

REZUMAT

BIOSINTEZA DE POLIHIDROXIALCANOAȚI ȘI UTILIZAREA ACESTORA ÎN INGINERIA BIOMEDICALĂ

Doctorand: ENE N. Nicoleta

Conducător științific: *Prof. univ.Dr. VAMANU Emanuel*

CUVINTE CHEIE: *Polihidroxicanoate, Biopolimeri, Biodegradabilitate, Pseudomonas putida, Bioproces de fermentație*

În ultimii ani, poluarea și acumularea de produse plastice care, nereciclate, ajung să polueze mediul înconjurător și să dăuneze sănătății sunt doar unele dintre subiectele de actualitate pe agenda globală. O consecință majoră a poluării cu plastic este constatarea omniprezenței microplasticului, care afectează echilibrul ecosistemelor din întreaga lume. Microplasticul a fost descoperit atât în apele oceanelor, lacurilor și râurilor, cât și în păduri, în înălțimile munților sau chiar în atmosferă (Bhat și col., 2023). Prezența acestuia afectează biodiversitatea organismelor acvatice și terestre (Bordós și col., 2019), prin vătămări fizice, perturbări hormonale și creșterea ratei mortalității (prin sufocare, răni care se infectează etc.).

Cu o cantitate estimată până în 2050 la 25 de miliarde de tone metrice de plastic (Xu și col., 2024), necesitatea identificării de noi materiale care să înlocuiască plasticul convențional a adus polihidroxicanoatii în atenția cercetărilor. Cu aceste rezultate, multe dintre marile companii și-au stabilit ca obiectiv până în anul 2025 utilizarea materialelor plastice reciclate, 100% biodegradabile sau reutilizabile (Tumu și col., 2023).

Polihidroxicanoatii sunt biopolimeri biodegradabili, non-toxici pentru mediu. Sunt preferați a fi utilizați în diferite industrii, pentru că prin procedeele de obținere oferă posibilitatea de a scădea emisiile de poluanți și stopează dependența față de resursele neregenerabile, folosite pentru plasticile clasice. PHA sunt produși în special de bacterii ca depozite intragranulare la anumite condiții de stres nutrițional (Philip și col., 2007). Inițial cu un cost ridicat, producerea de PHA devine convenabilă atunci când sunt folosite substraturi nutritive regenerabile, precum amidonul, glucoza, sucroza, grăsimile animale sau deșeurile alimentare (spre exemplu, coji de mazăre, coji de ceapă, coji de cartofi, melasă, zer etc.).

Lucrarea intitulată „*Biosinteza de polihidroxicanoate și utilizarea acestora în ingineria biomedicală*” are ca scop principal modelarea și optimizarea bioproceselor de sinteză a polihidroxicanoatilor utilizând *Pseudomonas putida* ICCF 391, folosind diferite substraturi de carbon (acizi grași, glucoză, uleiuri vegetale) și testarea biopolimerilor astfel obținuți. Teza este compusă din două părți: *Studiu bibliografic* și *Cercetări proprii*.

Primul capitol „*Capitolul I. Ingineria biomedicală și polimeri*” însumează informațiile despre ingineria biomedicală, aplicațiile acestora și tipurile principale de biopolimeri (PLA, PLGA/PLG, PCL și PHBV). Ingineria biomedicală integrează cunoștințele științelor ingineriei cu științele biomedicale (electronică biomedicală, biomateriale, biologie computațională, inginerie celulară, tisulară și genetică, imagistică medicală, bioinginerie ortopedică, bionanotehnologie) și practica clinică, pentru dezvoltarea unor concepte revoluționare, cum ar fi roboții chirurgicali (Edwards și col., 2018), protezele biocompatibile (Shepherd R.K, 2016), noile sisteme terapeutice medicamentoase, diferitele dispozitive medicale de diagnosticare și terapeutice (Aruna și col, 2022), echipamentele de imagistică obișnuite (RMN-uri și EKG/ECG-uri) (Thompson și col., 2016). Totodată, în componența acesteia intră următoarele ramuri:

- Bioinformatică;
- Biomecanică;

- Inginerie tisulară;
- Inginerie genetică;
- Inginerie neuronală;
- Inginerie farmaceutică;
- Dispozitive medicale (Clasă I, clasă II și clasă III).

Biopolimerii sunt substanțe polimerice sintetizate, în mare parte, de organismele vii, în special de bacterii, sau sunt sintetizați chimic din sisteme biologice de bază, prezentând un interes deosebit datorită proprietăților și domeniilor foarte variate de aplicare. Biopolimerii sunt molecule de tip lanț, formate din blocuri repetate de monomeri. Fiind materiale care pot fi utilizate pentru aplicații biomedicale (vindecarea rănilor, administrarea medicamentelor și ingineria țesuturilor) biopolimerii trebuie să îndeplinească anumite standarde: să fie biocompatibili, biodegradabili, să aibă antigenicitate scăzută, bioactivitate ridicată, procesabilitate la forme complicate cu porozitate adecvată și capacitate de a susține creșterea și proliferarea celulelor și proprietăți mecanice adecvate (Yousefi și Wnek, 2024). Principalele tipuri de biopolimeri sunt: polinucleotidele, polipeptidele, polizaharidele (cele din urmă putând avea origine bacteriană, fungică, vegetală/algală sau animală), proteinele și poliesterii de origine microbiană. Dintre biopolimerii de origine microbiană, cei mai utilizați în ingineria biomedicală sunt: acidul polilactic (PLA), acidul poli-lactic-co-glicolic (PLGA/PLG), policaprolactona (PCL) și poli(3-hidroxibutirat-co-3-hidroxivaleerat) (PHBV).

„Capitolul II. Polihidroxialcanoatii (PHA)” înglobează informațiile din literatura de specialitate despre modul de formare al acestora, structura, clasificarea, proprietățile fizico-chimice, microorganismele producătoare de PHA, cu accent pe tulpina *Pseudomonas putida*, parametrii importanți care influențează producerea de PHA, precum și căile metabolice de biosinteză, aplicațiile PHA, biocompatibilitatea și biodegradabilitatea biopolimerilor. Polihidroxialcanoatii sunt poliesteri produși în mod natural de multe specii de microorganisme, sub formă de granule intracelulare ce constituie rezerve de energie și carbon atunci când celulele sunt supuse unor dezechilibre (produc PHA ca măsură de precauție împotriva limitării nutrienților și a condițiilor extreme) (Koller și col., 2017). Se acumulează PHA când mediul nutritiv conține un exces de carbon, în timp ce azotul, fosforul, oxigenul sau magneziul limitează creșterea celulelor. Din punct de vedere structural, moleculele de PHA au între 600 – 35.000 unități monomerice de acizi hidroxialcanoici și au fost identificate aproximativ 150 de tipuri de polimeri.

În funcție de numărul de atomi de carbon din lanțul principal monomeric, PHA pot avea catena laterală scurtă (scl-PHA), catena laterală medie (mcl-PHA), respectiv catena laterală lungă (lcl-PHA). Proprietățile generale considerate comune polihidroxialcanoatilor (materiale cu un mare grad de polimerizare) sunt următoarele:

- lipsa toxicității;
- biodegradabilitatea;
- biocompatibilitatea;
- cristalinitatea;
- activitatea optică;
- proprietățile izotactice (cu regularitate stereochimică în unitățile care se repetă);
- proprietățile piezoelectrice;
- hidrofobicitatea.

Printre cele mai utilizate specii producătoare de PHA amintim *Alcaligenes latus*, *Bacillus megaterium*, *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas oleovorans* și *Pseudomonas putida*, acestea fiind capabile să utilizeze diverse surse de carbon, inclusiv uleiuri vegetale sau deșeuri. Astfel, PHA sunt produși dintr-o mare varietate de substraturi, provenite din resurse regenerabile (amidon, celuloză, glicerol sau subproduse - melasă, zer, glicerol) sau din resurse convenționale epuizabile (metan, ulei mineral, acizi organici).

Genul *Pseudomonas* este unul dintre cele mai versatile genuri producătoare de PHA cu catena laterală medie (mcl-PHA), cu o mare importanță din punct de vedere medical deoarece unele specii pot produce infecții

nosocomiale și oportuniste. Prima tulpina caracterizată ca fiind producătoare de PHA cu catenă laterală medie a fost *Pseudomonas putida* (Solaiman și col., 2000), urmând ca ulterior alte specii / subspecii să fie identificate și caracterizate: *Pseudomonas spp.* (*P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. campisalis*, *P. stutzeri*, *P. chlororaphis*, *P. citronellolis*), *Halomonas spp.* (*H. campisalis*, *H. elongata*) etc.

Pseudomonas putida este o specie foarte studiată, de importanță majoră în degradarea unor poluanți din mediu (de exemplu, petrolul, în studii privind curățarea solului sau a apelor subterane poluate cu acesta, bioabsorbția cuprului și a zincului, în cazul solurilor contaminate cu metale grele). Principalul avantaj al folosirii acestei specii este costul redus pe care îl necesită procedeul în sine. PHA depinde de sursa de carbon și rutele metabolice implicate. Cele mai importante căi metabolice de sinteză a PHA sunt: *Calea I*, de la Acetil-CoA la 3-hidroxibutiril-CoA, *Calea II*, degradarea acizilor grași și *Calea III*, biosinteza *de novo* a acizilor grași.

Sursa de carbon joacă un rol crucial în producerea de polihidroxiclcanoati (PHA), deoarece reprezintă materia primă necesară pentru sinteza acestor polimeri biodegradabili, reprezentând în același timp unul dintre parametrii care influențează producerea și acumularea PHA.

Aproximativ jumătate dintre costurile totale de producție ale PHA sunt asociate cu materia primă utilizată. Alegerea sursei de carbon este extrem de importantă din perspectiva eficienței economice a procesului de producție a PHA; pretratarea substratului influențează creșterea disponibilității surselor de carbon, iar suplimentarea mediului de creștere completează necesitățile nutritive ale mediilor de creștere și modifică randamentul și compoziția PHA.

Datorită calităților lor mecanice remarcabile, biodegradabilității și potențialului de a fi utilizate ca materii prime pentru diverse compuși chirali, polihidroxiclcanoatii (PHA) sunt folosiți în diverse industrii (a.Koller și Mukherjee, 2022). Biodegradabilitatea este avantajul major al PHA față de materialele plastice convenționale (care se degradează foarte greu, în zeci sau sute de ani). Aceasta permite microorganismelor să descompună polimerul în componente simple. Astfel, datorită naturii biodegradabile, PHA nu contribuie la creșterea depozitelor de deșeuri și, spre deosebire de materialele plastice convenționale, PHA pot fi compostate după utilizare (Dilkes-Hoffman și col., 2019). Prin urmare, PHA de origine microbiană formează un lanț industrial valoros, de la fermentația industrială, formarea de materiale, medicamente și biocombustibil, până la substanțele chimice.

Biocompatibilitatea și biodegradabilitatea PHA sunt două caracteristici vitale pentru utilizarea acestora în industria biomedicală. Aceste materiale trebuie să fie biocompatibile, adică să nu provoace un răspuns imun și să permită proliferarea și aderența celulară, respectiv biodegradabile, asigurând non-toxicitatea prin degradarea lor în dioxid de carbon și apă.

Prelucrarea polihidroxiclcanoatilor este un pas esențial pentru analiza acestora. În „Capitolul III. Modalități de prelucrare a PHA. Metode cantitative și calitative de analiză” este descrisă metoda extracției cu solvent, care are la bază modificarea permeabilității membranei celulare de către solvent și eliberarea PHA. După acest pas este necesară centrifugarea, pentru a se elimina conținutul nedorit și pentru a rămâne doar biomasa celulară. Un alt tip de extracție se poate realiza prin metoda digestiei masei celulare non-PHA (NPCM), utilizând tratamente fizice (dezintegrarea mecanică cu căldură, ultrasunete), tratamentele chimice, precum surfactanți, alcali sau acizi și enzimatice și tratamentele enzimatic. În urma tratamentului ales, granulele de PHA sunt separate de componentele celulare prin filtrare sau centrifugare. Purificarea biopolimerului se face pentru a se evita contaminanții și reacțiile imunologice și se poate efectua prin spășarea biomasei cu metanol și etanol. Estimarea biomasei se realizează prin citirea la spectrofotometru la absorbanta de 550 nm și prin măsurarea greutateii celulelor uscate prin congelare. În continuare, prelucrarea și caracterizarea PHA se poate realiza prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC), cromatografie gazoasă (GC), cromatografia lichidă (LC) sau rezonanța magnetică nucleară (RMN).

Partea a II-a a tezei, în care sunt prezentate „Cercetările Proprii”, însumează capitolele experimentale (Capitolul IV, V și VI) în care au fost efectuate trei tipuri de experimente:

1. Capitolul IV: Sinteza de PHA prin bioprocese realizate cu surse de carbon convenționale, de tipul acizilor grași: acid octanoic, acid nonanoic, acid heptanoic și acid hexanoic; interpretarea dinamicii parametrilor de dezvoltare; discutarea productivității PHA,
2. Capitolul V: Bioprocese realizate cu surse de carbon convenționale, folosind diferite tipuri de ulei (ulei de floarea soarelui, ulei de măsline, ulei uzat de floarea-soarelui, zaț de cafea, ulei extras din zaț de cafea, glicerol) ca unică sursă de carbon,
3. Capitolul VI: Biodegradabilitatea biopolimerilor obținuți și rata de degradare a acestora.

Pentru variantele experimentale din „Capitolul IV. Optimizarea bioprocесelor și prelucrarea polihidroxicarboxilicilor obținuți prin suplimentarea mediului cu surse convenționale de carbon” s-a folosit ca tulpină bacteriană *Pseudomonas putida* (ICCF 391), parte a colecției de microorganisme a Institutului Național de Cercetare și Dezvoltare Chimico-Farmaceutică-ICCF București. Pentru a se alege mediul de inocul potrivit, s-a realizat comparația dezvoltării microbiene pe trei medii: mediu IPS, mediu LB și mediu TSB. Cele mai bune rezultate ale dezvoltării bacteriene (densitatea optică măsurată la spectrofotometru) s-au obținut pentru mediul IPS, acela fiind mediu ales pentru restul de bioprocese. Un test preliminar pentru mediul de fermentație a fost realizat între mediile: E2, BSM, RMM și MSM, observându-se că cel mai potrivit a fost E2. În studiile experimentale efectuate în acest capitol, au fost folosite ca sursă de carbon surse convenționale - precursori de tipul acizilor carboxilici grași: acid octanoic, acid nonanoic, acid heptanoic și acid hexanoic.

Acizii grași (acidul octanoic, acidul nonanoic, acidul heptanoic și acidul hexanoic) sunt metabolizați de către *Pseudomonas putida* prin calea metabolică III, β -oxidarea. Dovezi ale metabolizării acestora sunt încă din anul 1967, când Chapman și Duggleby au observat acest mecanism la *P. aeruginosa* (Chapman și Duggleby, 1967). În continuare este general acceptat că β -oxidarea este calea prin care tulpinile de *Pseudomonas sp.* degradează acizii dicarboxilici. Evoluția bioprocесelor experimentale a fost monitorizată analizând informații despre următorii parametrii experimentali: temperatură, pH și densitatea optică – corelată cu dezvoltarea bacteriană.

Pentru acest pas de optimizare a bioprocесului de fermentație s-a avut în vedere testarea unor diferite surse de carbon, prin realizarea a 11 variante experimentale:

1. Acidul octanoic (18 ml ca octanoat de sodiu la 0 ore și la 24 ore);
2. Acidul octanoic (18 ml ca octanoat de sodiu la 0 ore și 9 ml la 24 ore);
3. Acidul nonanoic (17 ml ca nonanoat de sodiu la 0 ore și 17 ml la 24 ore);
4. Acidul nonanoic (17 ml ca nonanoat de sodiu la 0 ore și 17 ml ca nonanoat de sodiu la 24 ore);
5. Acidul nonanoic (17 ml ca nonanoat de sodiu la 0 ore);
6. Acidul nonanoic și acidul octanoic (17 ml ca nonanoat de sodiu la 0 ore și 17 ml ca octanoat de sodiu la 24 ore);
7. Acidul nonanoic și acidul heptanoic (17 ml ca nonanoat de sodiu la 0 ore și 17 ml ca heptanoat de sodiu la 24 ore);
8. Acidul heptanoic și acidul nonanoic (17 ml heptanoat de sodiu la 0 ore și 17 ml nonanoat de sodiu la 24 ore);
9. Acidul octanoic și acidul hexanoic (17 ml ca octanoat de sodiu la 0 ore și 17 ml ca hexanoat de sodiu la 24 ore);
10. Acidul octanoic și acidul hexanoic (17 ml ca octanoat de sodiu la 0 ore și 14 ml ca hexanoat de sodiu la 24 ore);
11. Acidul hexanoic și acidul octanoic (14 ml ca hexanoat de sodiu la 0 ore și 14 ml ca octanoat de sodiu la 24 ore).

Cele mai bune rezultate au fost obținute pentru varianta experimentală 9, unde s-au folosit ca precursori, în ordine, acidul octanoic și acidul hexanoic (17 ml ca octanoat de sodiu la 0 ore și 17 ml ca hexanoat de sodiu la 24 ore). Dezvoltarea bacteriană a fost cea mai însemnată și s-a obținut cea mai mare cantitate de biomasă uscată, precum și cea mai mare cantitate de PHA, respectiv 1,95 g/L de mediu de bioprocес și o folie cu greutatea de 4.6931 g.

Următoarele variante experimentale cu un rezultat foarte bun sunt varianta experimentală 3, pentru care s-a folosit acidul nonanoic (17 ml ca nonanoat de sodiu la 0 ore și 17 ml la 24 ore), folia de PHA cântărind 4.05 g, varianta experimentală 10, cu acidul octanoic și acidul hexanoic (17 ml ca octanoat de sodiu la 0 ore și 14 ml ca hexanoat de sodiu la 24 ore), folia de PHA cântărind 3.882 g, și varianta experimentală 11, cu acidul hexanoic și acidul octanoic (14 ml ca hexanoat de sodiu la 0 ore și 14 ml ca octanoat de sodiu la 24 ore), folia de PHA având 3.1031 g. Dintre cele 4 tipuri de substrat corelate structural, tulpina *Pseudomonas putida* ICCF 391 preferă substratul C8 (acidul octanoic) pentru biosinteza unui PHA elastomeric cu o compoziție în care monomerul C8 predomină față de C6 și C10.

Următorul capitol „Capitolul V. Optimizarea bioproceselor de producție a PHA prin suplimentarea mediului cu surse regenerabile de carbon” prezintă bioprocesele realizate cu aceeași tulpină, dar cu substraturi regenerabile, care asigură un cost scăzut pentru producerea de PHA. Mediile folosite au fost: pentru inocul – mediu IPS, pentru fermentație, mediu E2. Variantele experimentale au fost realizate, în principal, cu diferite tipuri de uleiuri vegetale, dar și alte materiale regenerabile, cu concentrații diferite, astfel:

1. Zaț de cafea (4 % la 0 ore);
2. Zaț de cafea (4 % la 0 ore) și acidul octanoic (17 ml la 24 h);
3. Glucoză (2% la 0 ore);
4. Ulei de floarea-soarelui (1 % la 0 ore);
5. Ulei de floarea-soarelui (1.5 % la 0 ore);
6. Ulei de floarea-soarelui (2 % la 0 ore);
7. Ulei de măsline (1 % la 0 ore);
8. Ulei de măsline (1.5 % la 0 ore);
9. Ulei de măsline (2 % la 0 ore);
10. Ulei uzat vegetal (1 % la 0 ore);
11. Ulei uzat vegetal (1.5 % la 0 ore);
12. Ulei uzat vegetal (2 % la 0 ore);
13. Ulei din zaț de cafea (1 % la 0 ore);
14. Ulei din zaț de cafea (1.5 % la 0 ore);
15. Ulei din zaț de cafea (2 % la 0 ore);
16. Ulei de motor (Castrol – 1 % la 0 ore);
17. Ulei de motor (Castrol – 1.5 % la 0 ore);
18. Ulei de motor (Castrol – 2 % la 0 ore).

Analizând rezultatele obținute, se poate concluziona că unele uleiuri sunt mai ușor de utilizat în bioproces față de altele care, probabil necesită etape suplimentare de pretratare pentru biodisponibilizarea carbonului și pentru a asigura posibilitatea de a fi consumat de tulpina bacteriană. Cea mai mare cantitate de biomasă s-a obținut pentru variantele experimentale în care s-a utilizat ulei de măsline (varianta experimentală 8), urmată de varianta experimentală 11, în care mediul a fost suplimentat cu ulei uzat de floarea-soarelui, cu o biomasă de 2.3 g/L. Densitățile optice cele mai mari s-au înregistrat pentru experimentele cu ulei extras din zaț de cafea, iar cele mai slabe rezultate au fost pentru variantele experimentale în care s-a folosit uleiul de motor (variantele experimentale 16, 17 și 18). Rezultatele obținute sunt în concordanță cu literatura de specialitate, deoarece sunt numeroase studii în care *P. putida* utilizează uleiuri vegetale pentru a sintetiza PHA (Song și col., 2008; Solaiman și col., 2006).

Deoarece acizii grași puri au un preț foarte mare, înlocuirea lor cu uleiuri vegetale de diferite tipuri a fost cercetată pentru producerea de mcl-PHA cu costuri scăzute. În producerea lor se păstrează același comportament ca la acizii carboxilici; compoziția substratului influențează compoziția monomerului PHA.

În cadrul „Capitolului VI. Biodegradabilitatea biopolimerilor obținuți” s-a verificat biodegradabilitatea PHA obținuți și s-a analizat gradul de scădere în greutate a acestora. Experimentul s-a realizat pe parcursul a 24 de luni, cu cântărirea probelor după o lună, trei luni, 6 luni, 12 luni și 24 de luni. Pentru toate cele patru

probe supuse experimentului s-a observat o degradare clară a polimerului. Conform formulei de calcul din *subcapitolul 2.8.2. Biodegradabilitatea PHA*, ratele de scădere a greutatei au fost:

- Proba 1: 76.76%;
- Proba 2: 54.67%;
- Proba 3: 45.97%;
- Proba 4: 87.43%;

iar rata medie de scădere a greutății biopolimerilor obținută în urma acestui experiment a fost de 66.21%, dovedind degradarea PHA realizată de microbiom.

Prezenta teză și-a îndeplinit obiectivele de biosinteză a polihidroxialcanoatilor cu catenă laterală medie (*mcl*-PHA) prin biosinteza microbiană, utilizând tulpina *Pseudomonas putida* ICCF 391. În urma analizei structurii acestora și prin efectuarea testelor de biodegradabilitate, s-au îndeplinit constatările următoare:

- Tulpina utilizată în experimente face parte din colecția de microorganisme a ICCF și este o bacterie capabilă să acumuleze PHA intracelular polihidroxialcanoat, în condițiile limitării anumitor nutrienți și în exces de sursă de carbon (dezechilibru nutrițional).

- Rezultatele obținute pe parcursul acestui studiu facilitează înțelegerea procesului de biosinteză controlată a *mcl*-PHA de către microorganism în diferite condiții experimentale, prin utilizarea unor precursori care influențează randamentul bioprocesului și calitatea polimerului obținut.

- De asemenea, s-au testat diferite concentrații de substraturi lipidice (surse neconvenționale de carbon) și s-a putut evalua care este concentrația cea mai potrivită pentru bioproces.

- Biopolimerii au fost degradați în sol (la temperatură constantă de 28-30°C), cu rate diferite de biodegradabilitate, fiind materiale potrivite pentru a fi utilizate în industria biomedicală (proteze vasculare, ligamente, suturi, stenturi etc.).

Studiul producției de PHA rămâne un subiect actual, cu multe și diverse substraturi ce pot fi folosite ca sursă de carbon. Obținerea PHA din substraturi regenerabile (deșeuri ulei, zat de cafea, coji de plante etc.) contribuie semnificativ la reducerea costurilor PHA. Biopolimerii PHA continuă să fie cercetați și îmbunătățiți, având un rol important în diverse sectoare industriale. Proprietățile acestui material permite utilizarea sa ca material biodegradabil în industria cosmetică (pentru ambalaje), în producția de materiale biodegradabile plastice, sau în inginerie biomedicală ca diverse proteze, valve cardiace sau schele implantabile.