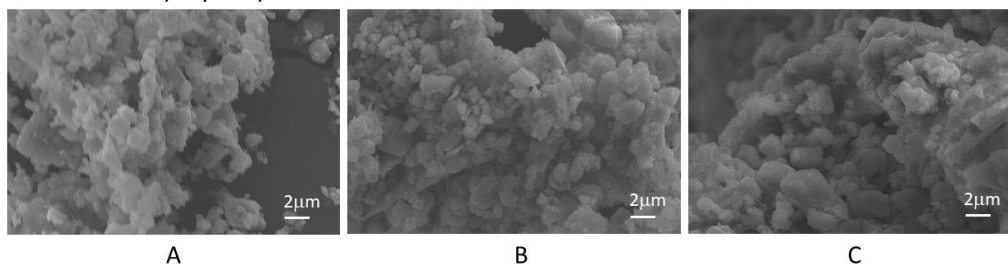


Figura 85 Imaginile SEM ale suportului MG-Zn înainte de imobilizare (A), după imobilizarea TvL pe particule magnetice MG-Zn2 folosind 3NH2-TMOS și NaBH₄ (TvL@MG-Zn2) (B) și după 5 reutilizări ale TvL@MG-Zn2-RT (C), la 10000x magnitudine.

2.6.10 Oxidarea glicerolului folosind lacazele imobilizate

Pentru reacția de oxidare a glicerolului au fost utilizate cele mai eficiente preparate de lacază TvL imobilizate pe suportul magnetic de ferită Ni-Zn (TvL@MG-Zn₂), respectiv pe rășină metacrilică cu grupare epoxi-butil. Reacțiile au fost efectuate la 50°C conform metodei descrise în secțiunea experimentală, folosind TEMPO ca inițiator.

Rezultatele (Figura 86) arată creșterea conversiei în primele 72 de ore. În comparație cu enzima nativă, la cea imobilizată se constată o scădere a eficienței biocatalizatorului, care se poate datora accesului limitat la substrat la situsul catalitic al enzimei din cauza legăturii covalente sau din cauza unei posibile instabilități termice pe termen lung a preparatelor.

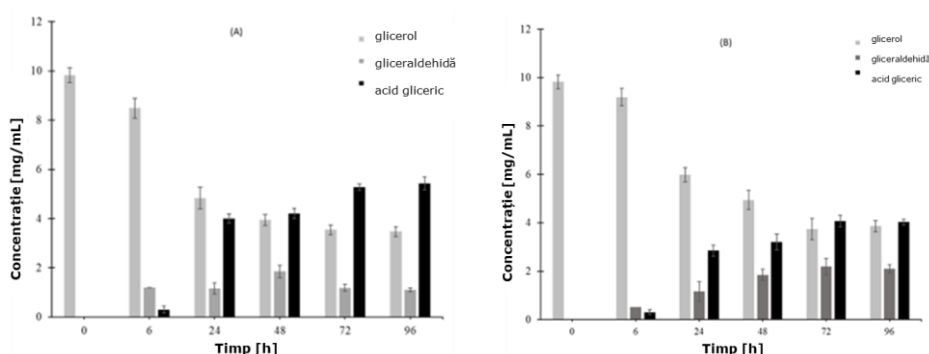


Figura 86 Concentrațiile glicerolului, gliceralhidei și acidului gliceric în timp, la oxidarea glicerolului în prezența lacazei din *T. versicolor* imobilizate pe suport magnetic de ferită Ni-Zn (TvL@MG-Zn₂) (A) și pe rășină metacrilică funcționalizată cu grupări epoxi-butil (RS-EPX-Butil) (B), la 50°C, utilizând 20 mg mL⁻¹ enzimă imobilizată.

Selectivitatea enzimei față de acidul gliceric ca produs principal de oxidare nu se modifică în urma procesului de imobilizare, în comparație cu lacaza nativă (Figura 69), însă biocatalizatorul imobilizat beneficiază de toate avantajele binecunoscute, în special posibilitatea de reutilizare. În Tabelul 23 este prezentată o comparație a principalelor rezultate raportate anterior pentru oxidarea glicerolului catalizată de lacaze imobilizate covalent, comparativ cu rezultatele obținute în acest studiu. Deși o conversie de 50% nu pare un randament foarte mare, ea reprezintă un rezultat excelent în comparație cu alte raportări și având în vedere multitudinea de produși de oxidare posibili, deschizând calea pentru îmbunătățirea ulterioară și extinderea procesului.

Tabelul 23 Comparația conversiilor glicerolului în acid gliceric, raportate în literatură și în lucrarea de față, prin oxidare catalizată de lacaze imobilizate covalent și folosind TEMPO ca inițiator, în diferite condiții experimentale, la timp de reacție de 24 de ore

Lacază	Suport	Condiții oxidare pH/ T[°C]	Conversia [%]	Referința
<i>Aspergillus sp.</i>	FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA	4.5/ 25	<2	[354]
	FAU/Cu ²⁺ /APTMS/GA	4.5/ 25	<5	[354]

<i>P. ostreatus</i>	Alumina	4.5/ 25	10	[335]
<i>T. hirsuta</i>	Alumina	4.5/ 25	8	[355]
<i>T. versicolor</i>	Rășina metacrilică	4/50	39	În acest studiu
	Suporturi magnetice	6.5/50	51	În acest studiu

Conversia biocatalitică eficientă a glicerolului în acid gliceric este dificilă, datorită căii de reacție complexe și a diferiților produși secundari de oxidare care pot fi de asemenea sintetizați, precum și datorită celor doi enantiomeri ai acidului gliceric. După cum se arată în Tabelul 23, prin utilizarea unor lacaze imobilizate covalent de diferite proveniențe au fost obținute randamente de numai până la 10%, în timp ce folosind lacaza din *T. versicolor* legată covalent s-a ajuns la un randament mai mare, 39% [308]. Rezultatele noastre demonstrează că prin selectarea adecvată a suporturilor și parametrilor de imobilizare randamentul de acid gliceric poate fi crescut până la 50%, iar biocatalizatorul își păstrează activitatea și selectivitatea pe mai multe cicluri de reacție discontinue. Acidul gliceric este un dihidroxiacid cu aplicații foarte promițătoare, de ex. ca monomer bioplastic [356]. Deși poate fi obținut și prin fermentație microbiană [357], oxidarea biocatalitică ar putea reprezenta o alternativă mai bună datorită randamentelor mai mari care pot fi obținute și evitării eventualelor dezavantaje ale unui proces de fermentație.

Acidul gliceric are o serie de utilizări foarte promițătoare, atât în forma racemică cât și ca enantiomeri puri. Majoritatea aplicațiilor, de ex. ca monomer bioplastic [356] sau materie primă pentru surfactanții verzi, cum ar fi monoacil gliceridele [358], diacil gliceridele [359] și alți compuși funcționali înrudiți [360] au fost indicate pentru acidul D-gliceric, probabil datorită sintezei preferențiale a acestui enantiomer prin fermentație microbiană [357]. Conversia microbiană a glicerolului în acid gliceric a condus la acid (R)-2,3-dihidroxipropanoic (acid D-gliceric) cu excese enantiomerice între 70-99%, în funcție de tulpina microbiană utilizată [361]. Producția de acid L-gliceric, un intermediar important pentru sinteza de L-hexoze enantiomeric pure, a fost realizată prin degradarea microbiană enantiospecifică a acidului D-gliceric dintr-un amestec racemic [362]. Chiar dacă procesul de oxidare enzimatică nu este enantioselectiv, majoritatea acestor aplicații, cum ar fi pentru agenți tensioactivi sau monomeri bioplastici, nu necesită utilizarea unui anumit enantiomer și pot fi realizate și cu acid D,L-gliceric. Prin urmare, oxidarea biocatalitică poate reprezenta o alternativă durabilă datorită randamentelor mari care pot fi atinse și avantajului de a evita posibilele dezavantaje ale unui proces de fermentație, de exemplu, productivitatea limitată și procesul de prelucrare mai dificil.

2.6.11 Stabilitatea operațională a lacazei TvL@MG-Zn2 imobilizate în cicluri repetitive de oxidare a glicerolului

Performanțele biocatalizatorului selectat au fost evaluate în mai multe cicluri de reacție pentru oxidarea glicerolului. Fiecare ciclu de reacție a fost efectuat timp de 72 de ore și rezultatele sunt prezentate în Figura 87 ca procentaj față de valoarea inițială. După 5 cicluri de reacție a fost regăsită aproximativ 46% din activitatea inițială. Scăderea activității poate fi atribuită duratei lungi de incubare a biocatalizatorului în timpul fiecărui ciclu de reacție.

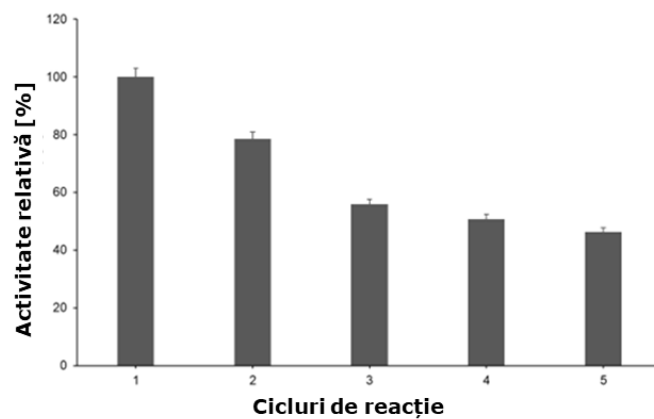


Figura 87 Stabilitatea operațională a lacazei din *Trametes versicolor* immobilizată pe suport magnetic de ferită Ni-Zn funcționalizată cu 3-NH₂-PrTMOS (TvL@MG-Zn₂) și redusă cu NaBH₄, în reacția de oxidare a glicerolului

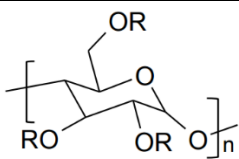
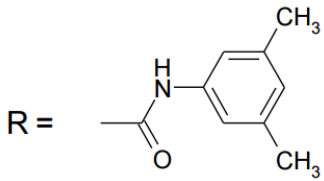
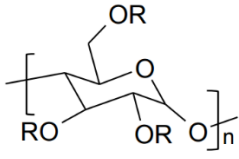
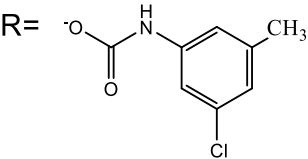
2.7. Evaluarea enantioselectivității lipazei din *Ps. stutzeri* pentru rezoluția cinetică a unui cetoalcool secundar heterociclic

Datorită importanței lor în sinteza unor precursori cu activitate antitumorală, separarea enantiomerilor derivaților de 2,2'-furoin prezintă un interes ridicat. Până în prezent lipazele și-au dovedit superioritatea în rezolvarea diversilor racemați.

2.7.1 Optimizarea metodei de analiză a 2,2'-furoinului prin cromatografie chirală de lichide de înaltă performanță.

Pentru analiza 2,2'-furoinului și al derivaților acestuia a fost necesară optimizarea metodei de analiză prin cromatografie de lichide chirale. În acest sens au fost testate două coloane chirale (Tabelul 24) pe bază de amiloză substituită recomandate de producători pentru separarea compușilor chirali.

Tabelul 24 Faze staționare chirale utilizate pentru separarea enantiomerilor derivaților de furoin

Tipul Coloanei	Tipul zaharului grefat pe silice	Structura substituentului R
Chiralpak IA Tris(3,5-Dimetilfenilcarbammat) amiloză		$R =$ 
Phenomenex Lux® 5μm i-Amylose-3 Tris(3-cloro-5-metilfenilcarbammat) amiloză		$R =$ 

În prima etapă a fost testată coloana Chiralpak IA și faza mobilă acetonitril. Din Figura 88 se poate observa prezența a două peak-uri la aproximativ $t_{R1} = 7,2$ min și $t_{R2} = 7,9$ min, dar rezoluția a fost considerată nesatisfăcătoare.

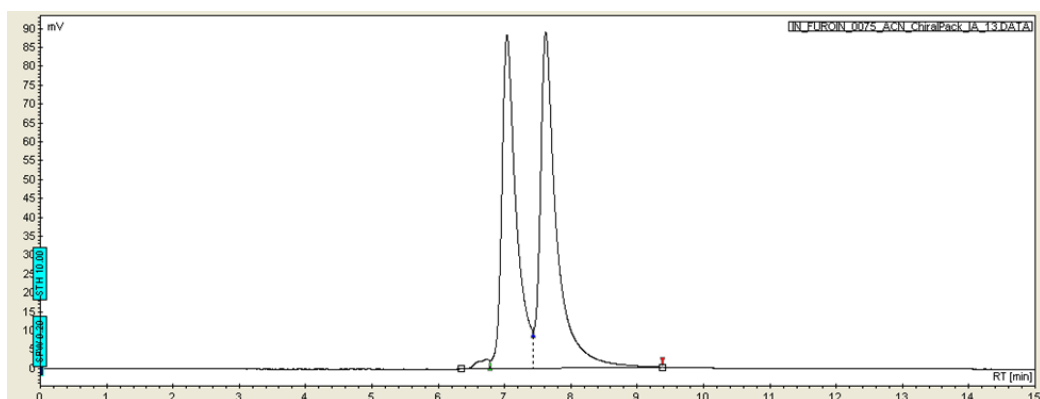


Figura 88 Cromatograma obținută în urma analizei 2,2'-furoinului utilizând coloana Chiralpak IA și acetonitril ca fază mobilă, debit 0,5 ml/min

A doua coloană testată a fost Phenomenex Lux® 5μm i-Amylose-3, iar cromatograma rezultată este prezentată în Figura 89. Se poate observa prezența a două picuri cromatografice individuale la $t_{R1}=7,65$ min și $t_{R2}=8,80$ min, bine separate.

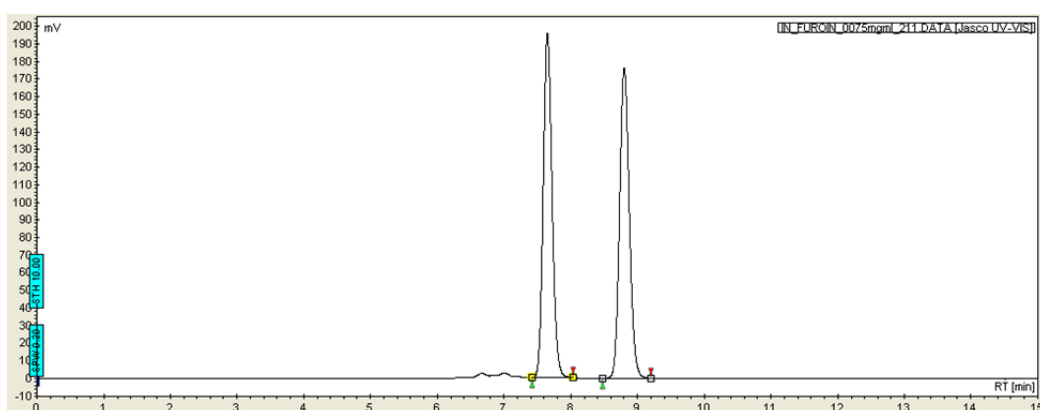


Figura 89 Cromatograma obținută în urma analizei 2,2'-furoinului utilizând coloana Phenomenex Lux® 5μm i-Amylose-3 și acetonitril ca fază mobilă debit 0,5 ml/min.

Pe baza rezultatelor obținute separarea celor 2 enantiomeri ai 2,2'-furoinului a fost favorizată când s-a utilizat coloana Phenomenex Lux® 5μm i-Amylose-3. Drept consecință, în studiile ulterioare analizele cromatografice a 2,2'-furoinului și a derivaților acestuia s-au realizat în următoarele condiții: coloana Phenomenex Lux® 5μm i-Amylose-3, debit 0,5 ml/min, temperatura 25°C, solvent acetonitril.

2.7.2 Influența mediului de reacție asupra reacției de acilare enantioselectivă

Deoarece este cunoscut faptul că mediul de reacție poate influența semnificativ reacțiile enzimice, a fost determinată inițial solubilitatea 2,2'-furoinului în 10 solvenți organici cu valori diferite ale polarității, exprimate prin coeficientul de partiție $\log P$ în care lipazele prezintă activitate de esterificare și transesterificare, conform datelor de literatură. Testele de solubilitate s-au efectuat în tuburi de reacție Eppendorf de 2 mL, cu 20 mg 2,2'-furoin și 1000 μL solvent. Probele au fost incubate 2h la 50°C, 1000 rpm, iar evaluarea solubilității s-a realizat vizual. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 25.

Tabelul 25 Solubilitatea 2,2'-furoinului (20 mg mL⁻¹) în diferiți solvenți organici

Nr. crt.	Solvent	Solubilitate	Log P *[88]
1.	Acetonitril	+++	- 0,33
2.	Tetrahidrofuran	+++	0,22
3.	2-Metil-tetrahidrofuran	+++	1,08
4.	Acetonă	+++	- 0,23
5.	<i>t</i> -Butanol	-	0,35
6.	Metil- <i>tert</i> -butileter	-	1,06
7.	Diisopropileter	-	1,52
8.	Toluen	-	2,11
9.	Ciclohexan	-	3,44
10.	<i>n</i> -Hexan	-	4,11

Reacțiile de acilare selectivă s-au realizat la 50°C, 1000 rpm timp de 24h în cei 4 solvenți în care 2,2'-furoinul a fost solubil, respectiv acetonitril, tetrahidrofuran, 2-metil-tetrahidrofuran (2-MeTHF) și acetonă.

Schema de reacție propusă și studiată în cadrul acestei lucrări este prezentată în Figura 90.

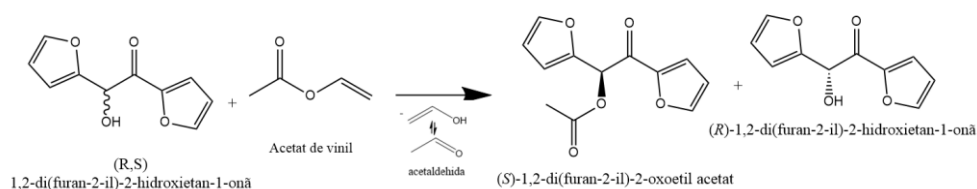


Figura 90 Schema de acilare enantioselectivă a 2,2'-furoinului (1,2-di(furan-2-il)-2-hidroxiestan-1-onă) cu acetat de vinil catalizată de lipaze.

Cromatogramele suprapuse ale amestecurilor de reacție obținute în cei 4 solvenți (Figura 91) au indicat o enantioselectivitate superioară în cazul 2-MeTHF în comparație cu ceilalți 3 solvenți testați.

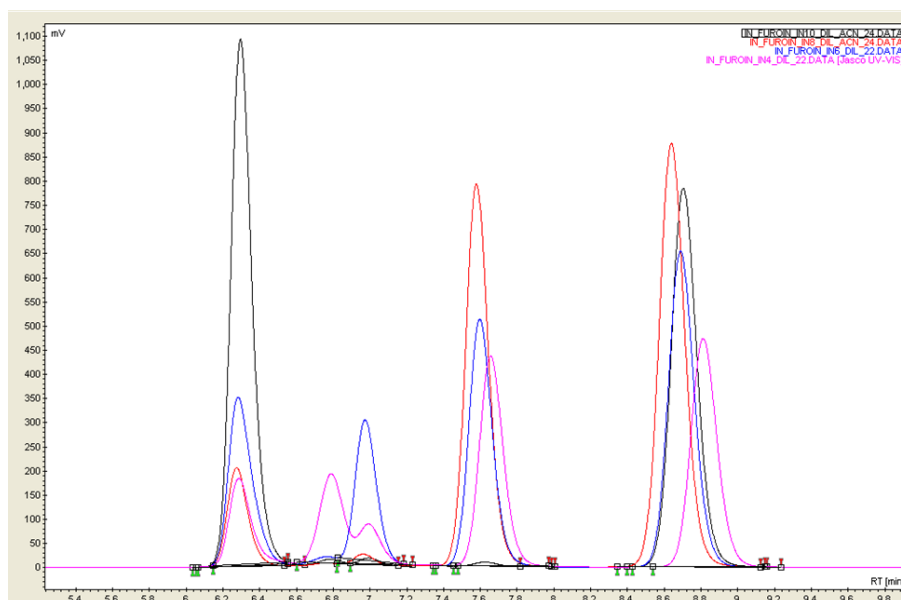


Figura 91 Cromatogramele amestecurilor de reacție obținute în diferiți solvenți: ■ Tetrahidrofuran, ■ Acetonitril, ■ Acetonă, ■ 2-Metil Tetrahidrofuran

Au fost calculate și conversiile după 24h de reacție, care sunt prezentate în Figura 92. Se poate observa că cea mai ridicată conversie a fost obținută la utilizarea ca mediu de reacție a 2-metil tetrahidrofuranului, urmat de acetonitril. Luând în considerare aceste rezultate, în studiile ulterioare ca mediu de reacție a fost utilizat 2-metil-tetrahidrofuranul.

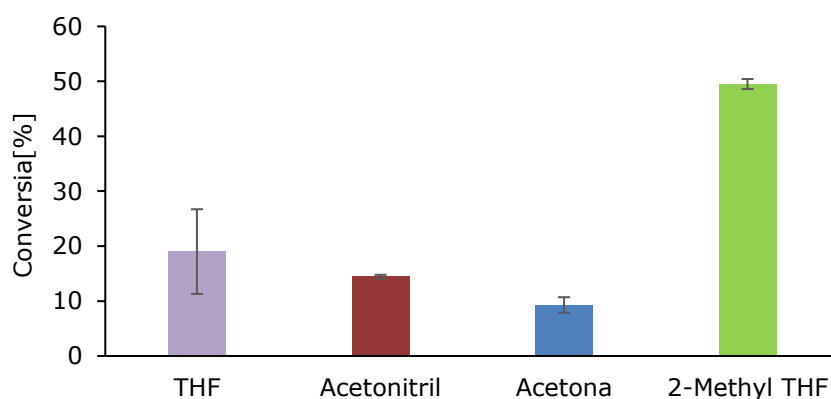


Figura 92 Influența mediului de reacție asupra conversiei în reacția de acilare a 2,2`-furoinului cu acetat de vinil

2.7.2 Studiul reacției de acilare în timp utilizând lipaza din *Ps. stuzeri* nativă

În rezoluția cinetică enzimatică viteza de reacție cu care sunt transformați cei doi enantiomeri este diferită, iar pentru lipazele (*R*)-selective enantiomerul (*R*) reacționează mai rapid, urmat de o transformare lentă sau în cazurile ideale netransformarea enantiomerului *S*-a studiat evoluția în timp a reacției de acilare a 2,2'-furoinului în intervalul de timp 2-24 h, iar valorile calculate pentru conversie și excesul enantiomeric al substratului netransformat ee_s sunt reprezentate în Figura 93. Rezultatele indică o creștere mai accelerată a conversiei până la 40% în primele 4h de reacție, urmată de o creștere mult mai lentă în continuare, după 24 de ore fiind atinsă o conversie de 49,04% (aproxiată de cea de 50%, maxim posibilă teoretic într-un proces de rezoluție cinetică obișnuită), asociată cu un exces enantiomeric ridicat, de 96,23 %.

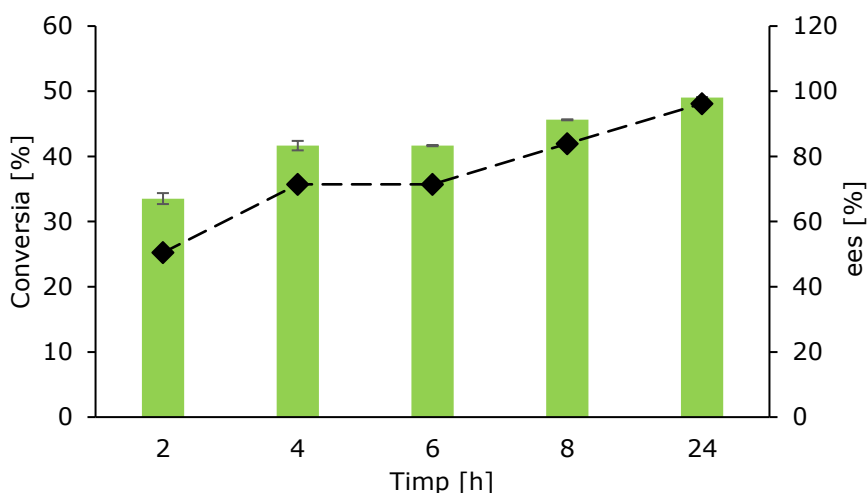


Figura 93 Influența timpului de reacție asupra conversiei și excesului enantiomeric în reacția de acilare a 2,2'-furoinului în prezența lipazei native din *Ps. stuzeri*

2.7.3 Influența naturii și imobilizării biocatalizatorului asupra reacției de acilare enantioselectivă

Scopul acestui studiu a fost de a selecta lipaza nativă/imobilizată cea mai eficientă pentru acilarea enantioselectivă a 2,2'-furoinului. Conform rezultatelor raportate în literatura de specialitate pentru separarea enantioselectivă a alcoolilor secundari cu diferiți heterocicli în moleculă, lipazele din *Candida antarctica* [363] [364] s-au dovedit foarte eficiente, valorile ee depășind 99%. Cu toate acestea, în cazul 2,2'-furoinului lipaza din *Pseudomonas stuzeri* nativă s-a dovedit mai eficientă [318]. Având la bază aceste rezultate și prezumția că prin imobilizare activitatea și selectivitatea se pot modifica, pentru selecția biocatalizatorului cel mai eficient au fost investigate ambele aceste lipaze, lipaza din *Candida antarctica* B și lipaza din *Pseudomonas stuzeri*, care au fost imobilizate prin entrapare în matrici de sol-gel

conform metodei 3.22 utilizând amestecuri binare sau ternare de silani precursori. Reacțiile au fost efectuate conform metodei prezentate în secțiunea 3.24 iar valorile conversiilor, conținutului de enantiomer R și S, cât și a excesului enantiomeric au fost determinate pe baza analizelor HPLC.

În cazul lipazei din *Candida antarctica* B, au fost testate enzima nativă și două preparate imobilizate, preparatul comercial Novozyme 435 și un preparat obținut prin entrapare în sol-gel combinat cu adsorbție utilizând un sistem binari de silani OcTMOS:TMOS și Celita 545. Valorile conversiilor au fost mai mici de 1% pentru enzima nativă și pentru preparatul obținut prin entrapare în matrici de sol-gel (Tabelul 26), în timp ce Novozyme 435 (Tabelul 26) s-a dovedit mai eficient, indicând pentru această reacție o superioritate a metodei de imobilizare prin adsorbție pe rășină metacrilică comparativ cu entraparea în sol-gel, dar conversia nu a depășit valoarea de 40%.

A doua lipază studiată a fost cea din *Pseudomonas stutzeri*, sub formă imobilizată în matrici de sol-gel. Au fost testate 5 preparate obținute prin entrapare în sol gel în Laboratorul de Biocataliză din Timișoara, utilizând diferiți silani precursori în diferite rapoarte molare, iar rezultatele sunt prezentate în Tabelul 26. Cele mai eficiente preparate enzimatic, care au dus la conversii mai mari de 49% și exces enantiomeric eeP >95% s-au obținut în cazul preparatelor 5PS și 15 PS. În cazul preparatului 5 PS când s-a utilizat pentru imobilizare un silan cu grupări epoxidice în sistem binar cu TMOS, valorile conversiei și ale ee_P au fost ușor mai ridicate, dar totuși comparabile cu preparatul obținut prin utilizarea unui sistem ternar de silani. Dintre preparatele obținute cu amestecuri binare de silani (Tabelul 26), preparatul în care s-au utilizat silanii TMOS în combinație cu silanul OcTMOS s-a dovedit superior preparatului în care s-a utilizat silanul PrTMOS.

Tabelul 26 Influenta biocatalizatorului asupra reacției de acilare a 2,2'-furoinului cu acetat de vinil în 2-metil tetrahidrofuran la 50°C, 1000 rpm, 24h.

Nr. crt	Enzima	Metoda imobilizare	Suport	Raport	Conversie [%]	S [%]	R [%]	eeP [%]
1.	GF CalB	nativa	-	-	0.16	18.07	81.93	0.00
2.	3GF	entrapare	OcTMOS:TMOS + Celita	1:1	0.15	12.03	87.97	0.15
3.	N435	adsorbție	Rășină metacrilică	-	26.14	32.24	67.76	35.52
4.	<i>Ps. Stutzeri</i>	nativa	-	-	49.50	99.01	0.99	98.01
5.	1PS	entrapare	OcTMOS:TMOS+Celita	1:1	19.50	92.90	7.10	85.81
6.	10PS	entrapare	OcTMOS:TMOS	1:1	30.94	27.04	72.96	45.92
7.	5PS	entrapare	3GOPrTMOS:TMOS	1:1	49.90	0.19	99.81	99.61

8.	8PS	entrapare	PrTMO S:TMO S	1:1	5.30	80.43	19.57	60.87
9.	15PS	entrapare	PhTMO S:VTM OS:TM OS	1.6:0. 4:1	49.14	1.70	98.30	96.61

2.7.4 Studiul reutilizării preparatului imobilizat 5PS în reacția de acilare

Principalul scop al imobilizării enzimelor este acela de a obține preparate care să poată fi separate cu ușurință din amestecurile de reacție și reutilizate, reducându-se astfel costurile mai ales în procesele continue.

În cadrul acestui studiu s-a urmărit stabilitatea operațională a preparatului 5PS imobilizat cu lipază de *Ps. stutzeri* în cicluri repetate de utilizare în regim discontinuu în reacția de acilare a 2,2'-furoinului. După fiecare reutilizare preparatul a fost recuperat prin centrifugare și spălat (2-metil tetrahidrofuran). Conversia substratului și excesul enantiomeric au fost determinate pe baza analizelor HPLC și calculate conform ecuației prezentate în secțiunea 3.25 (Tabelul 26).

Rezultatele prezentate în Figura 94 indică faptul că după prima utilizare apare o scădere mai pronunțată a activității preparatului enzimatic, dar după ciclul al doilea de reacție activitatea a scăzut mai puțin. După cele 5 cicluri de reacție 43% din activitatea inițială, exprimată prin valoarea conversiei, a fost regăsită. În comparație cu alte preparate care au fost testate pe substraturi mai accesibile pentru lipaze, stabilitatea operațională în cicluri succesive de reacție a preparatului considerat este destul de modestă, dar în studiile ulterioare se vor lua în considerare și alte strategii pentru creșterea stabilității operaționale (de ex. utilizarea unor aditivi specifici la imobilizare sau includerea unei etape de rehidratare a preparatului enzimatic).

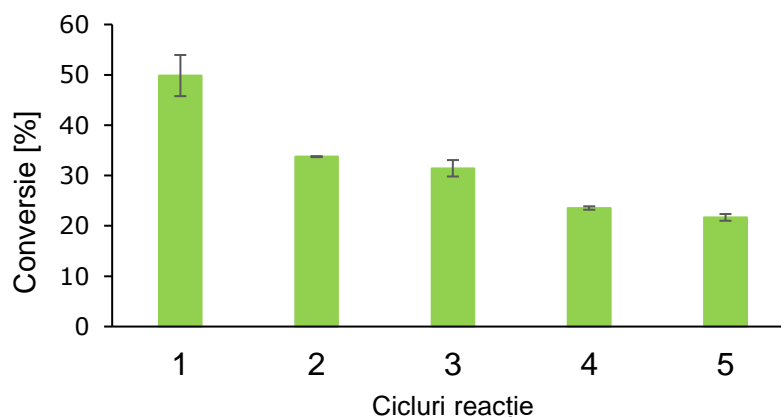


Figura 94 Studiul reutilizării preparatului imobilizat de *Ps. stutzeri* în reacția de acilare enantioselectivă a 2,2'-furoinului

3 Partea experimentală

3.1. Materiale

Lacazele din *Trametes versicolor*, *Myceliophthora thermophila* (exprimat în *Aspergillus* sp. Novozyme 51003), *Rhus vernicifera*, *Agaricus bisporus*, lipaza din *Candida antarctica* B imobilizată pe rășină acrilică (Novozyme 435), albumina serică de bovină, glicerol, (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il) oxil (TEMPO) 98% , acid 3-hidroxiantranilic 97%, 1-hidroxibenzotriazol 97%, N-hidroxiftalimidă 97%, acid boric, acid citric, fosfat trisodic, fosfat disodic, fosfat monosodic, acetat de sodiu anhidru și 25% soluție de glutaraldehidă, [OmimBF₄], fluorură de sodiu, alcool izopropilic 99,7%, au fost achiziționate de la Sigma Aldrich, Germania. Reactiv Bradford, 2,6-dimetilfenol (DMP), acid violuric monohidrat, tetrametoxisilan [TMOS] 98%, octiltrimetoxisilan [OcTMOS], și propiltrimetoxisilan [PrTMOS] au fost furnizați de Alfa Aesar (Karlsruhe, Germania). 3-Aminopropil-trimetoxisilan, 3-aminopropil-trietoxisilan și 3-glicidoxipropil-trimetoxisilan [3GOPrTMOS] au fost cumpărate de la Gelest (Morrisville, PA, SUA). Metanol, etanol, propanol, izopropanol, acid acetic, acid tartronic, acid glicolic, acetat de etil, acid acetic glacial, acid sulfuric, piridină 99%, 2,2'-furoin și acetat de vinil, acetonă, acetonitril, tetrahidrofuran, 2-metil tetrahidrofuran, viniltrimetoxisilan [VTMOS], feniltrimetoxisilan (PhTMOS) 99%, soluție tampon TRIS-HCl tris-(hidroximetil)-aminoetan, n-hexan, acidul ricinoleic (RCA) și acidul 5-hidroximetil-2-furoic (HFA) au fost achiziționate de la Merck, Germania.

Suporturile de tip Epoxi/butil/metacrilat, abreviat ca RS-EPX-Butil (Lifetech™ ECR8285), epoxi/metacrilat, abreviat ca RS-EPX (Lifetech™ ECR8204F) și Amino C2 Metacrilat, abreviat ca RS-Amino (Lifetech™ ECR8309F), cu dimensiuni ale particulelor în intervalul 250-1000 μm, au fost donate cu amabilitate de Purolite Life Sciences Ltd. (Llantrisant, Marea Britanie). Feritele mixte de tip Ni-Zn și Ni-Co-Zn utilizate ca suporturi pentru imobilizarea covalentă a lacazelor au fost obținute în cadrul Institute of Materials and Environmental Chemistry, Research Centre for Natural Sciences din Budapesta (Ungaria). Lipaza din *Candida antarctica* B nativă și imobilizată (GenoFocus, Republica Coreea) și lipaza TL din *Pseudomonas stutzeri* (Meito-Sangyo, Japonia) au fost donate de companiile producătoare.

Alcoolul izopropilic 99,7% cât și o serie de solvenți și reactivi de uz comun au provenit de la Chimopar (București, România) și au fost de puritate analitică, iar uleiul de ricin a provenit de la Herbavit (România)

3.2. Polimerizare fără solvenți

S-au omogenizat 20 mg HFA și 42 mg RCA, apoi s-au adăugat 50 U/mmol substrat de lipază nativă/imobilizată. Reacțiile au fost efectuate în tuburi Eppendorf de 2 ml, în intervalul de temperatură 40-80°C la 1000 rpm, folosind un agitator de încălzire de tip Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Germania). La sfârșitul timpului de reacție prevăzut, probele au fost dizolvate în 3 ml tetrahidrofuran și enzima imobilizată a fost îndepărtată prin filtrare. Produsul a fost obținut prin evaporarea solventului și uscare peste noapte sub vid la 60°C.

3.3. Sinteza enzimatică a copolimerilor în reacție de tip cascadă

Sinteza copolimerilor într-un sistem de tip cascadă a fost efectuată inițial folosind ulei de ricin și HFA ca materii prime, în raport molar de 5:1 ulei:HFA, în prezența lipazei native din *Pseudomonas stutzeri*. O cantitate corespunzătoare de apă a fost adăugată în sistemul de reacție la un raport molar final apă:triricinoleină 1,2:1, pentru a facilita hidroliza triricinoleinei în etapa inițială a reacției. Reacțiile au fost efectuate la 50°C într-un balon cu fund rotund conectat la un evaporator rotativ (Heidolph Laborota 4000 Efficient, Germania), timp de 3 ore la presiunea atmosferică, după care presiunea a fost scăzută la 100 mbar și menținută la un timp total de reacție de 48 h. La sfârșitul reacției, amestecul a fost extras de 3 ori cu tetrahidrofuran, iar enzima a fost separată prin filtrare. Pentru a îndepărta solvenții, amestecul a fost lăsat 48 de ore la 30°C, într-un cuptor cu vid.

Optimizarea procesului prin proiectare experimentală a fost realizată folosind aceeași metodologie de sinteză. Producții rezultate au fost analizate prin cromatografie cu permeație pe gel și prin spectrometrie de masă MALDI-TOF.

3.4. Analiza structurală a produșilor de reacție

Producții de reacție au fost analizate prin spectrometrie de masă MALDI-TOF, realizată cu un spectrometru de masă Bruker Autoflex Speed (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germania), echipat cu un analizor de masă cu time-of-flight (TOF) așa cum a fost descris de Todea și colab [99]. În toate cazurile s-au aplicat 21 kV și 9,55 kV ca tensiune reflectorului 1 și respectiv tensiunea reflectorului 2. Matricea utilizată a fost trans-2-[3-(4-t-butil-fenil)-2-metil-2-propeniliden] malononitril (DCTB) și trifluoracetat de sodiu pentru probele obținute pornind de la RCA și HFA și reactiv de ionizare trifluoracetat de sodiu (NaTFA) pentru probele derivate din sistemul în cascadă. Calibrarea sistemului a fost realizată cu soluții de polietilen glicol (PEG) de 600, 1000 și 2000 Da. S-au amestecat 10 μL de probă (10 mg/mL) cu 10 μL de soluție DCTB (40 mg/mL) și 3 μL de soluție NaTFA (5 mg/mL). Aproximativ 1 μL din acest amestec a fost depus pe probă și spectrele MS au fost obținute în modul ion pozitiv. Spectrele MS au fost procesate și evaluate, folosind pachetele software FlexControl și FlexAnalysis de la Bruker (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germania).

Spectrele în infraroșu cu transformată Fourier (ATR FT-IR) au fost înregistrate utilizând un spectrometru Bruker Vertex 70 (Bruker Daltonik GmbH, Germania) echipat cu un ATR cu platină, Bruker Diamond Type A225 / Q.I. Au fost efectuate 128 de scanări în intervalul 4000-400 cm⁻¹, cu o rezoluție de 4 cm⁻¹.

Spectrele RMN au fost înregistrate pe un spectrometru Bruker Avance III care funcționează la 500 MHz (¹H) și 125 MHz (¹³C). Probele au fost dizolvate în THF-d₈, iar deplasările chimice δ sunt date în ppm, în raport cu TMS.

3.5. Cromatografia cu permeație pe gel

Amestecurile de reacție au fost analizate folosind un sistem Agilent System HPLC 1260 INFINITY II (Agilent Technology, Germania) care include o pompă cuaternară G7111B, un termostat de coloană și un detector de indice de refracție RID WR G7162A, echipat cu două coloane HPLC în serie (produse Phenomenex, SUA), o coloană Phenogel 5 μm 100 Å 300 x 7,8 mm (limită 500-6000 Da) și o coloană Phenogel 5 μm 10 Å 300 x 7,8 mm (limită 1000-15000 g mol⁻¹). Compușii au fost eluați folosind tetrahidrofuran ca fază mobilă, la un debit de 1 mL/min și 30°C, timpul

de rulare fiind stabilit la 15 min. OpenLab CDS Workstation Software a fost folosit pentru vizualizarea cromatogramelor. Masele moleculare medii au fost evaluate printr-o curbă de calibrare trasată folosind standarde de calibrare din polistiren (Agilent, SUA), în intervalul 580-7600 g mol⁻¹. Conversiile (%) au fost calculate pe baza curbei de calibrare a HFA.

3.6. Analiză termică

Comportamentul termic al produșilor de reacție sintetizați și al materiilor prime (ca referință) a fost caracterizat prin analiză termogravimetrică (TG) și calorimetrie cu scanare diferențială (DSC). Măsurătorile TG au fost realizate folosind un sistem de analiză termogravimetrică TG 209 F1 Libra (Netzsch, Germania), în atmosferă de azot, în intervalul de temperatură 20°C-500°C, cu o viteză de încălzire de 10K/min. Au fost determinate ulterior temperaturile la 5, 10 și 50% pierdere de masă (TD5 și TD50). Analizele DSC au fost efectuate folosind calorimetrul de scanare diferențială DSC 204 F1 Phoenix (Netzsch, Germania), în atmosferă de azot, în intervalul de temperatură 25°C-500°C, cu o viteză de încălzire de 10K/min.

3.7. Sinteza oligoesterilor acidului adipic

S-au omogenizat 131 μL DMA și și cantitatea corespunzătoare de dioli pentru a avea un raport molar final 1:1. Apoi s-au adăugat 50 U/mmol substrat lipază imobilizată. Reacțiile au fost efectuate în baloane cu fund rotund de 10 ml, la 3 valori ale temperaturii 50, 75 și 80°C la 100 rpm, folosind un rotavapor Heildorph cu sau fără vid. După 24h, probele au fost dizolvate în 3 mL tetrahidrofuran și enzima imobilizată a fost îndepărtată prin filtrare. Produsul a fost obținut prin evaporarea și uscare solventului peste noapte sub vid la 40°C.

3.8. Studii de biodegradare

Studiile de biodegradare ale oligoesterilor și materiilor prime au fost efectuate în conformitate cu măsurătorile protoalelor OCDE 306 și sistemul OxiTop® echipat cu unități de măsură (sticle brune (510 ml) și unități de măsurare cu autoverificare), o platformă de agitare inductivă și magnetică și agitatoare magnetice. În fiecare sticlă s-a adăugat 327,5 mL de soluție de sare (preparată în conformitate cu OECD 306); 1 mL de DMSO sau probă dizolvată în DMSO și 36,5 mL de apă de mare (inocul) pentru a ajunge la o concentrație finală de 100 mg/L. Măsurătorile BOD au fost efectuate la 21±1 °C. BOD și Dt (biodegradabilitatea) au fost calculate așa cum a fost raportat anterior de către Borowicz și colab [365].

3.9. Obținerea unor organogeluri utilizând solvenți organici

O cantitate de oligoesteri/hidroxiacizi grași (30 mg) și 1 mL de solvent organic au fost introduse într-o sticlă de 2 mL. Soluția a fost încălzită în etuvă la 70°C, 20 min, timp în care oligoesterul/hidroxiacidul a fost dizolvat. Soluția a fost ulterior răcită la temperatura camerei, iar recipientul a fost inversat pentru a evalua formarea gelului.

3.10. Prepararea particulelor magnetice

Pulberile policristaline de Ni_{0.4}Co_{0.2}Zn_{0.4}Fe₂O₄ (MG-Co), Ni_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ (MG-Zn1) și Ni_{0.7}Zn_{0.3}Fe₂O₄ (MG-Zn2) au fost preparate printr-un protocol de coprecipitare

chimică, descris anterior [366]. S-au folosit precursori de calitate analitică ai $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ și $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ pentru sinteză, toți achiziționați de la VWR International (Radnor, PA., SUA). Pulberile precipitate au fost uscate la 105°C și apoi calcinate la 1000°C timp de 2 ore. Dimensiunea pulberilor obținute a variat de la 1 la 10 μm (datele nu sunt prezentate), așa cum a fost determinată de analizorul de dimensiunea particulelor cu laser (HORIBA LA 950 A2, HORIBA Scientific, Japonia).

3.11. Imobilizarea lacazelor

Toate experimentele de imobilizare și biocataliză au fost efectuate cu un agitator cu încălzire, Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg, Germania).

- pe particule magnetice activate

Lacazele din *Trametes versicolor* și *Aspergillus* sp. au fost imobilizate prin legarea covalentă pe particule magnetice, care au fost anterior funcționalizate prin utilizarea 3-aminopropil-trimetoxisilan (NH_2 -TMOS) sau 3-aminopropil-trietoxisilan (NH_2 -TEOS) și activate cu glutaraldehidă, așa cum s-a descris anterior [324].

- pe suporturi de polimetacrilat funcționalizate cu grupări amino

Lacazele selectate au fost imobilizate prin legarea covalentă pe suporturi funcționalizate amino, utilizând metodologia descrisă anterior [324]. Activarea suporturilor a fost efectuată utilizând 1 ml de soluție de glutaraldehidă 5%, urmată de incubare de 3 ore la 25°C și 1000 rpm. Suporturile activate au fost spălate în continuare de două ori cu tampon de cuplare pH 6,00 și s-a adăugat 1 ml de soluție de lacază. Imobilizarea a fost efectuată la 25°C și 1000 rpm timp de 24 de ore. Supernatantul a fost îndepărtat și enzima imobilizată a fost spălată de două ori cu tampon de cuplare pH 6,00 și o dată cu tampon de spălare pH 7,40 (0,01 M Tris Base care conține 0,15 M NaCl, 0,1% (g/v) albumină serică bovină, 0,001 M EDTA, sare de sodiu și azidă de sodiu 0,1 % (g/v)).

- pe suporturi de polimetacrilat funcționalizate cu grupări epoxi

1 ml soluție de enzimă ($0,75^{-3}$ mg ml^{-1}) în tampon fosfat 50 mM pH 7 a fost adăugat la 25 mg rășină epoxi-butil metacrilat, așa cum a fost descris anterior de Todea și colab. [324]. Amestecul a fost incubat la 1000 rpm, 24 h, la 25°C . Granulele au fost îndepărtate din amestec prin filtrare, spălate (așa cum este descris în secțiunea anterioară) și apoi păstrate la 4°C până la utilizare ulterioară.

3.12. Determinarea activității pentru enzimele native și imobilizate

Testele de activitate au fost efectuate folosind 2,6-dimetilfenol (2,6-DMP) ca substrat [367]. În cuve de 2 mL 250 μL 2,6-DMP 4 mM, 750 μL tampon acetat de sodiu pH 5, 100 mM și 100 μL soluție de lacază (*Trametes versicolor* 1 mg mL^{-1} , *Aspergillus* sp. 4,5 mg mL^{-1} , *Rhus vernicifera* 1 mg mL^{-1} , *Agaricus bisporus* 1 mg mL^{-1}) au fost adăugate și incubate la 1000 rpm. O unitate de activitate a enzimei, 1 U ($\mu\text{mol min}^{-1}$), a fost definită drept cantitatea de enzimă care catalizează conversia unui micromol de 2,6-DMP pe minut la pH 5, 25°C . Activitatea specifică (exprimată în

U g⁻¹) a fost calculată pe baza modificării densității optice ca efect al oxidării catalizate de enzime, folosind ecuația:

$$\text{Activitatea specifică} = (A \times 1,000)/(27,5 \times \text{Timp} \times M_{\text{enzimă}}) \quad \text{U g}^{-1} \quad (1)$$

unde: A – absorbanța măsurată la 469 nm; coeficientul molar de extincție al 2,6-DMP - 27,5 [mM⁻¹ cm⁻¹], timp - timp de reacție [min]; M_{enzimă} - cantitatea de biocatalizator utilizată în reacție [g].

Reacția a fost efectuată la pH 5, 25°C, timp de 4 min și în acest interval modificarea concentrației DMP a fost liniară, permițând calcularea activităților prin ecuația (1). Toate experimentele au fost efectuate în trei exemplare.

3.13. Obținerea modelelor tridimensionale ale lacazelor

Modelele lacazelor au fost realizate utilizând structura cristalină disponibilă pe PDB [39] *Trametes versicolor* (cod pdb 1GYC), așa cum a fost revizuit și de Hakulinen și Rouvinen [368] și *Myceliophthora thermophila* (cod pdb 6F5K) folosind o strategie de construire a omologiei pentru lacazele de la *Rhus vernicifera* și *Agaricus bisporus*, deoarece structurile cristaline ale acestor lacaze nu erau disponibile. Modelele de omologie au fost generate automat prin utilizarea SWISS-MODEL așa cum a fost descris anterior de Wang și colab. [369] pentru *Agaricus bisporus* și prin utilizarea secvenței FASTA raportată de Durante și colab. [370]. Vizualizările structurii proteinelor au fost efectuate utilizând software-ul PyMol [43]. Reziduurile de lizină de la suprafață sunt evidențiate folosind sfere verzi.

3.14. Profilurile pH ale enzimelor native și imobilizate

Efectul pH-ului asupra activității lacazelor native și imobilizate a fost evaluat în intervalul de pH 3-8, utilizând o soluție tampon de pH cu gamă largă care conține acid citric, acid boric și fosfat trisodic [371]. Testele de activitate au fost efectuate așa cum este descris în secțiunile anterioare.

3.15. Profilele de temperatură ale enzimelor native și imobilizate

Incubarea lacazelor native/imobilizate a fost efectuată timp de 2 ore în absența substratului la diferite temperaturi, în intervalul 30-50°C, urmată de răcire pe gheață timp de 10 minute. Activitatea reziduală a enzimelor a fost determinată așa cum este descris în secțiunea anterioară.

3.16. Reutilizarea lacazelor imobilizate

S-au adăugat 750 μL soluție tampon acetat de sodiu pH 5 100 mM și 250 μL 2 mM soluție 2,6-DMP la 10 mg preparat de enzimă imobilizată. Reacția a fost efectuată timp de 4 minute la 1000 rpm și 25°C. Probele au fost centrifugate timp de 10 minute la 6000 rpm și 25°C. Această procedură a fost repetată de 5 ori, măsurând absorbanta la 469 nm după fiecare ciclu.

3.17. Oxidarea enzimatică a glicerolului

Pentru oxidarea enzimatică a glicerolului, patru lacaze disponibile comercial din diferite surse microbiene, *Trametes versicolor* (11114,93 U_{2,6DMP}*mg⁻¹),

Aspergillus sp (874,26 U_{2,6DMP}*g⁻¹), *Rhus vernicifera* (1661,88 U_{2,6DMP}* mg⁻¹) și *Agaricus bisporus* (1494,64 U_{2,6DMP}*mg⁻¹) au fost testate. Reacțiile de oxidare au fost efectuate folosind 100 mM glicerol, 30 mM TEMPO la pH-ul optim al fiecărei enzime, 10U/mL enzimă la 25 °C, probele au fost centrifugate la 1000 rpm fiind colectate după 3, 6, 12, 24, 48, 72 și 96 de ore. S-a barbotat suplimentar O₂ în vasul de reacție la intervale de 24 de ore. Enzimele imobilizate au fost adăugate (50 mg mL⁻¹) la 100 mM glicerol la pH 4 pentru lacaza de la *T. versicolor* imobilizată pe rășină metacrilică și la pH 6,5 pentru lacaza de la *T. versicolor* imobilizată pe particule magnetice. Reacțiile au fost efectuate la 50°C, 1000 rpm până la 96 ore. Consumul de glicerol și formarea produselor de reacție au fost observate cu ajutorul cromatografiei lichidă de înaltă performanță, folosind un sistem Agilent HPLC 1260 INFINITY II, echipat cu o pompă cuaternară G7111B, detectoare DAD WR G7116A și RID WR G7162A și un termostat coloană (Agilent Technology), Germania). Procesarea cromatogramei a fost realizată utilizând software-ul OpenLab CDS Workstation. Condiții de analiză: coloană HPLC Luna Omega 5 μm Polar C18 100 Å 250 x 4,6 mm; fază mobilă: apă distilată acidulată cu 0,01% 98% H₂SO₄ (soluția a fost filtrată și degazată timp de 20 de minute); debit fază mobilă: 0,3 ml/min; temperatura 30°C. Timpuri de retenție în condițiile de analiză date: acid mezoxalic (t_R= 8,262 min), gliceraldehidă (t_R= 9,258 min), glicerol (t_R= 10,056 min), acid tartronic (t_R= 9,567 min) și acid gliceric (t_R= 10,686 min) (Figura 68A). Analiza cantitativă a fost efectuată pe baza curbilor de calibrare pentru toți compușii menționați.

3.18. Caracterizarea clusterilor magnetici funcționalizați prin spectroscopie de fotoelectroni cu raze X (XPS)

Analizele XPS au fost efectuate pe un instrument Kratos XSAM 800 folosind radiația de excitație Mg Ka_{1,2} (1253,6 eV) în modul de transmisie fix al analizorului la temperatura camerei. Presiunea camerei de analiză a fost <10⁻⁷ Pa. Spectrele au fost colectate la energie de trecere de 40 eV. Spectrele au fost corectate de încărcare folosind la C1s (C-C, C-H) BE setat la 284,5 eV. Spectrele măsurate au fost procesate folosind software-ul Vision Processing. Fondul Shirley și forma Lorentzian-Gauss a liniilor de fotoemisie (cu 30 % din contribuția lorentziană) au fost utilizate pentru date. Compozițiile la suprafață au fost calculate prin software-ul XPS Multiquant [372].

3.19. Analiza morfologiei suprafeței prin microscopie electronică de baleiaj

Examinarea morfologiei de suprafață a particulelor uscate s-a realizat folosind un microscop electronic cu scanare EVO 40 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germania) la o tensiune de accelerație de 20 kV. În toate cazurile, au fost dobândiți electroni secundari (SE), iar distanța de lucru (WD) a fost de 7,5 mm.

3.20. Optimizarea metodei de analiză HPLC chirală a enantiomerilor 2,2'-furoinului

Pentru analiza HPLC a 2,2'-furoinului s-au testat 2 coloane chirale și diferite faze mobile formate din acetonitril și alcool, la 272 nm. Componentele sistemului cromatografic au fost: pompă cuaternară de tip Jasco PU-2089, autosampler de tip Jasco AS-2055 Plus, detector UV-vis UV-2070 Plus (Jasco Inc., Japonia). Proba, de concentrație aproximativ 0.2 mg/mL a fost solubilizată în acetonitril și analizată în sistem izocratic.

Pe baza ariilor determinate în urma analizelor s-a calculat excesul enantiomeric

$$\text{conform relației: } \text{ees}\% = \left[\frac{(\%S - \%R)}{(\%S + \%R)} \right] * 100$$

Analiza cantitativă și implicit determinarea conversiei substratului și a excesului enantiomeric a impus trasarea unei drepte de etalonare. În acest sens au fost preparate 5 soluții în domeniul de concentrație 0,001- 0,01 mg/mL iar probele au fost analizate prin metoda HPLC anterior optimizată. În Figura 95 sunt prezentate cromatogramele suprapuse obținute în urma analizelor standardelor de 2,2`-furoin care indică și o reproductibilitate superioară a metodei de analiză.

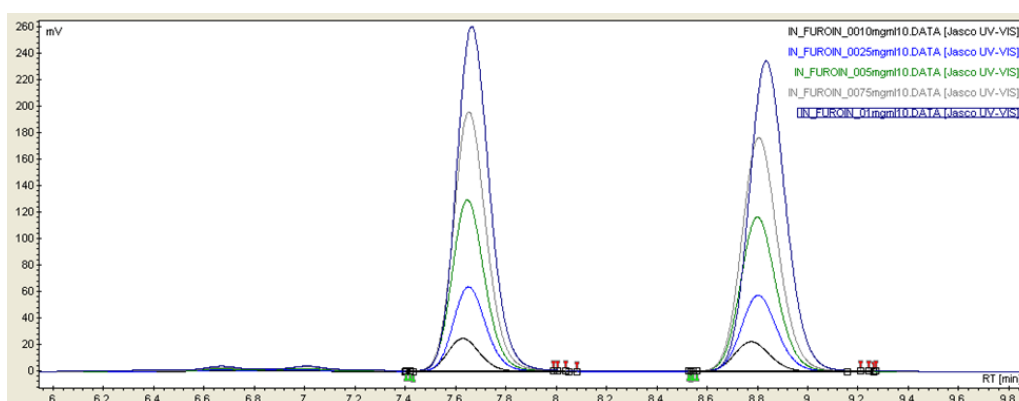


Figura 95 Cromatogramele suprapuse ale standardelor de 2,2`-furoin

Pe baza ariilor obținute pentru fiecare probă a fost trasată dreapta de etalonare (Figura 96) iar coeficientul de corelare al dreptei de etalonare R^2 obținut a fost 0,9926, fiind confirmată astfel liniaritatea acesteia.

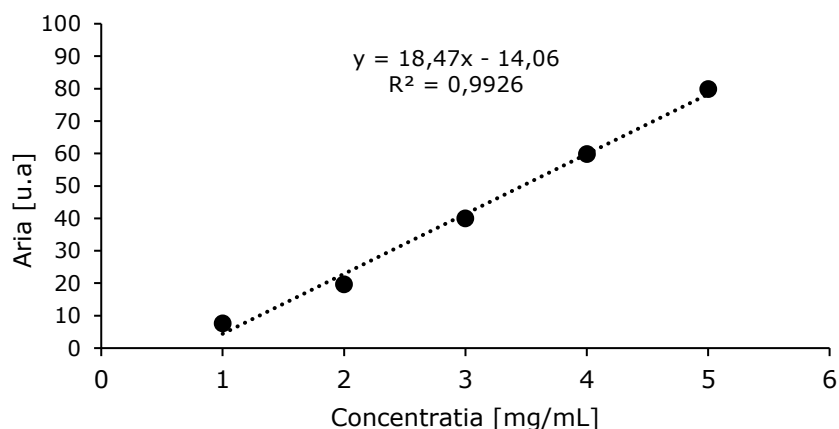


Figura 96 Dreapta de etalonare pentru 2,2'-furoin

3.22. Imobilizarea lipazelor prin metoda sol-gel

S-a preparat o soluție de lipază (120 mg/ml tampon TRIS-HCl de pH=8,0), s-a lăsat la agitare (600 rpm) timp de 30 minute, după care soluția rezultată a fost centrifugată (la 15°C și 6000 rpm timp de 10 min), iar supernatantul a fost folosit pentru imobilizare.

După centrifugare, o cantitate de 1 mL din supernatant s-a introdus într-o fiolă de sticlă împreună cu 200 μ L [Omim]BF₄, 100 μ L NaF și 200 μ L alcool izopropilic. Amestecul rezultat s-a menținut 30 minute pe agitatorul magnetic pentru omogenizare, după care s-au introdus precursorii silanici (6 mmoli) în diferite rapoarte molare, cu menținerea agitării până la gelifiere. Au fost preparate în total 6 preparate enzimatic.

Gelul obținut a fost păstrat la temperatura camerei timp de 24 de ore, pentru o polimerizare completă. Preparatele obținute au fost menținute 24 de ore la temperatura camerei pentru o gelifiere completă și a doua zi s-au spalat cu 7 mL izopropanol, 5 mL apă, 5 mL izopropanol și 5 mL n-hexan, filtrându-se pe frită. Preparatul enzimatic obținut s-a uscat la temperatura camerei 24 de ore și la etuva de vid timp de 24 ore.

Pentru determinarea conținutului de proteine s-a utilizat reactiv Bradford preparat folosind Coomassie Brilliant Blue G-250 (BioRad), acid o-fosforic 85% (Merck), iar pentru obținerea dreptei de etalonare s-a utilizat albumină serică bovină (BSA), (Sigma Aldrich).

3.23. Influența mediului de reacție asupra reacției de acilare

În reacțiile de acilare enantioselectivă mediul de reacție are un efect foarte important. Au fost testați 4 solvenți: acetonă, acetonitril, tetrahidrofuran, 2-metil tetrahidrofuran. Reacțiile au fost efectuate utilizând o concentrație de substrat de 0,1M, la 50°C, 1000 rpm timp de 24h, utilizând aproximativ 10 mg lipază nativă respectiv 40 mg lipază entrapată în matrici de sol-gel. La sfârșitul reacției enzima a fost separată prin centrifugare la 10000 rpm, 5 min iar solventul a fost evaporat la 45°C în etuva cu vid 24h. Pentru analiză probele au fost reconstituite în acetonitril și analizate conform metodei 3.21.

3.24. Studiul reacției de acilare a 2,2'-furoinului în timp

În cadrul acestui studiu s-a urmărit influența timpului de reacție asupra activității lipazei native din *Pseudomonas stutzeri* în reacția de acilare. S-au cântărit 10 mg preparat peste care s-a adăugat 1 mL soluție de 2,2'-furoin 0,1M și acetat de vinil 0,3M solubilizate în 2-metil tetrahidrofuran. Reacțiile s-au efectuat la 50°C, 1000 rpm, fiind colectate probe după 2, 4, 6, 8 și 24h. La finalul reacției enzima fost separată prin centrifugare la 10000 rpm, 5 min și separare iar solventul a fost evaporat la 45°C în etuva cu vid 24h.

3.25. Studiul reutilizării preparatului enzimatic de lipază în reacția de acilare a 2,2'-furoinului

În cadrul acestui studiu s-a urmărit influența numărului de utilizări asupra activității lipazei entrapate în matrici de sol-gel, utilizând silanii 3GOPrTMOS:TMOS în raport 1:1(5PS) în reacția de acilare. Pentru aceasta s-au cântărit 40 mg preparat peste care s-a adăugat 1 mL soluție de 2,2'-furoin 0,1M și acetat de vinil 0,3M

solubilizate în 2-metil tetrahidrofuran. Reacțiile s-au efectuat la 50°C, 24h, 1000 rpm. După fiecare ciclu de reacție preparatul a fost recuperat prin centrifugare la 10000 rpm, 5 min și separare, urmată de spălare cu 2 mL soluție tetrahidrofuran până la îndepărtarea completă a substratului. Solventul a fost evaporat la 45°C în etuva cu vid 24h. Pentru analiză probele au fost reconstituite în acetonitril și analizate conform metodei 3.21.

4 Concluzii finale și contribuții originale

Teza de doctorat conține rezultatele cercetărilor experimentale privind dezvoltarea unor sisteme enzimatică pentru obținerea unor bio-oligoestri sau monomeri ai acestora, utilizând materii prime regenerabile în diferite combinații, urmată de caracterizarea în structurală și termică detaliu a compușilor rezultați și evaluarea biodegradabilității acestora în medii lichide.

În cadrul studiilor incluse în cadrul tezei de doctorat a fost evaluată capacitatea lipazelor de a utiliza substraturile selectate în diferite combinații, dar și utilizarea metodelor de optimizare a reacțiilor prin dezvoltarea unui program experimental factorial.

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

1. Studiul de literatură, prezentat în primul capitol al tezei, a subliniat următoarele aspecte cu privire la dezvoltarea sistemelor biocatalitice pentru obținerea derivaților sustenabili:

- Biopolimerii reprezintă o soluție sustenabilă pentru înlocuirea polimerilor obținuți din materii prime de origine petrolieră.
- La ora actuală există metode computaționale eficiente, cu aplicabilitate în domeniul biocatalizei.
- Există o multitudine de materii prime regenerabile care au fost utilizate cu succes în sinteza enzimatică a poliesterilor.
- Metodele de evaluarea a biodegradabilității trebuie atent selecționate.
- Polioli de tipul glicerolului reprezintă o sursă importantă pentru sinteza pe cale enzimatică a unor compuși care prezintă interes în cosmetică și industria farmaceutică.

2. Metodele computaționale de dinamică moleculară și andocare au permis evaluarea stabilității a două lipaze în diverse condiții de temperatură și presiune.

2.1. Studiile de dinamică moleculară au confirmat stabilitatea lipazelor din CalB și *Ps. stutzeri* în condițiile de temperatură și presiune testate.

2.2. Rezultatele obținute în studiile de andocare au confirmat selectivitatea lipazelor pentru substraturile cu grupări OH primare și secundare și au indicat o selectivitate mai are a lipazei din *Ps. stutzeri* pentru substratul furanic.

3. Au fost sintetizați oligoestri cu diferite funcțiuni reactive, utilizând ulei de ricin și un derivat furanic în sistem reacții enzimatică „one-pot”, folosind o singură lipază.

3.1. S-a demonstrat posibilitatea utilizării uleiului de ricin ca substrat pentru lipază, în vederea sintezei unor oligoestri nesaturați cu funcțiuni heteroaromate.

3.2. Sustenabilitatea procesului a fost demonstrată de efectuarea reacțiilor în mediu fără solvent, la temperaturi de până la 80°C.

3.3. În sistemul „one-pot” studiat, formarea terpolimerilor cu unități de acid ricinoleic, derivat furanic și glicerol reprezintă o posibilitate pentru a crește hidrofilicitatea produșilor.

3.4. Sistemul de reacție propus are eficiență ridicată de biotransformare și poate fi fezabil pentru valorificarea triricinoleinei din uleiurile vegetale.

3.5. Sinteza poli(5-hidroximetil-2-furancarboxilat-co-ricinoleat)-ului în sistem one-pot a fost demonstrată și optimizată utilizând un program experimental factorial utilizând ca materie primă acidul de ricin și lipaza din *Pseudomonas stutzeri* ca și biocatalizator. Condițiile optime de reacție au fost temperatura 63°C, raport molar ulei ricin:HFA 3,3:1, cantitate de enzimă 33 U/mmol (substrat total).

3.6. Introducerea unităților heterociclice de furan oferă acces la o gamă largă de noi oligomeri cu proprietăți originale prin procese simple și eficiente. Analiza structurală, demonstrarea formării copolimerului și compoziția acestuia au fost efectuate folosind tehnici instrumentale moderne, cum ar fi 2D-NMR și MALDI-TOF MS.

3.7. Oligoesterii obținuți în condițiile optime de reacție au fost testați pentru obținerea unor organogeluri în diferiți solvenți organici. Organogelurile obținute în ciclohexan și heptan au prezentat morfologie neîntreruptă cu porozități de aproximativ 50μm.

4. A fost evaluată selectivitatea a două lipaze imobilizate față de 15 dioli în reacții de sinteză a poliesterilor cu unități de acid adipic. Importanța științifică a acestor rezultate rezidă în demonstrarea capacității unei lipaze mai puțin studiate pentru reacții de poliesterificare, cât și în posibilitatea de a direcționa sinteza unor produși cu proprietăți bine definite.

4.1. Selectivitatea lipazei din *Ps. stutzeri* a fost evaluată pentru prima dată sistematic pentru sinteza unor oligoesteri, în diferite condiții de temperatură și medii de reacție.

4.3. Masele moleculare medii ale produșilor au fost determinate prin cromatografie de exclusiune sterică, iar structura produșilor de reacție a fost demonstrată prin spectroscopie 1H-RMN.

4.4. Utilizarea unui solvent organic verde ca mediu de reacție nu a avut un efect semnificativ pentru creșterea gradului de polimerizare al produșilor.

4.5. Dintre enzimele testate lipaze din CalB si-a dovedit eficiența în această reacție, la temperatura selectată de 85°C.

4.6. Stabilitatea termică a oligoesterilor cu cele mai mari mase moleculare medii a fost studiată prin termogravimetrie. Dintre cei 8 oligoesteri evaluați, cel mai stabil s-a dovedit a fi derivatul cu unități ciclice obținut pe bază de 1,4-ciclohexandimetanol.

5. A fost evaluată biodegradabilitatea a 6 oligoesteri sintetizați și caracterizați și a 3 materii prime în mediu lichid de apă dulce și apă sărată prin monitorizarea oxigenului dizolvat, utilizând sisteme de monitorizare OxyTop.

5.1. Pentru toți compușii testați degradabilitatea (Dt) exprimată în procente, după 21 de zile a fost mai ridicată în mediul lichid inoculat cu apă sărată.

5.2. Dintre cei 3 oligoesteri cu unități furanice valoarea Dt cea mai ridicată s-a obținut pentru derivatul poli(2,5-*bis*-hidroximetil furan adipat), urmată de poli(5-hidroximetil-2-furancarboxilat-*co*-ricinoleat).

5.3. Pentru poliesterii alifatici cele mai mari valori Dt >70% s-au obținut pentru poli(1,8-octandiol adipat).

5.4. Monomerii furanici au demonstrat o biodegradabilitate lentă, iar valoarea Dt obținută pentru derivatul cu grupare hidroxil a fost superioară acidului 2,5-furandicarboxilic.

5.5. Rezultatele preliminare obținute în cadrul studiului de evaluare a biodegradabilității sunt promițătoare și încadrează produșii obținuți ca potențiali candidați pentru aplicații în domeniul alimentar sau cosmetic.

6. Valorificarea glicerolului pentru obținerea de acid glicerol a fost realizată cu succes pe cale enzimatică, utilizând lacaze imobilizate prin legare covalentă pe suporturi magnetice.

6.1. Au fost testate 4 lacaze comerciale din diferite surse în reacția de oxidare a glicerolului, iar cea mai eficientă s-a dovedit lacaza din *Trametes versicolor*.

6.2. Au fost testați 5 inițiatori iar cel mai eficient pentru reacția de oxidare a glicerinei s-a dovedit TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil).

6.3. S-a realizat imobilizarea cu succes a lacazelor din *Trametes versicolor* și *Aspergillus* sp. prin legare covalentă obținându-se 24 de preparate enzimatică a căror activitate a fost evaluată în reacția de oxidare a 2,6-dimetoxifenolului.

6.4. Cele mai mari ridicate valori ale activității enzimatică pentru lacazele imobilizate din *Trametes versicolor* - 760 μmoli/min/g preparat, s-au obținut când s-a utilizat ca suport o rășină polimetacrilică funcționalizată cu grupări butil-epoxi. Cea mai mare activitate enzimatică utilizând nanoparticule magnetice ca suport s-a obținut pentru lacaza imobilizată din *Trametes versicolor*, 360 μmoli/min/g preparat pe suport de tip ferită mixtă NiZn.

6.5. Biocatalizatorul imobilizat și-a menținut activitatea în intervalul de temperatură 30-50°C, fiind observată chiar o creștere a stabilității termice în comparație cu enzima nativă.

6.6. Reducerea legăturii iminice cu NaBH₄ a avut ca efect creșterea stabilității operaționale cu aproximativ 20%.

6.7. Atât lacaza din *Trametes versicolor* nativă, cât și cea imobilizată au fost utilizate cu succes pentru prima dată ca biocatalizatori în reacția de oxidare a glicerolului.

7. A fost studiată capacitatea lipazei din *Ps. stutzeri* native și imobilizate pentru rezoluția cinetică enantioselectivă 2,2'-furoinului.

7.1. A fost demonstrată pentru prima dată acilarea enantioselectivă a 2,2'-furoinului catalizată de lipaze immobilizate.

7.2. Entraparea lipazelor în matrici de sol-gel s-a dovedit eficientă pentru conversia unor substraturi heteroaromatice de tipul 2,2'-furoinului.

7.3. Dintre cele 9 lipaze testate valorile cele mai ridicate ale conversiei și excesului enantiomeric s-au obținut utilizând lipaza din *Ps. stutzeri* entrapată în matrici de sol-gel utilizând amestecul de silani precursori 3GOPrTMOS:TMOS în raport molar 1:1.

7.4. Dintre solvenții testați ca mediu de reacție cel mai eficient s-a dovedit a fi 2-metil tetrahidrofuranul, un solvent verde.

7.5. A fost posibilă reutilizarea biocatalizatorului, acesta menținându-și 21,7% din activitate după 5 cicluri de utilizare.

CONTRIBUȚIILE ORIGINALE (REZULTATELE ȘTIINȚIFICE NOI)

I. S-au realizat studii computaționale în condiții diferite de temperatură și presiune pentru lipaza din *Ps. stutzeri* care a fost mai puțin studiată anterior.

1. Studiile de dinamică moleculară au demonstrat stabilitatea ridicată a lipazei din *Ps stutzeri* la temperaturi de 50 și 75°C.

2. Evaluarea situsurilor catalitice ale lipazelor din CalB și *Ps stutzeri* au indicat flexibilitate și abilitate mai ridicată a lipazei din pentru a stabili interacțiuni cu donorii de legături H într-o zonă mai largă a situsului activ.

3. Studiile de andocare efectuate reprezintă rezultatele preliminare pentru evaluarea selectivității și specificității de substrat la lipazei *Ps. stutzeri*.

II Elaborarea unui proces enzimatic în sistem „one-pot” pentru a sintetiza oligoesteri ai acidului ricinoleic cu unități furanice, utilizând ulei de ricin și acid 5 hidroximetil-2-furoic ca substraturi.

3. Transformarea în premieră a uleiului de ricin în oligoesteri aromatici în sistem fără solvent.

4. Stabilirea condițiilor optime de reacție printr-un program experimental factorial.

5. Demonstrarea prin spectroscopie 2D RMN a structurii poli(5-hidroximetil-2-furancarboxilat-co-ricinoleat)ului.

6. Utilizarea în premieră a oligoesterilor cu funcțiuni nesaturate și unități furanice pentru obținerea de organogeluri.

III. Sintetiza și caracterizarea de oligoesteri pe cale biocatalitică, utilizând dioli naturali și sintetici și lipaze immobilizate din diferite surse.

7. Stabilirea influenței poziției grupării OH, gradului de nesaturare a substratului, a sursei enzimei, a temperaturii și a mediului de reacție asupra formării produșilor de oligomerizare.

8. Demonstrarea superiorității lipazei din CalB pentru sinteza oligoesterilor alifatici, respectiv a lipazei din *Ps. stutzeri* pentru oligoesterii aromatici sau ciclici.

IV. Evaluarea impactului ecologic al oligoesterilor sintetizați pe cale enzimatică în medii lichide cu apă dulce și apă sărată

9. Evaluarea biodegradabilității în medii lichide a 6 oligoesteri cu unități furanice și alifatici.

10. Utilizarea proprietăților termice ale oligoesterilor pentru o posibilă corelare cu proprietățile de biodegradabilitate.

V. Valorificarea enzimatică a glicerolului utilizând enzime oxidative native și immobilizate.

11. S-a determinat influența sursei lacazei, a inițiatorilor și a suportului de immobilizare pentru sinteza preferențială a acidului glicerol utilizând glicerol ca substrat.

12. A fost pentru prima dată demonstrată eficiența lacazei din *Trametes versicolor* immobilizate prin legare covalentă pe suporturi magnetice pentru această reacție.

VI. Evaluarea comparativă a capacității lipazelor immobilizate din CalB și *Ps. stutzeri* pentru acilarea enantioselectivă a 2,2'-furoinului.

13. Au fost evaluate 9 preparate enzimatiche comerciale sau obținute în cadrul grupului de biocataliză în vederea stabilirii eficienței catalitice în reacția de acilare enantioselectivă a 2,2'-furoinului și s-a demonstrat pentru prima dată superioritatea lipazei din *Ps. stutzeri* immobilizate prin entrapare în matrici de sol-gel pentru această reacție.

Rezultatele obținute în cadrul acestei teze au fost valorificate prin publicarea a trei articole (două în calitate de prim autor) în reviste internaționale de prestigiu și impact ridicat în domeniu (Sustainable Chemistry and Pharmacy, Enzyme and Microbial Technology, Processes), însumând un factor de impact cumulativ de 12,517 (date pentru anul 2022, conform bazei de date WoS)) și au fost prezentate în cadrul a 7 conferințe internaționale în domeniul Biocatalizei, Chimiei verzi și Biotehnologiilor industriale.

5. Bibliografie

- [1] M. Ripoll and L. Betancor, "Opportunities for the valorization of industrial glycerol via biotransformations," *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, vol. 28, p. 100430, 2021, doi: 10.1016/j.cogsc.2020.100430.
- [2] R. A. Sheldon and D. Brady, "Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis," *ChemSusChem*, vol. 12, no. 13, pp. 2859–2881, 2019, doi: 10.1002/cssc.201900351.
- [3] E. L. Bell *et al.*, "Biocatalysis," *Nat. Rev. Methods Prim.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–21, 2021, doi: 10.1038/s43586-021-00044-z.
- [4] A. M. Klivanov, "Improving enzymes by using them in organic solvents," *Nature*, vol. 409, no. 6817, pp. 241–246, 2001, doi: 10.1038/35051719.
- [5] U. Hanefeld, F. Hollmann, and C. E. Paul, "Biocatalysis making waves in organic chemistry," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 51, no. 2, pp. 594–627, 2022, doi: 10.1039/d1cs00100k.
- [6] D. Arnodo, E. Maffei, F. Marra, S. Nejrotti, and C. Prandi, "Combination of Enzymes and Deep Eutectic Solvents as Powerful Toolbox for Organic Synthesis," *Molecules*, vol. 28, no. 2, 2023, doi: 10.3390/molecules28020516.
- [7] J. M. Blamey, F. Fischer, H. P. Meyer, F. Sarmiento, and M. Zinn, *Enzymatic Biocatalysis in Chemical Transformations: A Promising and Emerging Field in Green Chemistry Practice*. Elsevier Inc., 2017. doi: 10.1016/B978-0-12-803725-6.00014-5.
- [8] A. Todea, D. M. Dreava, I. C. Benea, I. Bîtcă, F. Peter, and C. G. Boeriu, "Achievements and trends in biocatalytic synthesis of specialty polymers from biomass-derived monomers using lipases," *Processes*, vol. 9, no. 4, pp. 1–26, 2021, doi: 10.3390/pr9040646.
- [9] C. Stevens and R. Verhé, *Renewable Bioresources: Scope and Modification for Non-Food Applications*; no. January 2015. 2004. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/266068716>
- [10] L. Bastiaens, L. Soetemans, E. D'Hondt, and K. Elst, "Sources of chitin and chitosan and their isolation," *Chitin Chitosan Prop. Appl.*, pp. 1–34, 2019, doi: 10.1002/9781119450467.ch1.
- [11] S. A. Miller, "Sustainable polymers: Replacing polymers derived from fossil fuels," *Polym. Chem.*, vol. 5, no. 9, pp. 3117–3118, 2014, doi: 10.1039/c4py90017k.
- [12] R. Hatti-Kaul, L. J. Nilsson, B. Zhang, N. Rehnberg, and S. Lundmark, "Designing Biobased Recyclable Polymers for Plastics," *Trends Biotechnol.*, vol. 38, no. 1, pp. 50–67, Jan. 2020, doi: 10.1016/J.TIBTECH.2019.04.011.

- [13] "Market – European Bioplastics e.V." <https://www.european-bioplastics.org/market/>
- [14] L. Shen, J. Haufe, and M. K. Patel, "Product overview and market projection of emerging bio-based plastics. PRO-BIP; Final Report, Report No: NWS-E-2009-32," p. 243, 2009, [Online]. Available: https://www.uu.nl/sites/default/files/copernicus_probip2009_final_june_2009_revised_in_november_09.pdf
- [15] J. Thoen and R. Busch, "Industrial Chemicals from Biomass - Industrial Concepts," *Biorefineries-Industrial Process. Prod. Status Quo Futur. Dir.*, vol. 2, pp. 347–365, 2008, doi: 10.1002/9783527619849.ch29.
- [16] A. K. Urbanek, A. M. Mirończuk, A. García-Martín, A. Saborido, I. de la Mata, and M. Arroyo, "Biochemical properties and biotechnological applications of microbial enzymes involved in the degradation of polyester-type plastics," *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, vol. 1868, no. 2. Elsevier B.V., Feb. 01, 2020. doi: 10.1016/j.bbapap.2019.140315.
- [17] R. Hatti-Kaul, L. J. Nilsson, B. Zhang, N. Rehnberg, and S. Lundmark, "Designing Biobased Recyclable Polymers for Plastics," *Trends Biotechnol.*, vol. 38, no. 1, pp. 50–67, 2020, doi: 10.1016/j.tibtech.2019.04.011.
- [18] A. S. Luyt and S. S. Malik, "Can biodegradable plastics solve plastic solid waste accumulation?," *Plast. to Energy Fuel, Chem. Sustain. Implic.*, pp. 403–423, Jan. 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-813140-4.00016-9.
- [19] P. Tripathi and S. Sinha, "Industrial Biocatalysis: an Insight into Trends and Future Directions," *Curr. Sustain. Energy Reports*, vol. 7, no. 3, pp. 66–72, 2020, doi: 10.1007/s40518-020-00150-8.
- [20] C. Li, T. Tan, H. Zhang, and W. Feng, "Analysis of the Conformational Stability and Activity of *Candida antarctica* Lipase B in Organic Solvents," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 37, pp. 28434–28441, 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.136200.
- [21] S. Shoda, A. Kobayashi, and S. Kobayashi, "Production of Polymers by White Biotechnology," *RSC Green Chem.*, vol. 2016-January, no. 45, pp. 274–309, Nov. 2015, doi: 10.1039/9781782624080-00274.
- [22] A. Pellis, M. Malinconico, A. Guarneri, and L. Gardossi, "Renewable polymers and plastics: Performance beyond the green," *N. Biotechnol.*, vol. 60, pp. 146–158, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.nbt.2020.10.003.
- [23] S. Takkellapati, T. Li, and M. A. Gonzalez, "An overview of biorefinery-derived platform chemicals from a cellulose and hemicellulose biorefinery," *Clean Technol. Environ. Policy*, vol. 20, no. 7, pp. 1615–1630, 2018, doi: 10.1007/s10098-018-1568-5.
- [24] G. L. Gregory, E. M. Lopez-Vidal, and A. Buchard, "Polymers from sugars: cyclic monomer synthesis, ring-opening polymerisation, material properties and applications," *Chem. Commun.*, vol. 53, no. 14, pp. 2198–2217, 2017, doi: 10.1039/c6cc09578j.

- [25] S. T. Ahmed, N. G. H. Leferink, and N. S. Scrutton, "Chemo-enzymatic routes towards the synthesis of bio-based monomers and polymers," *Mol. Catal.*, vol. 467, no. February, pp. 95–110, 2019, doi: 10.1016/j.mcat.2019.01.036.
- [26] A. B. Cozier, Muriel, Adrie J. J. Straathof, "Business highlights: Collaboration: Bigger and beta," *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, vol. 8, no. 6, p. 743, 2014, doi: 10.1002/BBB.
- [27] E. M. M. Abdelraheem, H. Busch, U. Hanefeld, and F. Tonin, "Biocatalysis explained: From pharmaceutical to bulk chemical production," *React. Chem. Eng.*, vol. 4, no. 11, pp. 1878–1894, 2019, doi: 10.1039/c9re00301k.
- [28] Y. Liu, L. Song, N. Feng, W. Jiang, Y. Jin, and X. Li, "Recent advances in the synthesis of biodegradable polyesters by sustainable polymerization: Lipase-catalyzed polymerization," *RSC Adv.*, vol. 10, no. 59, pp. 36230–36240, 2020, doi: 10.1039/d0ra07138b.
- [29] S. M. E. Swainson, I. D. Styliari, V. Taresco, and M. C. Garnett, "Synthesized Functionalizable Polyester and Versatile Drug Delivery Carrier : A Literature Update," *Polymers (Basel)*, vol. 11, p. 1561, 2019.
- [30] T. Urbánek, E. Jäger, A. Jäger, and M. Hrubý, "Selectively biodegradable polyesters: Nature-inspired construction materials for future biomedical applications," *Polymers (Basel)*, vol. 11, no. 6, 2019, doi: 10.3390/POLYM11061061.
- [31] K. . Ludwicka and S. Jedrzejczak-Krzepkowska, M.; Kubiak, K.; Kolodziejczyk, M.; Pankiewicz, T.; Bielecki, "In Bacterial Nanocellulose: From Biotechnology to Bio-Economy," in *Medical and cosmetic applications of bacterial nanocellulose*, S. Gama, M., Dourado, F., Bielecki, Ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2017, pp. 145–165.
- [32] P. Cinelli, M. B. Coltelli, F. Signori, P. Morganti, and A. Lazzeri, "Cosmetic packaging to save the environment: Future perspectives," *Cosmetics*, vol. 6, no. 2, pp. 1–14, 2019, doi: 10.3390/COSMETICS6020026.
- [33] P. Marion *et al.*, "Sustainable chemistry: How to produce better and more from less?," *Green Chem.*, vol. 19, no. 21, pp. 4973–4989, 2017, doi: 10.1039/c7gc02006f.
- [34] A. Pellis, S. Cantone, C. Ebert, and L. Gardossi, "Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities," *N. Biotechnol.*, vol. 40, pp. 154–169, 2018, doi: 10.1016/j.nbt.2017.07.005.
- [35] J. Zhang *et al.*, "Recent developments in lipase-catalyzed synthesis of polymeric materials," *Process Biochem.*, vol. 49, pp. 797–806, 2014, doi: 10.1016/j.procbio.2014.02.006.
- [36] R. Höfer and M. Selig, *Green Chemistry and Green Polymer Chemistry*, vol. 10. Elsevier B.V., 2012. doi: 10.1016/B978-0-444-53349-4.00252-1.
- [37] M. Matori, T. Asahara, and Y. Ota, "Reaction conditions influencing positional

- specificity index (PSI) of microbial lipases," *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 72, no. 6, pp. 413–415, Jan. 1991, doi: 10.1016/0922-338X(91)90046-J.
- [38] J. Pleiss, M. Fischer, and R. D. Schmid, "Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 93, no. 1–2, pp. 67–80, Jun. 1998, doi: 10.1016/S0009-3084(98)00030-9.
- [39] H. Uyama, "Enzymatic Polymerization," *Futur. Dir. Biocatal.*, pp. 205–251, 2001, doi: 10.1016/B978-044453059-2/50010-8.
- [40] S. Kobayashi, "Lipase-catalyzed polyester synthesis - A green polymer chemistry," *Proc. Japan Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, vol. 86, no. 4, pp. 338–365, 2010, doi: 10.2183/pjab.86.338.
- [41] Krzysztof Matyjaszewski and M. Möller, *Polycondensation Polymer Science : a Comprehensive*, vol. 5. 2013.
- [42] S. Kobayashi, "Enzymatic ring-opening polymerization and polycondensation for the green synthesis of polyesters," *Polym. Adv. Technol.*, vol. 26, no. 7, pp. 677–686, 2015, doi: 10.1002/pat.3564.
- [43] S. Kobayashi, "Green polymer chemistry: new methods of polymer synthesis using renewable starting materials," *Struct. Chem.*, vol. 28, no. 2, pp. 461–474, 2017, doi: 10.1007/s11224-016-0861-3.
- [44] H. N. Cheng and R. A. Gross, *Green polymer chemistry: Biocatalysis and biomaterials*, vol. 1043. 2010. doi: 10.1021/bk-2010-1043.ch001.
- [45] Y. Jiang and K. Loos, "Enzymatic Synthesis of Biobased Polyesters," 2016, doi: 10.3390/polym8070243.
- [46] A. Pellis, E. Herrero Acero, V. Ferrario, D. Ribitsch, G. M. Guebitz, and L. Gardossi, "The Closure of the Cycle: Enzymatic Synthesis and Functionalization of Bio-Based Polyesters," *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 4, pp. 316–328, 2016, doi: 10.1016/j.tibtech.2015.12.009.
- [47] J. L. Yao Lu, Qijun Lv, Bo Liu, "Immobilized *Candida antarctica* lipase B catalyzed synthesis of biodegradable polymers for biomedical applications," *Biomater. Sci.*, vol. 7 (12), pp. 4963–4983., 2019, doi: 10.1039/C9BM00716D.
- [48] A. Pellis *et al.*, "Enzyme-catalyzed functionalization of poly (L-lactic acid) for drug delivery applications," *Process Biochem.*, vol. 59, pp. 77–83, 2017, doi: 10.1016/j.procbio.2016.10.014.
- [49] J. N. M. P. Soma Chakraborty and 3 · Hiroharu Ajiro · Zara Kryzel A. Melgar1 · Steffen Seitz2 · Kai Kan2, "Glycerol-modified poly(ϵ -caprolactone): an biocatalytic approach to improve the hydrophilicity of poly(ϵ -caprolactone)," *Polym. Bull.*, vol. 76, no. 4, pp. 1915–1928, 2019, doi: 10.1007/s00289-018-2443-6.
- [50] I. Kántor *et al.*, "Biocatalytic synthesis of poly[ϵ -caprolactone-co-(12-hydroxystearate)] copolymer for sorafenib nanoformulation useful in drug

- delivery," *Catal. Today*, vol. 366, no. November 2019, pp. 195–201, 2021, doi: 10.1016/j.cattod.2020.05.005.
- [51] S. A. Vilela C, Sousa A, Fonseca A, Serra A, Coelho J, Freire C, "The quest for sustainable polyesters – insights into the future," 2013, doi: 10.1039/c3py01213a.
- [52] V. Taresco *et al.*, "Variation in structure and properties of poly (glycerol adipate) via control of chain branching during enzymatic synthesis," *Polymer (Guildf).*, vol. 89, pp. 41–49, 2016, doi: 10.1016/j.polymer.2016.02.036.
- [53] A. Martínez De Ilarduya and S. Muñoz Guerra, "Ring opening polymerization of macrocyclic oligoesters derived from renewable sources," *Polym. Chem.*, vol. 11, no. 30, pp. 4850–4860, 2020, doi: 10.1039/d0py00258e.
- [54] I. K. Varma, A. Albertsson, R. Rajkhowa, and R. K. Srivastava, "Enzyme catalyzed synthesis of polyesters," vol. 30, pp. 949–981, 2005, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2005.06.010.
- [55] A. Douka, S. Vouyiouka, L. Papaspyridi, and C. D. Papaspyrides, "Progress in Polymer Science A review on enzymatic polymerization to produce polycondensation polymers : The case of aliphatic polyesters , polyamides and polyesteramides," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 79, pp. 1–25, 2018, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2017.10.001.
- [56] C. K. Williams and C. K. Williams, "Synthesis of functionalized biodegradable polyesters," pp. 1573–1580, 2007, doi: 10.1039/b614342n.
- [57] A. R. Webb, J. Yang, and G. A. Ameer, "Biodegradable polyester elastomers in tissue engineering," pp. 801–812, 2004.
- [58] J. C. Middleton and A. J. Tipton, "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices," vol. 21, 2000.
- [59] E. D. Boland, B. D. Coleman, C. P. Barnes, D. G. Simpson, G. E. Wnek, and G. L. Bowlin, "Electrospinning polydioxanone for biomedical applications," vol. 1, pp. 115–123, 2005, doi: 10.1016/j.actbio.2004.09.003.
- [60] Z. Gan, H. Abe, and Y. Doi, "Biodegradable Poly(ethylene succinate) (PES). 1. Crystal Growth Kinetics and Morphology," pp. 704–712, 2000.
- [61] J. Natarajan, S. Movva, G. Madras, and K. Chatterjee, "Biodegradable galactitol based crosslinked polyesters for controlled release and bone tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 77, pp. 534–547, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.160.
- [62] X. Fan, Y. Zhao, W. Xu, and L. Li, "Linear – dendritic block copolymer for drug and gene delivery," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 62, pp. 943–959, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.01.044.
- [63] P. T. Wong and S. K. Choi, "Mechanisms of Drug Release in Nanotherapeutic Delivery Systems," no. iii, 2015, doi: 10.1021/cr5004634.

- [64] I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, and J. M. Kenny, "Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 95, no. 11, pp. 2126–2146, 2010, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.06.007.
- [65] X. Zhang, H. Tan, and Z. Li, "Materials Science & Engineering C Biodegradable polyester shape memory polymers: Recent advances in design, material properties and applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 92, no. October 2017, pp. 1061–1074, 2018, doi: 10.1016/j.msec.2017.11.008.
- [66] P. D. Tomke *et al.*, "Lipase-ultrasound assisted synthesis of polyesters Corresponding author :," 2017, doi: 10.1016/j.ultsonch.2017.03.051.
- [67] I. K. M. Yu and D. C. W. Tsang, "Conversion of biomass to hydroxymethylfurfural: A review of catalytic systems and underlying mechanisms," *Bioresour. Technol.*, vol. 238, pp. 716–732, 2017, doi: 10.1016/j.biortech.2017.04.026.
- [68] Paulien F. H. Harmsen, Martijn M. Hackmann, Harriëtte L. Bos, "Green building blocks for bio-based plastics," *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, vol. 8, no. 6, p. 743, 2014, doi: 10.1002/BBB.
- [69] P. Abasian, S. Khalili, S. Ghanavati, and S. Rahebi, "Polymeric nanocarriers in targeted drug delivery systems: A review," no. June, pp. 2939–2954, 2020, doi: 10.1002/pat.5031.
- [70] A. M. Vargason, A. C. Anselmo, and S. Mitragotri, "technologies," *Nat. Biomed. Eng.*, vol. 5, no. September, 2021, doi: 10.1038/s41551-021-00698-w.
- [71] R. A. Gross, M. Ganesh, and W. Lu, "Enzyme-catalysis breathes new life into polyester condensation polymerizations," vol. 28, pp. 435–443, 2010, doi: 10.1016/j.tibtech.2010.05.004.
- [72] A. Pellis, K. Haernvall, C. M. Pichler, G. Ghazaryan, R. Breinbauer, and G. M. Guebitz, "Enzymatic hydrolysis of poly(ethylene furanoate)," *Journal of Biotechnology*, vol. 235. Elsevier B.V., pp. 47–53, Oct. 10, 2016. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.02.006.
- [73] A. Tsui, Z. C. Wright, and C. W. Frank, "Biodegradable Polyesters from Renewable Resources," 2013, doi: 10.1146/annurev-chembioeng-061312-103323.
- [74] F. Isnard, M. Mazzeo, and C. M. Thomas, "Novel polyesters from renewable resources," *Actual. Chim.*, no. 427–428, pp. 50–53, 2018.
- [75] Z. H. Xu, A. Di Cheng, X. P. Xing, M. H. Zong, Y. P. Bai, and N. Li, "Improved synthesis of 2,5-bis(hydroxymethyl)furan from 5-hydroxymethylfurfural using acclimatized whole cells entrapped in calcium alginate," *Bioresour. Technol.*, vol. 262, no. April, pp. 177–183, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2018.04.077.
- [76] S. Rebouillat and F. Pla, "Recent Strategies for the Development of Biosourced-Monomers, Oligomers and Polymers-Based Materials: A Review with an

- Innovation and a Bigger Data Focus," *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, vol. 07, no. 04, pp. 167–213, 2016, doi: 10.4236/jbnt.2016.74017.
- [77] S. Matsumura, "Enzymatic synthesis of polyesters via ring-opening polymerization," *Adv. Polym. Sci.*, vol. 194, pp. 95–132, 2006.
- [78] G. M. Gübitz and A. C. Paulo, "New substrates for reliable enzymes: Enzymatic modification of polymers," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 14, no. 6, pp. 577–582, 2003, doi: 10.1016/j.copbio.2003.09.010.
- [79] M. J. L. Tschan, E. Brulé, P. Haquette, and C. M. Thomas, "Synthesis of biodegradable polymers from renewable resources," *Polym. Chem.*, vol. 3, no. 4, pp. 836–851, 2012, doi: 10.1039/c2py00452f.
- [80] A. Caretto, M. Noe, M. Selva, and A. Perosa, "Upgrading of biobased lactones with dialkylcarbonates as alkylating or acylating agents.pdf," 2014.
- [81] L. S. Nair and C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 8–9, pp. 762–798, 2007, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.
- [82] C. Ding and Z. Li, "A review of drug release mechanisms from nanocarrier systems," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 76, pp. 1440–1453, 2017, doi: 10.1016/j.msec.2017.03.130.
- [83] X. Fan, Z. Wang, D. Yuan, Y. Sun, Z. Li, and C. He, "Novel linear-dendritic-like amphiphilic copolymers: Synthesis and self-assembly characteristics," *Polym. Chem.*, vol. 5, no. 13, pp. 4069–4075, 2014, doi: 10.1039/c4py00065j.
- [84] X. Fan, Z. Li, and X. J. Loh, "Recent development of unimolecular micelles as functional materials and applications," *Polym. Chem.*, vol. 7, no. 38, pp. 5898–5919, 2016, doi: 10.1039/c6py01006g.
- [85] Z. H. Liu, Y. Li, C. J. Zhang, Y. Y. Zhang, X. H. Cao, and X. H. Zhang, "Synthesis of high-molecular-weight poly(ϵ -caprolactone) via heterogeneous zinc-cobalt(III) double metal cyanide complex," *Giant*, vol. 3, no. Iii, p. 100030, 2020, doi: 10.1016/j.giant.2020.100030.
- [86] Y. Poojari, J. S. Beemat, and S. J. Clarson, "Enzymatic synthesis of poly(ϵ -caprolactone): Thermal properties, recovery, and reuse of lipase B from *Candida antarctica* immobilized on macroporous acrylic resin particles," *Polym. Bull.*, vol. 70, no. 5, pp. 1543–1552, 2013, doi: 10.1007/s00289-013-0916-1.
- [87] H. Öztürk Düşkünkörür, E. Pollet, V. Phalip, Y. Güvenilir, and L. Avérous, "Lipase catalyzed synthesis of polycaprolactone and clay-based nanohybrids," *Polymer (Guildf.)*, vol. 55, no. 7, pp. 1648–1655, 2014, doi: 10.1016/j.polymer.2014.02.016.
- [88] H. Zhao and C. Toe, "'Water-like' ammonium-based ionic liquids for lipase activation and enzymatic polymerization," *Process Biochem.*, vol. 98, no. July, pp. 59–64, 2020, doi: 10.1016/j.procbio.2020.07.016.

- [89] G. Sandoval, I. Rivera, K. A. Barrera-Rivera, and A. Martínez-Richa, "Biopolymer synthesis catalyzed by tailored lipases," *Macromol. Symp.*, vol. 289, no. 1, pp. 135–139, 2010, doi: 10.1002/masy.200900016.
- [90] Z. Zhang, F. He, and R. Zhuo, "Immobilized lipase on porous silica particles: Preparation and application for biodegradable polymer syntheses in ionic liquid at higher temperature," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 94, pp. 129–135, 2013, doi: 10.1016/j.molcatb.2013.05.013.
- [91] G. Li and Q. Li, "Thermophilic esterase from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus* physically immobilized on hydrophobic macroporous resin: A novel biocatalyst for polyester synthesis," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 16, no. 6, pp. 1201–1207, 2011, doi: 10.1007/s12257-011-0260-y.
- [92] Karla A. Barrera-Rivera, Arturo Flores-Carreón, Antonio Martínez-Richa, "Enzymatic Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone by a New Lipase from *Yarrowia lipolytica*," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 116, no. 5, pp. 2658–2667, 2010, doi: 10.1002/app.
- [93] M. A. Woodruff and D. W. Huttmacher, "The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 10, pp. 1217–1256, 2010, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.
- [94] M. Hans, P. Gasteier, H. Keul, and M. Moeller, "Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone by means of mono- and multifunctional initiators: Comparison of chemical and enzymatic catalysis," *Macromolecules*, vol. 39, no. 9, pp. 3184–3193, 2006, doi: 10.1021/ma052657g.
- [95] M. M. Cecilia Hedfors, Emma Ostmark, Eva Malmström, Karl Hult, "Thiol End-Functionalization of Poly(ϵ -caprolactone), Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B," *Macromolecules*, vol. 38, no. 2, pp. 465–467, 2005, doi: 10.1017/S0021911804001044.
- [96] C. Wang, Y. Xiao, A. Heise, and M. Lang, "Organometallic and enzymatic catalysis for ring opening copolymerization of ϵ -caprolactone and 4-methyl- ϵ -caprolactone," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 49, no. 24, pp. 5293–5300, 2011, doi: 10.1002/pola.25007.
- [97] A. Kumar and R. A. Gross, "Candida antarctica Lipase B catalyzed polycaprolactone synthesis: Effects of organic media and temperature," *Biomacromolecules*, vol. 1, no. 1, pp. 133–138, 2000, doi: 10.1021/bm990510p.
- [98] D. M. Dreavă *et al.*, "Biocatalytic approach for novel functional oligoesters of ϵ -caprolactone and malic acid," *Processes*, vol. 9, no. 2, pp. 1–16, 2021, doi: 10.3390/pr9020232.
- [99] A. Todea *et al.*, "Biodegradable oligoesters of ϵ -caprolactone and 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid synthesized by immobilized lipases," *Polymers (Basel)*, vol. 11, no. 9, pp. 1–17, 2019, doi: 10.3390/polym11091402.

- [100] K. A. Barrera-Rivera and A. Martínez-Richa, "Syntheses and characterization of aliphatic polyesters via *yarrowia lipolytica* lipase biocatalysis," *ACS Symp. Ser.*, vol. 1144, pp. 59–68, 2013, doi: 10.1021/bk-2013-1144.ch005.
- [101] A. Todea, D. Aparaschivei, I. Bîtcă, I. Valentin, G. Bandur, and F. Péter, "Thermal behavior of oligo [(ϵ -caprolactone)-co-(δ -gluconolactone)] enzymatically synthesized in reaction conditions optimized by experimental design," *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 141, no. 3, pp. 1017–1026, 2020, doi: 10.1007/s10973-020-09557-3.
- [102] A. Todea, D. Aparaschivei, V. Badea, C. G. Boeriu, and F. Peter, "Biocatalytic Route for the Synthesis of Oligoesters of Hydroxy-Fatty acids and ϵ -Caprolactone," *Biotechnol. J.*, vol. 13, no. 6, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1002/biot.201700629.
- [103] D. Aparaschivei *et al.*, "Synthesis, characterization and enzymatic degradation of copolymers of ϵ -caprolactone and hydroxy-fatty acids," *Pure Appl. Chem.*, vol. 88, no. 12, pp. 1191–1201, 2016, doi: 10.1515/pac-2016-0920.
- [104] A. Todea, V. Badea, and C. Paul, "Optimization of enzymatic ring-opening copolymerizations involving δ -gluconolactone as monomer by experimental design," *Pure Appl. Chem.*, vol. 86, no. 11, pp. 1781–1792, 2014, doi: 10.1515/pac-2014-0717.
- [105] M. Sobczak, "Enzyme-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Cyclic Esters in the Presence of Poly(ethylene glycol)," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 116, no. 5, pp. 2658–2667, 2010, doi: 10.1002/app.
- [106] T. Robert and S. Friebel, "Itaconic acid—a versatile building block for renewable polyesters with enhanced functionality," *Green Chem.*, vol. 18, no. 10, pp. 2922–2934, 2016, doi: 10.1039/c6gc00605a.
- [107] T. Klement and J. Büchs, "Itaconic acid - A biotechnological process in change," *Bioresour. Technol.*, vol. 135, pp. 422–431, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.141.
- [108] J. H. Kane, G. City, A. C. Finlay, L. I. City, P. F. Amann, and C. Pfizer, "Production of itaconic acid. Patent US 2 385 283," 1945.
- [109] A. Kuenz, Y. Gallenmüller, T. Willke, and K. D. Vorlop, "Microbial production of itaconic acid: Developing a stable platform for high product concentrations," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 96, no. 5, pp. 1209–1216, 2012, doi: 10.1007/s00253-012-4221-y.
- [110] E. D. Guevarra and T. Tabuchi, "Accumulation of itaconic, 2-hydroxyparaconic, itatartaric, and malic acids by strains of the genus *ustilago*," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 54, no. 9, pp. 2353–2358, 1990, doi: 10.1271/bbb1961.54.2353.
- [111] T. Tabuchi, T. Sugisawa, T. Ishidori, T. Nakahara, and J. Sugiyama, "Itaconic Acid Fermentation by a Yeast Belonging to the Genus *Candida*," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 45, no. 2, pp. 475–479, 1981, doi: 10.1271/bbb1961.45.475.

- [112] W. E. Levinson, C. P. Kurtzman, and T. M. Kuo, "Production of itaconic acid by *Pseudozyma antarctica* NRRL Y-7808 under nitrogen-limited growth conditions," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 39, no. 4, pp. 824–827, 2006, doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.01.005.
- [113] C. L. Strelko *et al.*, "Itaconic acid is a mammalian metabolite induced during macrophage activation," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 41, pp. 16386–16389, 2011, doi: 10.1021/ja2070889.
- [114] A. Pourjavadi and Z. M. Tehrani, "Mesoporous silica nanoparticles with bilayer coating of poly(acrylic acid-co-itaconic acid) and human serum albumin (HSA): A pH-sensitive carrier for gemcitabine delivery," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 61, pp. 782–790, 2016, doi: 10.1016/j.msec.2015.12.096.
- [115] N. Milašinović, Z. Knežević-Jugović, N. Milosavljević, J. Filipović, and M. Kalagasidis Krušić, "Controlled release of lipase from *Candida rugosa* loaded into hydrogels of N-isopropylacrylamide and itaconic acid," *Int. J. Pharm.*, vol. 436, no. 1–2, pp. 332–340, 2012, doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.050.
- [116] F. A. M. M. Gonçalves, A. C. Fonseca, M. Domingos, A. Gloria, A. C. Serra, and J. F. J. Coelho, "The potential of unsaturated polyesters in biomedicine and tissue engineering: Synthesis, structure-properties relationships and additive manufacturing," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 68, pp. 1–34, 2017, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2016.12.008.
- [117] H. El-Hamshary, "Synthesis and water sorption studies of pH sensitive poly(acrylamide-co-itaconic acid) hydrogels," *Eur. Polym. J.*, vol. 43, no. 11, pp. 4830–4838, 2007, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2007.08.018.
- [118] D. G. Barrett, T. J. Merkel, J. C. Luft, and M. N. Yousaf, "One-step syntheses of photocurable polyesters based on a renewable resource," *Macromolecules*, vol. 43, no. 23, pp. 9660–9667, 2010, doi: 10.1021/ma1015424.
- [119] B. Guo *et al.*, "Biobased poly(propylene sebacate) as shape memory polymer with tunable switching temperature for potential biomedical applications," *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 4, pp. 1312–1321, 2011, doi: 10.1021/bm2000378.
- [120] J. Dai *et al.*, "Synthesis of bio-based unsaturated polyester resins and their application in waterborne UV-curable coatings," *Prog. Org. Coatings*, vol. 78, pp. 49–54, 2015, doi: 10.1016/j.porgcoat.2014.10.007.
- [121] A. Guarneri *et al.*, "Functionalization of Enzymatically Synthesized Rigid Poly(itaconate)s via Post-Polymerization Aza-Michael Addition of Primary Amines," *Adv. Synth. Catal.*, vol. 361, no. 11, pp. 2559–2573, 2019, doi: 10.1002/adsc.201900055.
- [122] F. Müller *et al.*, "Multifunctional crosslinkable itaconic acid copolymers for enzyme immobilization," *Eur. Polym. J.*, vol. 102, no. March, pp. 47–55, 2018, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.03.014.
- [123] A. Pellis *et al.*, "Towards feasible and scalable solvent-free enzymatic

- polycondensations: Integrating robust biocatalysts with thin film reactions," *Green Chem.*, vol. 17, no. 3, pp. 1756–1766, 2015, doi: 10.1039/c4gc02289k.
- [124] L. Corici, A. Pellis, V. Ferrario, C. Ebert, S. Cantone, and L. Gardossi, "Understanding Potentials and Restrictions of Solvent-Free Enzymatic Polycondensation of Itaconic Acid: An Experimental and Computational Analysis," *Adv. Synth. Catal.*, vol. 357, no. 8, pp. 1763–1774, 2015, doi: 10.1002/adsc.201500182.
- [125] Y. Jiang, A. J. J. Woortman, G. O. R. Alberda van Ekenstein, and K. Loos, "Enzyme-catalyzed synthesis of unsaturated aliphatic polyesters based on green monomers from renewable resources," *Biomolecules*, vol. 3, no. 3, pp. 461–480, 2013, doi: 10.3390/biom3030461.
- [126] Y. Jiang, A. J. J. Woortman, G. O. R. Alberda Van Ekenstein, and K. Loos, "Environmentally benign synthesis of saturated and unsaturated aliphatic polyesters via enzymatic polymerization of biobased monomers derived from renewable resources," *Polym. Chem.*, vol. 6, no. 30, pp. 5451–5463, 2015, doi: 10.1039/c5py00660k.
- [127] C. Hoffmann, M. C. Stuparu, A. Daugaard, and A. Khan, "Aza-Michael addition reaction: Post-polymerization modification and preparation of PEI/PEG-based polyester hydrogels from enzymatically synthesized reactive polymers," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 53, no. 6, pp. 745–749, 2015, doi: 10.1002/pola.27498.
- [128] S. Yamaguchi, M. Tanha, A. Hult, T. Okuda, H. Ohara, and S. Kobayashi, "Green polymer chemistry: Lipase-catalyzed synthesis of bio-based reactive polyesters employing itaconic anhydride as a renewable monomer," *Polym. J.*, vol. 46, no. 1, pp. 2–13, 2014, doi: 10.1038/pj.2013.62.
- [129] D. Aparaschivei *et al.*, "Enzymatic synthesis and characterization of novel terpolymers from renewable sources," *Pure Appl. Chem.*, vol. 91, no. 3, pp. 397–408, 2019, doi: 10.1515/pac-2018-1015.
- [130] G. Lligadas, J. C. Ronda, M. Galià, and V. Cádiz, "Renewable polymeric materials from vegetable oils: A perspective," *Mater. Today*, vol. 16, no. 9, pp. 337–343, 2013, doi: 10.1016/j.mattod.2013.08.016.
- [131] A. R. Ribeiro, S. S. Silva, and R. L. Reis, "Challenges and opportunities on vegetable oils derived systems for biomedical applications," *Biomater. Adv.*, vol. 134, no. July 2021, p. 112720, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.msec.2022.112720.
- [132] C. Gaglieri, R. T. Alarcon, A. de Moura, and G. Bannach, "Vegetable oils as monomeric and polymeric materials: A graphical review," *Curr. Res. Green Sustain. Chem.*, vol. 5, no. October, p. 100343, 2022, doi: 10.1016/j.crgsc.2022.100343.
- [133] S. K. Shah, A. V. Joshi, A. M. Patel, and D. K. Patel, "Screening of Castor Genotypes for Ricinoleic Acid Content," *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 6, no. 8, pp. 1318–1324, 2017, doi: 10.20546/ijcmas.2017.608.160.

- [134] I. Chakraborty and K. Chatterjee, "Polymers and Composites Derived from Castor Oil as Sustainable Materials and Degradable Biomaterials: Current Status and Emerging Trends," *Biomacromolecules*, vol. 21, no. 12, pp. 4639–4662, 2020, doi: 10.1021/acs.biomac.0c01291.
- [135] E. Nekhavhambe, H. E. Mukaya, and D. B. Nkazi, "Development of castor oil-based polymers: A review," *J. Adv. Manuf. Process.*, vol. 1, no. 4, pp. 1–13, 2019, doi: 10.1002/amp2.10030.
- [136] H. Uyama, "Functional polymers from renewable plant oils," *Polym. J.*, vol. 50, no. 11, pp. 1003–1011, 2018, doi: 10.1038/s41428-018-0097-8.
- [137] G. Totaro *et al.*, "Synthesis of castor oil-derived polyesters with antimicrobial activity," *Eur. Polym. J.*, vol. 56, no. 1, pp. 174–184, 2014, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2014.04.018.
- [138] M. B. Mensah, J. A. M. Awudza, and P. O'Brien, "Castor oil: A suitable green source of capping agent for nanoparticle syntheses and facile surface functionalization," *R. Soc. Open Sci.*, vol. 5, no. 8, pp. 1–19, 2018, doi: 10.1098/rsos.180824.
- [139] S. Alli, G. Dulger, I. Kiliccioglu, A. Alli, and B. Dulger, "Castor oil-based graft copolymers: synthesis, characterization antimicrobial activity and antiproliferative effects against breast cancer cell lines," *Polym. Bull.*, vol. 79, no. 12, pp. 11177–11199, 2022, doi: 10.1007/s00289-021-03908-2.
- [140] S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore, K. Baldenius, and U. T. Bornscheuer, "Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 60, no. 1, pp. 88–119, 2021, doi: 10.1002/anie.202006648.
- [141] M. Nikulin and V. Švedas, "Prospects of using biocatalysis for the synthesis and modification of polymers," *Molecules*, vol. 26, no. 9, pp. 1–37, 2021, doi: 10.3390/molecules26092750.
- [142] C. Dourado Fernandes, B. Francisco Oechsler, C. Sayer, D. de Oliveira, and P. H. Hermes de Araújo, "Recent advances and challenges on enzymatic synthesis of biobased polyesters via polycondensation," *Eur. Polym. J.*, vol. 169, no. March, 2022, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2022.111132.
- [143] R. A. Gross and S. Mekala, "Microbial and Enzymatic Synthesis of Polymers," *Lipid Modif. by Enzym. Eng. Microbes*, pp. 239–256, Mar. 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-813167-1.00011-6.
- [144] A. Todea, D. M. Dreava, I. C. Benea, I. Bîtcă, F. Peter, and C. G. Boeriu, "Achievements and trends in biocatalytic synthesis of specialty polymers from biomass-derived monomers using lipases," *Processes*, vol. 9, no. 4, 2021, doi: 10.3390/pr9040646.
- [145] D. G. Hayes, "The catalytic activity of lipases toward hydroxy fatty acids - A review," *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 73, no. 5, pp. 543–549, 1996, doi: 10.1007/BF02518105.

- [146] S. C. Cermak and T. A. Isbell, "Synthesis of estolides from oleic and saturated fatty acids," *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 78, no. 6, pp. 557–565, 2001, doi: 10.1007/s11746-001-0304-1.
- [147] Y. Yang, Y. Yu, D. Wu, C. Liu, Z. Zhao, and Q. Li, "Lipase/esterase-catalyzed synthesis of aliphatic polyesters via polycondensation: A review," *Process Biochem.*, vol. 47, no. 7, pp. 1027–1036, 2012, doi: 10.1016/j.procbio.2012.04.006.
- [148] A. Bódalo, 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.*, vol. 39, no. 3, pp. 450–456, 2008, doi: 10.1016/j.bej.2007.10.013.
- [149] H. Horchani, A. Bouaziz, Y. Gargouri, and A. Sayari, "Immobilized *Staphylococcus xylosus* lipase-catalysed synthesis of ricinoleic acid esters," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 75, pp. 35–42, 2012, doi: 10.1016/j.molcatb.2011.11.007.
- [150] 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.*, vol. 87, no. 1, pp. 51–58, 2015, doi: 10.1515/pac-2014-0716.
- [151] S. M. McKenna, S. Leimkühler, S. Herter, N. J. Turner, and A. J. Carnell, "Enzyme cascade reactions: Synthesis of furandicarboxylic acid (FDCA) and carboxylic acids using oxidases in tandem," *Green Chem.*, vol. 17, no. 6, pp. 3271–3275, 2015, doi: 10.1039/c5gc00707k.
- [152] W. Shi, C. Gu, H. Jiang, M. Zhang, and M. Lang, "Effects of amphiphilic chitosan-g-poly(ϵ -caprolactone) polymer additives on paclitaxel release from drug eluting implants," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 45, pp. 502–509, 2014, doi: 10.1016/j.msec.2014.09.020.
- [153] T. M. Lacerda and A. Gandini, "Marriage of furans and vegetable oils through click chemistry for the preparation of macromolecular materials: A succinct review," *J. Renew. Mater.*, vol. 2, no. 1, pp. 2–12, 2014, doi: 10.7569/JRM.2013.634127.
- [154] A. F. Sousa and A. J. D. Silvestre, "Plastics from renewable sources as green and sustainable alternatives," *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, vol. 33, pp. 1–13, 2022, doi: 10.1016/j.cogsc.2021.100557.
- [155] A. Gandini, T. M. Lacerda, A. J. F. Carvalho, and E. Trovatti, "Progress of Polymers from Renewable Resources: Furans, Vegetable Oils, and Polysaccharides," *Chem. Rev.*, vol. 116, no. 3, pp. 1637–1669, 2016, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00264.
- [156] Á. Cruz-Izquierdo, L. A. M. van den Broek, J. L. Serra, M. J. Llama, and C. G. Boeriu, "Lipase-catalyzed synthesis of oligoesters of 2,5-furandicarboxylic acid with aliphatic diols," *Pure Appl. Chem.*, vol. 87, no. 1, pp. 59–69, 2015, doi: 10.1515/pac-2014-1003.

- [157] D. Maniar, Y. Jiang, A. J. J. Woortman, J. van Dijken, and K. Loos, "Furan-Based Copolyesters from Renewable Resources: Enzymatic Synthesis and Properties," *ChemSusChem*, vol. 12, no. 5, pp. 990–999, 2019, doi: 10.1002/cssc.201802867.
- [158] J. J. Dong, R. Z. Han, G. C. Xu, L. Gong, W. R. Xing, and Y. Ni, "Detoxification of furfural residues hydrolysate for butanol fermentation by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864," *Bioresour. Technol.*, vol. 259, no. February, pp. 40–45, 2018, doi: 10.1016/j.biortech.2018.02.098.
- [159] A. Pellis, M. Malinconico, A. Guarneri, and L. Gardossi, "Renewable polymers and plastics: Performance beyond the green," *N. Biotechnol.*, vol. 60, no. October 2020, pp. 146–158, 2021, doi: 10.1016/j.nbt.2020.10.003.
- [160] S. K. Burgess, J. E. Leisen, B. E. Kraftschik, C. R. Mubarak, R. M. Kriegel, and W. J. Koros, "Chain mobility, thermal, and mechanical properties of poly(ethylene furanoate) compared to poly(ethylene terephthalate)," *Macromolecules*, vol. 47, no. 4, pp. 1383–1391, 2014, doi: 10.1021/ma5000199.
- [161] M. Jiang, Q. Liu, Q. Zhang, C. Ye, and G. Zhou, "A series of furan-aromatic polyesters synthesized via direct esterification method based on renewable resources," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 50, no. 5, pp. 1026–1036, 2012, doi: 10.1002/pola.25859.
- [162] G. Z. Papageorgiou, V. Tsanaktis, and D. N. Bikiaris, "Synthesis of poly(ethylene furandicarboxylate) polyester using monomers derived from renewable resources: Thermal behavior comparison with PET and PEN," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 16, no. 17, pp. 7946–7958, 2014, doi: 10.1039/c4cp00518j.
- [163] G. Z. Papageorgiou, D. G. Papageorgiou, V. Tsanaktis, and D. N. Bikiaris, "Synthesis of the bio-based polyester poly(propylene 2,5-furan dicarboxylate). Comparison of thermal behavior and solid state structure with its terephthalate and naphthalate homologues," *Polymer (Guildf.)*, vol. 62, pp. 28–38, 2015, doi: 10.1016/j.polymer.2015.01.080.
- [164] V. Tsanaktis, G. Z. Papageorgiou, and D. N. Bikiaris, "A facile method to synthesize high-molecular-weight biobased polyesters from 2,5-furandicarboxylic acid and long-chain diols," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 53, no. 22, pp. 2617–2632, 2015, doi: 10.1002/pola.27730.
- [165] W. Zhou *et al.*, "Synthesis, physical properties and enzymatic degradation of bio-based poly(butylene adipate-co-butylene furandicarboxylate) copolyesters," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 98, no. 11, pp. 2177–2183, 2013, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2013.08.025.
- [166] Z. Shokri *et al.*, "Improvement of Laccase Activity Via Covalent Immobilization over Mesoporous Silica Coated Magnetic Multiwalled Carbon Nanotubes for the Discoloration of Synthetic Dyes," *Catalysts*, vol. 10, no. 11, pp. 2777–2789, 2021, doi: 10.1021/acsomega.0c05081.

- [167] S. K. Burgess, O. Karvan, J. R. Johnson, R. M. Kriegel, and W. J. Koros, "Oxygen sorption and transport in amorphous poly(ethylene furanoate)," *Polymer (Guildf.)*, vol. 55, no. 18, pp. 4748–4756, 2014, doi: 10.1016/j.polymer.2014.07.041.
- [168] S. K. Burgess, R. M. Kriegel, and W. J. Koros, "Carbon dioxide sorption and transport in amorphous poly(ethylene furanoate)," *Macromolecules*, vol. 48, no. 7, pp. 2184–2193, 2015, doi: 10.1021/acs.macromol.5b00333.
- [169] S. K. Burgess *et al.*, "Water sorption in poly(ethylene furanoate) compared to poly(ethylene terephthalate). Part 1: Equilibrium sorption," *Polymer (Guildf.)*, vol. 55, no. 26, pp. 6861–6869, 2014, doi: 10.1016/j.polymer.2014.10.047.
- [170] S. K. Burgess *et al.*, "Water sorption in poly(ethylene furanoate) compared to poly(ethylene terephthalate). Part 2: Kinetic sorption," *Polymer (Guildf.)*, vol. 55, no. 26, pp. 6870–6882, 2014, doi: 10.1016/j.polymer.2014.10.065.
- [171] Y. Jiang, A. J. J. Woortman, G. O. R. Alberda Van Ekenstein, D. M. Petrović, and K. Loos, "Enzymatic synthesis of biobased polyesters using 2,5-bis(hydroxymethyl) furan as the building block," *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 7, pp. 2482–2493, 2014, doi: 10.1021/bm500340w.
- [172] Y. Jiang, D. Maniar, A. J. J. Woortman, G. O. R. Alberda Van Ekenstein, and K. Loos, "Enzymatic Polymerization of Furan-2,5-Dicarboxylic Acid-Based Furanic-Aliphatic Polyamides as Sustainable Alternatives to Polyphthalamides," *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 11, pp. 3674–3685, 2015, doi: 10.1021/acs.biomac.5b01172.
- [173] Y. Jiang, A. J. J. Woortman, G. O. R. Alberda Van Ekenstein, and K. Loos, "A biocatalytic approach towards sustainable furanic-aliphatic polyesters," *Polym. Chem.*, vol. 6, no. 29, pp. 5198–5211, 2015, doi: 10.1039/c5py00629e.
- [174] J. C. Morales-Huerta, C. B. Ciulik, A. M. De Ilarduya, and S. Muñoz-Guerra, "Fully bio-based aromatic-aliphatic copolyesters: Poly(butylene furandicarboxylate-: Co -succinate)s obtained by ring opening polymerization," *Polym. Chem.*, vol. 8, no. 4, pp. 748–760, 2017, doi: 10.1039/c6py01879c.
- [175] D. Maniar, K. F. Hohmann, Y. Jiang, A. J. J. Woortman, J. Van Dijken, and K. Loos, "Enzymatic Polymerization of Dimethyl 2,5-Furandicarboxylate and Heteroatom Diamines," *ACS Omega*, vol. 3, no. 6, pp. 7077–7085, 2018, doi: 10.1021/acsomega.8b01106.
- [176] A. Pellis, J. W. Comerford, S. Weinberger, G. M. Guebitz, J. H. Clark, and T. J. Farmer, "Enzymatic synthesis of lignin derivable pyridine based polyesters for the substitution of petroleum derived plastics," *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41467-019-09817-3.
- [177] P. Skoczinski, M. K. Espinoza Cangahuala, D. Maniar, R. W. Albach, N. Bittner, and K. Loos, "Biocatalytic Synthesis of Furan-Based Oligomer Diols with Enhanced End-Group Fidelity," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 8, no. 2, pp. 1068–1086, 2020, doi: 10.1021/acssuschemeng.9b05874.

- [178] S. Thiyagarajan, W. Vogelzang, R. J. I. Knoop, A. E. Frissen, J. Van Haveren, and D. S. Van Es, "Biobased furandicarboxylic acids (FDCA): Effects of isomeric substitution on polyester synthesis and properties," *Green Chem.*, vol. 16, no. 4, pp. 1957–1966, 2014, doi: 10.1039/c3gc42184h.
- [179] J. C. Morales-Huerta, A. Martínez de Ilarduya, and S. Muñoz-Guerra, "Blocky poly(ϵ -caprolactone-co-butylene 2,5-furandicarboxylate) copolyesters via enzymatic ring opening polymerization," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 56, no. 3, pp. 290–299, 2018, doi: 10.1002/pola.28895.
- [180] A. Pellis, J. W. Comerford, A. J. Maneffa, M. H. Sipponen, J. H. Clark, and T. J. Farmer, "Elucidating enzymatic polymerisations: Chain-length selectivity of *Candida antarctica* lipase B towards various aliphatic diols and dicarboxylic acid diesters," *Eur. Polym. J.*, vol. 106, no. July, pp. 79–84, 2018, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.07.009.
- [181] A. Pellis, P. A. Hanson, J. W. Comerford, J. H. Clark, and T. J. Farmer, "Enzymatic synthesis of unsaturated polyesters: Functionalization and reversibility of the aza-Michael addition of pendants," *Polym. Chem.*, vol. 10, no. 7, pp. 843–851, 2019, doi: 10.1039/c8py01655k.
- [182] A. Pellis *et al.*, "Enlarging the tools for efficient enzymatic polycondensation: Structural and catalytic features of cutinase 1 from: *Thermobifida cellulossilytica*," *Catal. Sci. Technol.*, vol. 6, no. 10, pp. 3430–3442, 2016, doi: 10.1039/c5cy01746g.
- [183] A. Pellis, M. Vastano, F. Quartinello, E. Herrero Acero, and G. M. Guebitz, "His-Tag Immobilization of Cutinase 1 From *Thermobifida cellulossilytica* for Solvent-Free Synthesis of Polyesters," *Biotechnol. J.*, vol. 12, no. 10, pp. 1–6, 2017, doi: 10.1002/biot.201700322.
- [184] M. Vastano *et al.*, "Sustainable Galactarate-Based Polymers: Multi-Enzymatic Production of Pectin-Derived Polyesters," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 40, no. 22, 2019, doi: 10.1002/marc.201900361.
- [185] A. Pellis, S. Weinberger, M. Gigli, G. M. Guebitz, and T. J. Farmer, "Enzymatic synthesis of biobased polyesters utilizing aromatic diols as the rigid component," *Eur. Polym. J.*, vol. 130, no. April, p. 109680, 2020, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2020.109680.
- [186] B. Gewert, M. M. Plassmann, and M. Macleod, "Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment," *Environ. Sci. Process. Impacts*, vol. 17, no. 9, pp. 1513–1521, 2015, doi: 10.1039/c5em00207a.
- [187] W. C. Li, H. F. Tse, and L. Fok, "Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects," *Sci. Total Environ.*, vol. 566–567, pp. 333–349, 2016, doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.084.
- [188] M. Ponjavic, M. S. Nikolic, J. Nikodinovic-Runic, S. Jeremic, S. Stevanovic, and J. Djonlagic, "Degradation behaviour of PCL/PEO/PCL and PCL/PEO block copolymers under controlled hydrolytic, enzymatic and composting conditions," *Polym. Test.*, vol. 57, pp. 67–77, 2017, doi:

- 10.1016/j.polymertesting.2016.11.018.
- [189] M. Jamshidian, E. A. Tehrany, M. Imran, M. Jacquot, and S. Desobry, "Poly-Lactic Acid: Production, applications, nanocomposites, and release studies," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 9, no. 5, pp. 552–571, 2010, doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00126.x.
- [190] O. Wolf, M. Crank, and M. Patel, *Techno-economic feasibility of large-scale production of bio-based polymers in Europe*, no. February 2014. 2005. [Online]. Available: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Techno-economic+Feasibility+of+Large-scale+Production+of+Bio-based+Polymers+in+Europe#0%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Techno-economic+feasibility+of+large-sca>
- [191] B. Andreeßen, N. Taylor, and A. Steinbüchela, "Poly(3-hydroxypropionate): A promising alternative to fossil fuel-based materials," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 21, pp. 6574–6582, 2014, doi: 10.1128/AEM.02361-14.
- [192] P. Das and P. Tiwari, "Thermal degradation kinetics of plastics and model selection," *Thermochim. Acta*, vol. 654, no. March, pp. 191–202, 2017, doi: 10.1016/j.tca.2017.06.001.
- [193] Y. Tokiwa, B. P. Calabia, C. U. Ugwu, and S. Aiba, "Biodegradability of plastics," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 9, pp. 3722–3742, 2009, doi: 10.3390/ijms10093722.
- [194] A. A. Shah, F. Hasan, A. Hameed, and S. Ahmed, "Biological degradation of plastics: A comprehensive review," *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, no. 3, pp. 246–265, 2008, doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005.
- [195] A. Göpferich, "Mechanisms of polymer degradation and erosion1," *Biomater. Silver Jubil. Compend.*, vol. 17, no. 2, pp. 117–128, 1996, doi: 10.1016/B978-008045154-1.50016-2.
- [196] N. S. Allen and M. Edge, *Fundamentals of polymer degradation and stabilisation*. London, 1992.
- [197] T. Artham and M. Doble, "Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates," *Macromol. Biosci.*, vol. 8, no. 1, pp. 14–24, 2008, doi: 10.1002/mabi.200700106.
- [198] P. M.J., *Microbiology: Application Based Approach*, Tata McGra. 2017.
- [199] K. Leja and G. Lewandowicz, "Polymer biodegradation and biodegradable polymers - A review," *Polish J. Environ. Stud.*, vol. 19, no. 2, pp. 255–266, 2010.
- [200] S. M. Emadian, T. T. Onay, and B. Demirel, "Biodegradation of bioplastics in natural environments," *Waste Manag.*, vol. 59, pp. 526–536, 2017, doi: 10.1016/j.wasman.2016.10.006.

-
- [201] M. Van Der Zee, J. H. Stoutjesdijk, P. A. A. W. Van Der Heijden, and D. D. W. I, "Structure-Biodegradation Relationships of Polymeric Materials . 1 . Effect of Degree of Oxidation on Biodegradability of Carbohydrate Polymers," vol. 3, no. 4, 1995.
- [202] A. L. Andrady, "Reviews in Macromolecular Chemistry & Physics," *J. Macromol. Sci.*, vol. C34, 25, p. 1994, 1994.
- [203] A. L. Andrady, *Handbook of Polymer Degradation*, 2nd Editio. New York, NY, USA, 2000.
- [204] M. Mochizuki, M. Hirano, Y. Kanmuri, and K. Kudo, "Hydrolysis of Polycaprolactone Fibers by Lipase: Effects of Draw Ratio on Enzymatic Degradation," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 55, p. 289, 1995.
- [205] I. Arvanitoyannis, E. Nikolaou, and N. Yamamoto, *Novel biodegradable copolyamides based on adipic acid , bis (p-aminocyclohexyl) methane and several a-amino acids: synthesis , characterization and study of their degradability for food packaging applications : 4*, vol. 35, no. 21. 1994.
- [206] S. Matsumura, Y. Shimura, K. Toshima, M. Tsuji, and T. Hatanaka, *Macromolecular Chemistry and Physics*. 1995.
- [207] W. G. Glasser, B. K. McCartney, and G. Samaranayake, "Cellulose Derivatives with Low Degree of Substitution . 3 . The Biodegradability of Cellulose Esters Using a Simple Enzyme Assay," pp. 214–219, 1994.
- [208] J. M. Mayer and D. L. Kaplan, *Biodegradable Polymers and Packaging*. Lancaster, PA, USA, 1993.
- [209] ASTM G21-09, "Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi," Philadelphia, PA, USA, 2009.
- [210] ISO 846:1997, "Plastics – Evaluation of the Action of Microorganisms," Genève, Switzerland, 1997.
- [211] K. J. Seal, *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers*. London, UK: Blackie Academic and Professional, 1994.
- [212] ISO 9408:1999(E), "Water quality – Evaluation of Ultimate Aerobic Biodegradability of Organic Compounds in Aqueous Medium by Determination of Oxygen Demand in a Closed Respirometer," Genève, Switzerland, 1999.
- [213] ISO 10708:1997(E), "Water quality - Evaluation in an Aqueous Medium of the Ultimate Aerobic Biodegradability of Organic Compounds - Determination of Biochemical Oxygen Demand in a Two-phase Closed Bottle Test," Genève, Switzerland, 1997.
- [214] OECD 301D, "Ready Biodegradability: Closed Bottle Test, Guidelines for Testing of Chemicals, Organisation for Economic Co-operation and Development," Paris, France, 1992.

- [215] OECD 302C, "Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), Guidelines for Testing of Chemicals, Organisation for Economic Co-operation and Development," Paris, France, 2009.
- [216] ISO 14851:2004(E), "Determination of the Ultimate Aerobic Biodegradability of Plastic Materials in an Aqueous Medium – Method by Determining the Oxygen Demand in a Closed Respirometer.," Genève, Switzerland, 2004.
- [217] EN 14048:2003, "Packaging – Determination of the Ultimate Aerobic Biodegradability of Packaging Materials in an Aqueous Medium – Method by Measuring the Oxygen Demand in a Closed Respirometer," Brussels, Belgium, 2003.
- [218] OECD 301F, "Ready Biodegradability: Manometric Respirometry Test, Guidelines for Testing of Chemicals," Paris, France, 1992.
- [219] L. Tilstra and D. Johnsonbaugh, "A test method to determine rapidly if polymers are biodegradable," *J. Environ. Polym. Degrad.*, vol. 1, no. 4, pp. 247–255, 1993, doi: 10.1007/BF01458291.
- [220] STM D5209-92, "Standard Test Method for Determining the Aerobic Biodegradation of Plastic Materials in the Presence of Municipal Sewage Sludge, American Society for Testing and Materials, PA, USA, 1992.," PA, USA, 1992.
- [221] ISO 9439:2000(E), "Water Quality – Evaluation of Ultimate Aerobic Biodegradability of Organic Compounds in Aqueous Medium – Carbon Dioxide Evolution Test," Genève, Switzerland, 2000.
- [222] ASTM D6691-09, "Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials in the Marine Environment by a Defined Microbial Consortium," PA, USA, 2009.
- [223] ASTM D5338-11, "Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials under Controlled Composting Conditions. Incorporating Thermophilic Temperatures," PA, USA, 2011.
- [224] EN 14046:2003, "Evaluation of the ultimate aerobic biodegradability and disintegration of packaging materials under controlled composting conditions - Method by analysis of released carbon dioxide," Brussels, Belgium, 2003.
- [225] ASTM D5210-92, "Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation of Plastic Materials in the Presence of Municipal Sewage Sludge," PA, USA, 2007.
- [226] ISO 11734:1998(E), "Water quality – Evaluation of the "Ultimate" Anaerobic Biodegradability of Organic Compounds in Digested Sludge – Method by Measurement of the Biogas Production," Genève, Switzerland, 1998.
- [227] ASTM D5511-11, "Standard Test Method for Determining Anaerobic Biodegradation of Plastic Materials under High-Solids Anaerobic-Digestion Conditions," PA, USA, 2011.

- [228] ASTM D5526-94(2011)e1, "Standard Test Method for Determining Anaerobic Biodegradation of Plastic Materials Under Accelerated Landfill Conditions," PA, USA, 2011.
- [229] A. L. Allen, J. Mayer, R. Stote, and D. L. Kaplan, "Simulated marine respirometry of biodegradable polymers," *J. Environ. Polym. Degrad.*, vol. 2, no. 4, pp. 237–244, 1994, doi: 10.1007/BF02071971.
- [230] R. Courtes, A. Bahlaoui, A. Rambaud, F. Deschamps, E. Sunde, and E. Dutrieux, "Ready biodegradability test in seawater: A new methodological approach," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 31, no. 2, pp. 142–148, 1995. doi: 10.1006/eesa.1995.1054.
- [231] C. Bastioli, *Handbook of biodegradable polymers*. De Gruyter, 2020. doi: 10.1515/9781501511967.
- [232] P. Barak, Y. Coquet, T. R. Halbach, and J. A. E. Molina, "Organic chemicals in the environment: Biodegradability of polyhydroxybutyrate(co-hydroxyvalerate) and starch-incorporated polyethylene plastic films in soils," *J. Environ. Qual.*, vol. 20, no. 1, pp. 173–179, 1991.
- [233] U. Pagga, A. Schäfer, R. J. Müller, and M. Pantke, "Determination of the aerobic biodegradability of polymeric material in aquatic batch tests," *Chemosphere*, vol. 42, no. 3, pp. 319–331, 2001, doi: 10.1016/S0045-6535(00)00069-2.
- [234] U. Pagga, D. B. Beimborn, and M. Yamamoto, "Biodegradability and Compostability of Polymers-Test Methods and Criteria for Evaluation," *J. Environ. Polym. Degrad.*, vol. 4, no. 3, pp. 173–178, 1996, doi: 10.1007/bf02067451.
- [235] M. Tosin, F. Degli-Innocenti, and C. Bastioli, "Detection of a toxic product released by a polyurethane-containing film using a composting test method based on a mineral bed," *J. Environ. Polym. Degrad.*, vol. 6, no. 2, pp. 79–90, 1998.
- [236] G. Bellia, M. Tosin, G. Floridi, and F. Degli-Innocenti, "Activated vermiculite, a solid bed for testing biodegradability under composting conditions," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 66, no. 1, pp. 65–79, 1999, doi: 10.1016/S0141-3910(99)00053-1.
- [237] J. Pleiss and H. Carvalho, "Chapter 9: Substrate Binding Free Energy Profiles: Probing Enzyme-Substrate Interactions by Molecular Dynamics Simulations," in *Peptide and Protein Engineering for Biotechnological and Therapeutic Applications*, 2023, pp. 353–370. doi: https://doi.org/10.1142/9789811261664_0009.
- [238] A. J. Mulholland, "Modelling enzyme reaction mechanisms, specificity and catalysis," *Drug Discov. Today*, vol. 10, no. 20, pp. 1393–1402, Oct. 2005, doi: 10.1016/S1359-6446(05)03611-1.
- [239] A. Zaks and A. M. Klivanov, "Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents," *J. Biol. Chem.*, vol. 263, no. 7, pp. 3194–3201, Mar. 1988.

- [240] Alexander M. Klibanov, "Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents.," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 11, no. 4, pp. 194–211, 1989.
- [241] A. P.T. and W. J.C., *Green chemistry: Theory and Practice*, Oxford Uni. 1998.
- [242] A. Pellis *et al.*, "Biocatalyzed approach for the surface functionalization of poly(L-lactic acid) films using hydrolytic enzymes," *Biotechnol. J.*, vol. 10, no. 11, pp. 1739–1749, 2015, doi: 10.1002/biot.201500074.
- [243] D. Ribitsch *et al.*, "A new esterase from *Thermobifida halotolerans* hydrolyses polyethylene terephthalate (PET) and polylactic acid (PLA)," *Polymers (Basel)*, vol. 4, no. 1, pp. 617–629, 2012, doi: 10.3390/polym4010617.
- [244] O. Kirk, T. V. Borchert, and C. C. Fuglsang, "Industrial enzyme applications.," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 13, no. 4, pp. 345–351, Aug. 2002, doi: 10.1016/s0958-1669(02)00328-2.
- [245] V. Tserki, P. Matzinos, E. Pavlidou, D. Vachliotis, and C. Panayiotou, "Biodegradable aliphatic polyesters. Part I. Properties and biodegradation of poly(butylene succinate-co-butylene adipate)," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 91, no. 2, pp. 367–376, 2006, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2005.04.035.
- [246] Y. Kumagai and Y. Doi, "Enzymatic degradation and morphologies of binary blends of microbial poly(3-hydroxy butyrate) with poly(ϵ -caprolactone), poly(1,4-butylene adipate and poly(vinyl acetate)," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 36, no. 3, pp. 241–248, 1992, doi: 10.1016/0141-3910(92)90062-A.
- [247] H. Frauenfelder, S. G. Sligar, and P. G. Wolynes, "The Energy Landscapes and Motions of Proteins," vol. 254, pp. 1598–1603, 1991.
- [248] P. G. Wolynes, "Recent successes of the energy landscape theory of protein folding and function," *Q. Rev. Biophys.*, vol. 38, no. 4, pp. 405–410, 2005, doi: 10.1017/S0033583505004075.
- [249] T. Schlick, *Molecular Modeling and Simulation . An Interdisciplinary Guide*, 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 2010.
- [250] H. J. C. Berendsen, D. van der Spoel, and R. van Drunen, "GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation," *Comput. Phys. Commun.*, vol. 91, no. 1–3, pp. 43–56, 1995, doi: 10.1016/0010-4655(95)00042-E.
- [251] D. Van Der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark, and H. J. C. Berendsen, "GROMACS: Fast, flexible, and free," *J. Comput. Chem.*, vol. 26, no. 16, pp. 1701–1718, 2005, doi: 10.1002/jcc.20291.
- [252] D. van der Spoel *et al.*, "Gromacs User Manual version 4.0," *Manuals*, p. 308, 2005, [Online]. Available: www.gromacs.org
- [253] B. Hess, C. Kutzner, D. Van Der Spoel, and E. Lindahl, "GRGMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation," *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 4, no. 3, pp. 435–447, 2008, doi:

10.1021/ct700301q.

- [254] B. J. Mcconkey, V. Sobolev, M. Edelman, B. J. Mcconkey, V. Sobolev, and M. Edelman, "The performance of current methods in ligand-protein docking," vol. 83, no. 7, pp. 845–856, 2002.
- [255] A. Macchiarulo, I. Nobeli, and J. M. Thornton, "Ligand selectivity and competition between enzymes in silico," vol. 22, no. 8, pp. 1039–1045, 2004, doi: 10.1038/nbt999.
- [256] A. D. Favia, I. Nobeli, F. Glaser, and J. M. Thornton, "Molecular Docking for Substrate Identification : The Short-Chain Dehydrogenases / Reductases," vol. 375, pp. 855–874, 2008, doi: 10.1016/j.jmb.2007.10.065.
- [257] J. Gu, J. Liu, and H. Yu, "Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Quantitative prediction of enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B by combining docking simulations and quantitative structure – activity relationship (QSAR) analysis," *Journal Mol. Catal. B, Enzym.*, vol. 72, no. 3–4, pp. 238–247, 2011, doi: 10.1016/j.molcatb.2011.06.011.
- [258] G. G. Hammes, "Multiple conformational changes in enzyme catalysis.," *Biochemistry*, vol. 41, no. 26, pp. 8221–8228, Jul. 2002, doi: 10.1021/bi0260839.
- [259] X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, and M. Cui, "Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery.," *Curr. Comput. Aided. Drug Des.*, vol. 7, no. 2, pp. 146–157, Jun. 2011, doi: 10.2174/157340911795677602.
- [260] A. Allouche, "Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares," *J. Comput. Chem.*, vol. 32, pp. 174–182, 2012, doi: 10.1002/jcc.
- [261] R. Huey and G. M. Morris, "Using AutoLigand with AutoDockTools : A Tutorial," no. August, pp. 1–69, 2003.
- [262] L. Jouanin and C. Lapierre, *Lignins: biosynthesis, biodegradation and bioengineering*, Vol. 61. Academic Press, 2012.
- [263] H. V. Scheller and P. Ulvskov, "Hemicelluloses," *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 61, pp. 263–289, 2010, doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112315.
- [264] P. Mäki-Arvela, T. Salmi, B. Holmbom, S. Willför, and D. Y. Murzin, "Synthesis of sugars by hydrolysis of hemicelluloses- A review," *Chem. Rev.*, vol. 111, no. 9, pp. 5638–5666, 2011, doi: 10.1021/cr2000042.
- [265] Y. Habibi, L. A. Lucia, and O. J. Rojas, "Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications," *Chem. Rev.*, vol. 110, no. 6, pp. 3479–3500, 2010, doi: 10.1021/cr900339w.
- [266] B. C. Gross, J. L. Erkal, S. Y. Lockwood, C. Chen, and D. M. Spence, "Evaluation of 3D printing and its potential impact on biotechnology and the chemical

- sciences," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 7, pp. 3240–3253, 2014, doi: 10.1021/ac403397r.
- [267] C. J. Ferris, K. G. Gilmore, G. G. Wallace, and M. In het Panhuis, "Biofabrication: an overview of the approaches used for printing of living cells," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 10, pp. 4243–4258, May 2013, doi: 10.1007/s00253-013-4853-6.
- [268] A. Bandyopadhyay, S. Bose, and S. Das, "3D printing of biomaterials," *MRS Bull.*, vol. 40, no. 2, pp. 108–114, 2015, doi: 10.1557/mrs.2015.3.
- [269] S. A. Khaled, J. C. Burley, M. R. Alexander, and C. J. Roberts, "Desktop 3D printing of controlled release pharmaceutical bilayer tablets," *Int. J. Pharm.*, vol. 461, no. 1–2, pp. 105–111, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.11.021.
- [270] R. Kolakovic, T. Viitala, P. Ihalainen, N. Genina, J. Peltonen, and N. Sandler, "Printing technologies in fabrication of drug delivery systems," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 10, no. 12, pp. 1711–1723, Dec. 2013, doi: 10.1517/17425247.2013.859134.
- [271] N. Sandler and M. Preis, "Printed Drug-Delivery Systems for Improved Patient Treatment," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 37, no. 12, pp. 1070–1080, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.tips.2016.10.002.
- [272] C. K. Chua and W. Y. Yeong, *Bioprinting Principles and Applications*, World Scie. 2015.
- [273] S. Sen, J. D. Martin, and D. S. Argyropoulos, "Review of cellulose non-derivatizing solvent interactions with emphasis on activity in inorganic molten salt hydrates," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 1, no. 8, pp. 858–870, 2013, doi: 10.1021/sc400085a.
- [274] V. Madhavi and S. S. Lele, "Laccase: properties and applications," *Bioresources*, vol. 4, no. 1994, pp. 1–24, 2009.
- [275] P. Baldrian, "Fungal laccases-occurrence and properties," *FEMS Microbiol Rev*, vol. 30, pp. 215–242, 2006, doi: 10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x.
- [276] D. M. Mate and M. Alcalde, "Laccase engineering: From rational design to directed evolution," *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 1, pp. 25–40, 2015, doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.007.
- [277] P. Singh, C. Bindi, and G. Arunika, "Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications," *3 Biotech*, vol. 7, no. 5, pp. 1–20, 2017, doi: 10.1007/s13205-017-0955-7.
- [278] M. Mogharabi and M. Ali, "Laccase and Laccase-Mediated Systems in the Synthesis of Organic Compounds," *Adv. Synth. Catal.*, vol. 356, pp. 897–927, 2014, doi: 10.1002/adsc.201300960.
- [279] S. Roth and A. C. Spiess, "Laccases for biorefinery applications: a critical

-
- review on challenges and perspectives," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 38, no. 12, pp. 2285–2313, 2015, doi: 10.1007/s00449-015-1475-7.
- [280] T. Senthivelan, J. Kanagaraj, and R. C. Panda, "Recent Trends in Fungal Laccase for Various Industrial Applications: An Eco-friendly Approach - A Review," vol. 38, pp. 19–38, 2016, doi: 10.1007/s12257-015-0278-7.
- [281] S. R. Couto, J. Luis, and T. Herrera, "Industrial and biotechnological applications of laccases: A review," vol. 24, pp. 500–513, 2006, doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.04.003.
- [282] H. V Prajapati and F. P. Minocheherhomji, "Laccase - A Wonder Molecule: A Review of its Properties and Applications," *Int. J. Pure App. Biosci.*, vol. 6, no. 1, pp. 766–773, 2018.
- [283] C. Pezzella, L. Guarino, and A. Piscitelli, "How to enjoy laccases," *Cell. Mol. Life Sci.*, pp. 923–940, 2015, doi: 10.1007/s00018-014-1823-9.
- [284] T. Kudanga and M. Le Roes-hill, "Laccase applications in biofuels production: current status and future prospects," *Appl Microbiol Biotechnol.*, pp. 6525–6542, 2014, doi: 10.1007/s00253-014-5810-8.
- [285] A. Kunamneni, S. Camarero, C. García-burgos, F. J. Plou, A. Ballesteros, and M. Alcalde, "Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis," *Microb. Cell Fact.*, vol. 17, pp. 1–17, 2008, doi: 10.1186/1475-2859-7-32.
- [286] J. Polaina and A. P. MacCabe, *Industrial enzymes: Structure, function and applications*. 2007. doi: 10.1007/1-4020-5377-0.
- [287] N. Saraiva, B. Bandeira, and M. Pessoa, "Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications," *Process Biochem.*, vol. 75, no. July, pp. 99–120, 2018, doi: 10.1016/j.procbio.2018.09.003.
- [288] J. Lopes *et al.*, "Lipase from *Yarrowia lipolytica*: Prospects as an Industrial Biocatalyst for Biotechnological Applications," *Fermentation*, vol. 9, pp. 4–37, 2023.
- [289] C. Mateo, J. M. Palomo, G. Fernandez-lorente, J. M. Guisan, and R. Fernandez-lafuente, "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 40, pp. 1451–1463, 2007, doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.01.018.
- [290] M. Mohammadi, M. Ali, P. Salehi, M. Yousefi, M. Nazari, and J. Brask, "Immobilization of laccase on epoxy-functionalized silica and its application in biodegradation of phenolic compounds," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 109, pp. 443–447, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.102.
- [291] A. A. Kadam, J. Jang, S. Cheol, J. Sung, and D. Sung, "Chitosan-functionalized supermagnetic halloysite nanotubes for covalent laccase immobilization," *Carbohydr. Polym.*, vol. 194, no. February, pp. 208–216, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.04.046.

- [292] A. A. Kadam, J. Jang, and D. S. Lee, "Supermagnetically tuned halloysite nanotubes functionalized with aminosilane for covalent laccase immobilization," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 18, pp. 15492–15501, 2017.
- [293] M. Marysková, I. Ardao, C. A. García-González, L. Martinová, J. Rotková, and A. Ševců, "Polyamide 6/chitosan nanofibers as support for the immobilization of *Trametes versicolor* laccase for the elimination of endocrine disrupting chemicals," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 89, pp. 31–38, 2016, doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.03.001.
- [294] T. Anh, C. Fu, and R. Juang, "Effective removal of sulfur dyes from water by biosorption and subsequent immobilized laccase degradation on crosslinked chitosan beads," *Chem. Eng. J.*, vol. 304, pp. 313–324, 2016, doi: 10.1016/j.cej.2016.06.102.
- [295] R. Amin, A. Khorshidi, A. Fallah, S. Rezaei, and M. Ali, "Immobilization of laccase on modified Fe₃O₄@SiO₂@ Kit-6 magnetite nanoparticles for enhanced delignification of olive pomace bio-waste," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 114, pp. 106–113, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.086.
- [296] Z. Gao *et al.*, "Co-immobilization of laccase and TEMPO onto amino-functionalized magnetic - nanoparticles and its application in acid fuchsin decolorization," *Bioresour. Bioprocess.*, vol. 5, no. 27, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1186/s40643-018-0215-7.
- [297] H. Yuan, L. Chen, F. F. Hong, and M. Zhu, "Evaluation of nanocellulose carriers produced by four different bacterial strains for laccase immobilization," *Carbohydr. Polym.*, vol. 196, no. May, pp. 457–464, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.05.055.
- [298] R. Tarasi, A. Yousefi-ahmadipour, M. R. Ganjali, and M. Khoobi, "Laccase Immobilization onto Magnetic β -Cyclodextrin-Modified Chitosan: Improved Enzyme Stability and Efficient Performance for," *Macromol. Res.*, pp. 755–762, 2018, doi: 10.1007/s13233-018-6095-z.
- [299] D. Cao, W. Cheng, K. Tao, and Y. Liang, "Preparation of Polydopamine-Modified 3D Interconnected Macroporous Silica for Laccase Immobilization," *Macromol. Res.*, vol. 26, no. 7, pp. 616–622, 2018, doi: 10.1007/s13233-018-6087-z.
- [300] A. Sihem, H. Kacem, S. Galai, A. Pérez, and D. L. Ríos, "New efficient laccase immobilization strategy using ionic liquids for biocatalysis and microbial fuel cells applications," *J Chem Technol Biotechnol*, vol. 93, pp. 174–183, 2018, doi: 10.1002/j.
- [301] M. Vera, C. Fodor, Y. Garcia, E. Pereira, K. Loos, and B. L. Rivas, "Multienzymatic immobilization of laccases on polymeric microspheres: A strategy to expand the maximum catalytic efficiency," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 137, no. 47, 2020, doi: 10.1002/app.49562.
- [302] Y. Zhu, S. Kaskel, J. Shi, T. Wage, and K. H. Van Pée, "Immobilization of *Trametes versicolor* laccase on magnetically separable mesoporous silica

- spheres," *Chem. Mater.*, vol. 19, no. 26, pp. 6408–6413, 2007, doi: 10.1021/cm071265g.
- [303] E. Wu, Y. Li, Q. Huang, Z. Yang, A. Wei, and Q. Hu, "Laccase immobilization on amino-functionalized magnetic metal organic framework for phenolic compound removal," *Chemosphere*, vol. 233, pp. 327–335, 2019, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.05.150.
- [304] M. Vera, G. S. Nyanhongo, G. M. Guebitz, and B. L. Rivas, "Polymeric microspheres as support to co-immobilized *Agaricus bisporus* and *Trametes versicolor* laccases and their application in diazinon degradation," *Arab. J. Chem.*, vol. 13, no. 2, pp. 4218–4227, 2020, doi: 10.1016/j.arabjc.2019.07.003.
- [305] M. Sarno and M. Iuliano, "Highly-efficient immobilized laccase on magnetic support for removal aniline," *Chem. Eng. Trans.*, vol. 84, no. November 2020, pp. 199–204, 2021, doi: 10.3303/CET2184034.
- [306] A. Babadostu, O. K. Guldu, D. O. Demirkol, E. I. Medine, P. Unak, and S. Timur, "Affinity based laccase immobilization on modified magnetic nanoparticles: Biosensing platform for the monitoring of phenolic compounds," *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 64, no. 5, pp. 260–266, 2015, doi: 10.1080/00914037.2014.936598.
- [307] S. Smith, K. Goodge, M. Delaney, A. Struzyk, N. Tansey, and M. Frey, "A comprehensive review of the covalent immobilization of biomolecules onto electrospun nanofibers," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 11, pp. 1–39, 2020, doi: 10.3390/nano10112142.
- [308] Z. Shokri, F. Seidi, S. Karami, C. Li, M. R. Saeb, and H. Xiao, "Laccase immobilization onto natural polysaccharides for biosensing and biodegradation.," *Carbohydr. Polym.*, vol. 262, p. 117963, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.117963.
- [309] C. Melo, L. Silva, L. Costa, and M. Marques, "Synergistic Effect of Adsorption and Enzymatic Conversion in the Bisphenol-A Removal by Laccase Immobilized on Poly(glycidyl methacrylate-co-ethyleneglycol dimethacrylate)," *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 28, pp. 2192–2201, 2017, doi: 10.21577/0103-5053.20170070.
- [310] M. Primožič, G. Kravanja, Ž. Knez, A. Crnjac, and M. Leitgeb, "Immobilized laccase in the form of (magnetic) cross-linked enzyme aggregates for sustainable diclofenac (bio)degradation," *J. Clean. Prod.*, vol. 275, 2020, doi: 10.1016/j.jclepro.2020.124121.
- [311] G. Bayramoglu, M. Yilmaz, and M. Yakup Arica, "Preparation and characterization of epoxy-functionalized magnetic chitosan beads: laccase immobilized for degradation of reactive dyes.," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 33, no. 4, pp. 439–448, May 2010, doi: 10.1007/s00449-009-0345-6.
- [312] V. Ferrario *et al.*, "Conformational changes of lipases in aqueous media: A comparative computational study and experimental implications," *Adv. Synth.*

- Catal.*, vol. 353, no. 13, pp. 2466–2480, 2011, doi: 10.1002/adsc.201100397.
- [313] M. Borjian Boroujeni, M. Shahbazi Dastjerdeh, M. A. Shokrgozar, H. Rahimi, and E. Omidinia, "Computational driven molecular dynamics simulation of keratinocyte growth factor behavior at different pH conditions," *Informatics Med. Unlocked*, vol. 23, no. December 2020, p. 100514, 2021, doi: 10.1016/j.imu.2021.100514.
- [314] P. Trodler and J. Pleiss, "Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents," *BMC Struct. Biol.*, vol. 8, pp. 1–10, 2008, doi: 10.1186/1472-6807-8-9.
- [315] A. Todea *et al.*, "Rational Guidelines for the Two-Step Scalability of Enzymatic Polycondensation: Experimental and Computational Optimization of the Enzymatic Synthesis of Poly(glycerolazelate)," *ChemSusChem*, vol. 15, no. 9, 2022, doi: 10.1002/cssc.202102657.
- [316] S. Borhani and S. S. Arab, "Investigation of thermal stability characteristic in family A DNA polymerase - A theoretical study," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 182, no. May, pp. 15–25, 2023, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2023.05.003.
- [317] R. E. Hubbard and M. K. Haider, "Hydrogen Bonds in Proteins: Role and Strength," *Encycl. Life Sci.*, 2010, doi: 10.1002/9780470015902.a0003011.pub2.
- [318] A. Maraite, P. Hoyos, J. D. Carballeira, Á. C. Cabrera, M. B. Ansorge-Schumacher, and A. R. Alcántara, "Lipase from *Pseudomonas stutzeri*: Purification, homology modelling and rational explanation of the substrate binding mode," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 87, pp. 88–98, 2013, doi: 10.1016/j.molcatb.2012.11.005.
- [319] P. Braiuca, G. Cruciani, C. Ebert, L. Gardossi, and P. Linda, "An innovative application of the 'flexible' GRID/PCA computational method: Study of differences in selectivity between PGAs from *Escherichia coli* and a *Providentia rettgeri* mutant," *Biotechnol. Prog.*, vol. 20, no. 4, pp. 1025–1031, 2004, doi: 10.1021/bp0342708.
- [320] S. Fortuna, M. Cesugli, A. Todea, A. Pellis, and L. Gardossi, "Criteria for engineering cutinases: Bioinformatics analysis of catalophores," *Catalysts*, vol. 11, no. 7, pp. 1–16, 2021, doi: 10.3390/catal11070784.
- [321] E. U. X. Péres, F. G. de Souza, F. M. Silva, J. A. Chaker, and P. A. Z. Suarez, "Biopolyester from ricinoleic acid: Synthesis, characterization and its use as biopolymeric matrix for magnetic nanocomposites," *Ind. Crops Prod.*, vol. 59, pp. 260–267, 2014, doi: 10.1016/j.indcrop.2014.05.031.
- [322] C. G. Boeriu, A. Todea, I. W. C. E. Arends, and L. G. Otten, "Production of fatty acid estolides," US010920252B2, 2016
- [323] U. Biermann, U. T. Bornscheuer, I. Feussner, M. A. R. Meier, and J. O. Metzger, "Fatty Acids and their Derivatives as Renewable Platform Molecules for the Chemical Industry Angewandte," vol. 60, pp. 20144–20165, 2021, doi:

10.1002/anie.202100778.

- [324] A. Todea *et al.*, "One-pot biocatalytic conversion of lactose to gluconic acid and galacto-oligosaccharides using immobilized β -galactosidase and glucose oxidase," *Catal. Today*, vol. 366, no. August 2020, pp. 202–211, 2021, doi: 10.1016/j.cattod.2020.06.090.
- [325] A. Todea *et al.*, "Optimization of enzymatic ring-opening copolymerizations involving δ -gluconolactone as monomer by experimental design," *Pure Appl. Chem.*, vol. 86, no. 11, pp. 1781–1792, 2014, doi: 10.1515/pac-2014-0717.
- [326] I. Bîtcă *et al.*, "One-pot green synthesis and characterization of novel furan-based oligoesters," *Sustain. Chem. Pharm.*, vol. 35, p. 101229, 2023, doi: 10.1016/j.scp.2023.101229.
- [327] C. L. Esposito, P. Kirilov, and V. G. Roullin, "Organogels, promising drug delivery systems: an update of state-of-the-art and recent applications," *J. Control. Release*, vol. 271, pp. 1–20, 2018, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.12.019.
- [328] G. Englezou *et al.*, "2-Methyltetrahydrofuran (2-MeTHF) as a versatile green solvent for the synthesis of amphiphilic copolymers via ROP, FRP, and RAFT tandem polymerizations," *J. Polym. Sci.*, vol. 58, no. 11, pp. 1571–1581, 2020, doi: 10.1002/pol.20200183.
- [329] F. Zappaterra *et al.*, "Understanding Marine Biodegradation of Bio-Based Oligoesters and Plasticizers," *Polymers (Basel)*, vol. 15, no. 6, 2023, doi: 10.3390/polym15061536.
- [330] K. Min, J. D. Cuiffi, and R. T. Mathers, "Ranking environmental degradation trends of plastic marine debris based on physical properties and molecular structure," *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14538-z.
- [331] I. Bîtcă *et al.*, "Enzymatic route for selective glycerol oxidation using covalently immobilized laccases," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 163, no. December 2022, 2023, doi: 10.1016/j.enzmictec.2022.110168.
- [332] M. Spennato *et al.*, "Turning biomass into functional composite materials : Rice husk for fully renewable immobilized biocatalysts," *EFB Bioeconomy J.*, vol. 1, 2021, doi: 10.1016/j.bioeco.2021.100008.
- [333] C. S. Hong, S. Y. Chin, C. K. Cheng, M. M. Sabri, and G. K. Chua, "Enzymatic Conversion of Glycerol to Glyceric Acid with Immobilised Laccase in Na-Alginate Matrix," *Procedia Chem.*, vol. 16, pp. 632–639, 2015, doi: 10.1016/j.proche.2015.12.102.
- [334] C. S. Hong, S. Y. Chin, C. Kui Cheng, and G. K. Chua, "Selective oxidation of glycerol to mesoxalic acid by laccase/2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl system: Effect of process conditions and the kinetic modeling," *Chem. Eng. Commun.*, vol. 206, no. 12, pp. 1645–1660, 2019, doi: 10.1080/00986445.2019.1566128.

- [335] S. Liebminger, M. Siebenhofer, and G. Guebitz, "Oxidation of glycerol by 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) in the presence of laccase," *Bioresour. Technol.*, vol. 100, no. 20, pp. 4541–4545, 2009, doi: 10.1016/j.biortech.2009.04.051.
- [336] M. Fabbrini, C. Galli, and P. Gentili, "Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 16, pp. 231–240, 2002.
- [337] A. I. Cañas and S. Camarero, "Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, pp. 694–705, 2010, doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.002.
- [338] A. Todea, A. Hiseni, L. G. Otten, I. W. C. E. Arends, F. Peter, and C. G. Boeriu, "Increase of stability of oleate hydratase by appropriate immobilization technique and conditions," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 119, pp. 40–47, 2015, doi: 10.1016/j.molcatb.2015.05.012.
- [339] I. Bassanini, S. Grosso, C. Tognoli, G. Fronza, and S. Riva, "Studies on the Oxidation of Aromatic Amines Catalyzed by *Trametes versicolor* Laccase," *Int. J. Mol. Sci. Artic.*, vol. 24, p. 3524, 2023.
- [340] J. Rodakiewicz-Nowak, S. M. Kasture, B. Dudek, and J. Haber, "Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 11, pp. 1–11, 2000.
- [341] R. C. Rodrigues, D. Carballares, R. Morellon-sterling, and R. Fernandez-lafuente, "Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies," *Biotechnol. Adv.*, vol. 52, 2021, doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107821.
- [342] S. K. S. Patel, R. K. Gupta, S.-Y. Kim, I.-W. Kim, V. C. Kalia, and J.-K. Lee, "Rhus vernicifera Laccase Immobilization on Magnetic Nanoparticles to Improve Stability and Its Potential Application in Bisphenol A Degradation.," *Indian J. Microbiol.*, vol. 61, no. 1, pp. 45–54, Mar. 2021, doi: 10.1007/s12088-020-00912-4.
- [343] C. Vasilescu *et al.*, "Enzymatic synthesis of short-chain flavor esters from natural sources using tailored magnetic biocatalysts.," *Food Chem.*, vol. 296, pp. 1–8, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.179.
- [344] A. A. Kadam *et al.*, "Recent Advances in the Development of Laccase-Based Biosensors via Nano-Immobilization Techniques," *Chemosensors*, vol. 10, no. 2, pp. 1–27, 2022, doi: 10.3390/chemosensors10020058.
- [345] Eda Ayse Aksoy, S. Aksoy, N. A. Kalkan, and N. Hasirci, "Preparation of Chitosan-Coated Magnetite Nanoparticles and Application for Immobilization of Laccase," *J. Appl. Polym. Sci.*, pp. 707–716, 2012, doi: 637-1282.
- [346] X. Hu, X. Zhao, and H. min Hwang, "Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite," *Chemosphere*, vol. 66, no. 9, pp. 1618–1626, 2007, doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.08.004.

- [347] S. Georgieva *et al.*, "Non-isothermal bioremediation of waters polluted by phenol and some of its derivatives by laccase covalently immobilized on polypropylene membranes," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 66, no. 1–2, pp. 210–218, 2010, doi: 10.1016/j.molcatb.2010.05.011.
- [348] D. Tugban, E. Bayram, L. Uzun, S. Şenel, and A. Denizli, "Trametes versicolor laccase immobilized poly(glycidyl methacrylate) based cryogels for phenol degradation from aqueous media," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 132, no. 20, pp. 1–9, 2015, doi: 10.1002/app.41981.
- [349] M. Portaccio *et al.*, "Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 41, no. 3–4, pp. 97–102, 2006, doi: 10.1016/j.molcatb.2006.05.002.
- [350] A. Pich *et al.*, "Composite magnetic particles as carriers for laccase from *Trametes versicolor*," *Macromol. Biosci.*, vol. 6, no. 4, pp. 301–310, Apr. 2006, doi: 10.1002/mabi.200500192.
- [351] J. M. Guisan, G. Fernandez-Lorente, J. Rocha-Martin, and D. Moreno-Gamero, "Enzyme immobilization strategies for the design of robust and efficient biocatalysts," *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, vol. 35, p. 100593, 2022, doi: 10.1016/j.cogsc.2022.100593.
- [352] Z. Wang *et al.*, "The study of laccase immobilization optimization and stability improvement on CTAB-KOH modified biochar," *BMC Biotechnol.*, vol. 21, no. 1, pp. 1–13, 2021, doi: 10.1186/s12896-021-00709-3.
- [353] M. C. Biesinger, B. P. Payne, A. P. Grosvenor, L. W. M. Lau, A. R. Gerson, and R. S. C. Smart, "Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Cr, Mn, Fe, Co and Ni," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 7, pp. 2717–2730, 2011, doi: 10.1016/j.apsusc.2010.10.051.
- [354] A. H. Miller, A. de Vasconcellos, A. J. Fielding, and J. G. Nery, "Nanozeolites as support for laccase immobilization: Application to mediated glycerol oxidation," *Appl. Catal. A Gen.*, vol. 626, pp. 1–11, Sep. 2021, doi: 10.1016/J.APCATA.2021.118361.
- [355] C. S. Hong, C. C. Y. Lau, C. Y. Leong, G. K. Chua, and S. Y. Chin, "A comparison of entrapped and covalently bonded laccase: Study of its leakage, reusability, and the catalytic efficiency in TEMPO-mediated glycerol oxidation," *Biocatal. Biotransformation*, vol. 36, no. 5, pp. 352–361, 2018, doi: 10.1080/10242422.2017.1384467.
- [356] T. Fukuoka, H. Habe, D. Kitamoto, and K. Sakaki, "Bioprocessing of glycerol into glyceric Acid for use in bioplastic monomer," *J. Oleo Sci.*, vol. 60, no. 7, pp. 369–373, 2011, doi: 10.5650/jos.60.369.
- [357] B. Wang *et al.*, "Production of D-glyceric acid by a two-step culture strategy based on whole-cell biocatalysis of *acetobacter tropicalis*," *Chem. Biochem. Eng. Q.*, vol. 32, no. 1, pp. 135–140, 2018, doi: 10.15255/CABEQ.2017.1181.

- [358] T. Fukuoka *et al.*, "Synthesis and interfacial properties of monoacyl glyceric acids as a new class of green surfactants.," *J. Oleo Sci.*, vol. 61, no. 6, pp. 343–348, 2012, doi: 10.5650/jos.61.343.
- [359] S. Sato, S. Nagata, D. Kitamoto, Y. Takahashi, Y. Kondo, and H. Habe, "Comparative Study of Interfacial and Biological Properties in d-Glycerate-Derived Surfactants," *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 94, no. 11, pp. 1393–1401, 2017, doi: 10.1007/s11746-017-3032-9.
- [360] S. Sato, "Application of Glyceric Acid to Bio-related Functional Materials and Improvement of Microbial Production.," *J. Oleo Sci.*, vol. 70, no. 3, pp. 289–295, Mar. 2021, doi: 10.5650/jos.ess20307.
- [361] H. Habe *et al.*, "Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 24, pp. 7760–7766, Dec. 2009, doi: 10.1128/AEM.01535-09.
- [362] S. Sato, T. Morita, T. Fukuoka, D. Kitamoto, and H. Habe, "Microbial resolution of DL-glyceric acid for L-glyceric acid production with newly isolated bacterial strains," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 119, no. 5, pp. 554–557, 2015, doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.10.016.
- [363] A. Radu, M. E. Moisă, M. I. Toşa, N. Dima, V. Zaharia, and F. D. Irimie, "Candida antarctica lipases acting as versatile catalysts for the synthesis of enantiopure (R)- and (S)-1-(2-phenylthiazol-4-yl)ethanamines This paper is dedicated to the anniversary of 95th birthday of Professor Valer Fărcăşanu.," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 107, pp. 114–119, 2014, doi: 10.1016/j.molcatb.2014.05.007.
- [364] D. Hapău, J. Brem, M. Moisă, M. I. Toşa, F. D. Irimie, and V. Zaharia, "Heterocycles 32. Efficient kinetic resolution of 1-(2-arylthiazol-4-yl) ethanols and their acetates using lipase B from Candida antarctica," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 94, pp. 88–94, 2013, doi: 10.1016/j.molcatb.2013.05.005.
- [365] M. Borowicz, J. Paciorek-Sadowska, M. Isbrandt, Ł. Grzybowski, and B. Czupryński, "Glycerolysis of poly(lactic acid) as a way to extend the 'life cycle' of this material," *Polymers (Basel)*, vol. 11, no. 12, 2019, doi: 10.3390/polym11121963.
- [366] K. Khan, "Microwave absorption properties of radar absorbing nanosized cobalt ferrites for high frequency applications," *J. Supercond. Nov. Magn.*, vol. 27, no. 2, pp. 453–461, 2014, doi: 10.1007/s10948-013-2283-4.
- [367] E. Skoronski *et al.*, "Substrate specificity and enzyme recycling using chitosan immobilized laccase.," *Molecules*, vol. 19, no. 10, pp. 16794–16809, Oct. 2014, doi: 10.3390/molecules191016794.
- [368] N. Hakulinen and J. Rouvinen, "Three-dimensional structures of laccases.," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 72, no. 5, pp. 857–868, Mar. 2015, doi: 10.1007/s00018-014-1827-5.
- [369] Y. Wang, N. Wu, and Z. H. Chen, "Insight of the optical property of laccase during polymerics formation for application in real-time biosensing," *J. Mater.*

-
- Sci.*, vol. 56, no. 25, pp. 14368–14380, 2021, doi: 10.1007/s10853-021-06186-5.
- [370] D. Durante *et al.*, "Isothermal and non-isothermal bioreactors in the detoxification of waste waters polluted by aromatic compounds by means of immobilised laccase from *Rhus vernicifera*," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 27, no. 4–6, pp. 191–206, 2004, doi: 10.1016/j.molcatb.2003.11.008.
- [371] K. Ganesh, R. Soumen, Y. Ravichandran, and Janarthanan, "Dynamic approach to predict pH profiles of biologically relevant buffers," *Biochem. Biophys. Reports*, vol. 9, no. August 2016, pp. 121–127, 2017, doi: 10.1016/j.bbrep.2016.11.017.
- [372] M. Mohai, "XPS MultiQuant: Multimodel XPS quantification software," *Surf. Interface Anal.*, vol. 36, no. 8, pp. 828–832, 2004, doi: 10.1002/sia.1775.

LISTA DE LUCRĂRI

1. Lucrări științifice publicate tematica de cercetare a tezei

1) **I. Bîtcan**, A. Petrovici, A. Pellis, S. Klébert, Z. Károly, L. Bereczki, F. Péter, A. Todea, Enzymatic route for selective glycerol oxidation using covalently immobilized laccases, *Enzyme and Microbial Technology*, 2023, 163, 110168. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110168> (I.F. 3,705, zona Q2)

2) A. Todea, D. Dreavă, I. C. Benea, **I. Bîtcan**, F. Péter, C. Boeriu, Achievements and Trends in Biocatalytic Synthesis of Specialty Polymers from Biomass-Derived Monomers Using Lipases, *Processes* 2021, 9, 646. <https://doi.org/10.3390/pr9040646> (I.F. 3,352, zona Q2)

3) I Bîtcan; A Pellis; A. Petrovici; A. Todea, D. M. Dreava; I. Păușescu, L. Nagy, S.Kéki, L. Gardossi, F. Peter, One-pot green synthesis and characterization of novel furan-based oligoesters, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2023, 35, 101229. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101229> (I.F. 5.464, zona Q1)

2. Lucrări științifice publicate în volumele unor manifestări științifice

I. Bîtcan, A. Todea, D. Dreavă, I. Păușescu, F. Peter, L. Nagy, S. Kéki, Biocatalytic route for castor oil and furan derivatives valorisation, *BIOTRANS - 16th International Symposium on Biocatalysis & Biotransformations*, 25-29.06 2023, La Rochelle, Franța.

I. Bîtcan, A. Todea, D. Dreavă, I. Păușescu, F. Peter, L. Nagy, S. Kéki, Enzymatic synthesis and characterization of poly(5-hydroxymethyl-2-furancarboxylate-co-ricinoleate) for organogel applications, for the Next Generation Biocatalysis - An International Young Investigator Symposium 2023 (NextGenBiocat), Graz University of Technology, 18-19 Aprilie, 2023, Graz, Austria.

I. Bîtcan, A.Todea, D. Dreavă, I. Păușescu, F. Peter, L. Nagy, S. Kéki, Green synthesis and characterization of novel furan-based oligoesters for organogel applications, 9th IUPAC International Conference on Green Chemistry (ICGC 2022), 5 - 9 September 2022, Atena, Grecia.

I. Bîtcan, R. Argetoianu, D. Dăescu, D. Dreavă, M. Medeleanu, I. Păușescu, Bio-based pH indicator films for intelligent food packaging applications, XXI EUROFOODCHEM , 22-24 November 2021, online.

I. Bîtcan, A. Petrovici, A.Todea, D. Aparaschivei, I. Păușescu, F. Peter, Green Route Synthesis of Oligoesters from 5-Hydroxymethyl-2-Furan Carboxylic Acid and Ricinoleic Acid, The 6th International Conference on Biocatalysis in Non-Conventional Media (BNCM 2021), 6-8 May 2021, Milano, Italia.

I. Bîtcan, A. Petrovici, A. Ștefan, A. Todea, Iulia Păușescu, F. Peter, Selective glycerol oxidation mediated by covalently immobilized laccases, *International Forum on Industrial Biotechnology and Bioeconomy- IFIB 2021*, 30 September 2021 - 1 October 2021, Trento, Italia.

I. Bitcan, A. Petrovici, A. Ștefan, A. Todea, I. Păușescu, F. Peter, Laccases stabilization by covalent immobilization onto functionalized magnetic and sepabeads supports, New trends and strategies in the Chemistry of advanced materials with relevance in biological systems, techniques and environmental protection" 13th Edition, online, 7-8 October 2021, Timisoara, Romania.