

Universitatea „Dunărea de Jos” din Galați
Școala doctorală de Științe fundamentale și inginerești



Rezumat Teză de Doctorat

Studiul condițiilor biotehnologice de obținere a polipirolui, prin polimerizare *in situ*, cu microorganisme selecționate

**Student doctorand,
Roxana-Mihaela APETREI**

**Coordonator științific,
Prof. univ. dr. ing. Gabriela Elena BHRIM**

Seria II: BIOTEHNOLOGII Nr. 9

GALAȚI

2018

Seriile tezelor de doctorat susținute public în UDJG începând cu 1 octombrie 2013 sunr:

Domeniul **ȘTIINȚE INGINEREȘTI:**

Seria I 1: **Biotehnologii**

Seria I 2: **Calculatoare și tehnologia informației**

Seria I 3: **Inginerie electrică**

Seria I 4: **Inginerie industrială**

Seria I 5: **Ingineria materialelor**

Seria I 6: **Inginerie mecanică**

Seria I 7: **Ingineria produselor alimentare**

Seria I 8. **Ingineria sistemelor**

Domeniul **ȘTIINȚE ECONOMICE:**

Seria E 1: **Economie**

Seria E 2: **Management**

Domeniul **ȘTIINȚE UMANISTE:**

Seria U 1: **Filozofie-Engleză**

Seria U 2: **Filologie-Română**

Seria U 3: **Istorie**

Cuprins

	Rezumat	Teză
Introducere.....	7	10
Notatii și abrevieri.....	-	16
Lista figuri și tabele.....	-	19
I. Studiu documentar.....	10	25
1. Perspective asupra polimerilor conductori (CPs).....	10	26
1.1 Polipirol (Ppy).....	10	26
2. Sinteza polimerilor conductori (CPs).....	11	28
2.1 Sinteza electrochimică.....	11	28
2.2 Sinteza chimică.....	11	28
2.3 Sinteza biocatalitică a polimerilor conductori (CPs): polipirol (Ppy).....	11	29
2.3.1 Sinteza catalizată de peroxidază.....	12	29
2.3.2 Sinteza catalizată de laccază.....	12	30
2.3.3 Biosinteza polimerilor conductori (CPs) cu alte enzime.....	12	32
2.3.4 Sinteza polipirolului (Ppy) cu microorganisme.....	13	33
3. Caracterizarea și proprietățile polimerilor conductori (CPs): polipirol (Ppy).....	13	33
3.1 Modele fundamentale în caracterizarea spectroelectrochimică a polipirolului (Ppy).....	13	33
3.2 Caracteristici spectroelectrochimice ale polipirolului (Ppy) obținut prin biocataliză.....	14	36
4. Bio-aplicații ale polimerilor conductori (CPs): polipirol (Ppy).....	14	37
4.1 Biosenzori și celule de biocombustibil.....	15	39
II. Metodologia cercetării.....	16	44
5. Metode biologice de preparare a polipirolului (Ppy).....	16	45
5.1 Cultivarea tulpinilor bacteriene.....	16	45
5.2 Cultivarea tulpinilor fungice.....	16	45
5.3 Adăugarea pirolului (Py).....	16	45
6. Analiza mediului de cultură/polimerizare.....	17	46
6.1 Test calitativ pentru detecția peroxidului de hidrogen (H ₂ O ₂).....	17	46
6.2 Estimarea conținutului de proteine.....	17	46
6.3 Analiza activității fenoloxidazice.....	17	47
6.4 Analiza activității glucozoxidazice.....	18	48
6.5 Separarea biomasei și analize de activitate enzimatică intracelulară.....	18	48
7. Caracterizarea polipirolului (Ppy) prin metode fizico-chimice și microscopie.....	18	48
7.1 Spectroscopie de absorpție.....	18	48
7.2 Metode electrochimice.....	18	49
7.2.1 Voltametrie ciclică (CV) și măsurători în circuit deschis (OCV).....	18	49
7.2.2 Măsurători de pH.....	19	49
7.3 Tehnici de microscopie.....	19	49
7.3.1 Microscopie optică (OM).....	19	49
7.3.2 Microscopie electronică de baleiaj (SEM).....	19	49
7.4 Spectroscopie FTIR.....	19	49
8. Construcția și funcționalitatea biosenzorilor.....	19	50
8.1 Măsurători amperometrice și de microscopie electrochimică (SCEM) a biomasei de <i>Aspergillus niger</i> MIUG 35.....	19	50

8.1.1	Tratarea electrodului de lucru și prepararea biostratului.....	19	50
8.1.2	Principiul măsurătorilor.....	19	50
8.1.3	Imobilizarea biomasei pentru măsurători de microscopie electrochimică (SCEM).....	20	50
8.1.4	Evaluarea activității biomasei prin microscopie electrochimică (SCEM).....	20	50
8.2	Măsurători amperometrice pentru biomasa de <i>Aspergillus niger</i> MIUG 34.....	20	51
8.2.1	Prepararea biostratului.....	20	51
8.2.2	Principiul măsurătorilor.....	20	51
8.3	Măsurători amperometrice pentru extractul enzimatic de <i>Trametes pubescens</i>	20	51
8.3.1	Prepararea biostratului.....	20	51
8.3.2	Principiul măsurătorilor.....	20	52
8.3.3	Analiza în probe reale.....	21	52
8.4	Analiză statistică și interpretarea rezultatelor.....	21	53
III.	Rezultate și discuții.....	21	54
9.	Selecția și caracterizarea tulpinilor de microorganisme implicate în bioproducerea polipirolului (Ppy).....	21	55
9.1	Bioproducerea polipirolului (Ppy) în culturi submerse de bacterii filamentoase.....	22	55
9.1.1	Caracteristici morfologice ale tulpinilor de bacterii filamentoase.....	-	55
9.1.2	Formarea polipirolului (Ppy) în culturi submerse de <i>Streptomyces</i> spp.	22	57
9.1.3	Identificarea polipirolului (Ppy) format în culturile de <i>Streptomyces</i> spp. prin microscopie optică (OM).....	22	58
9.1.4	Identificarea polipirolului (Ppy) format în culturile de <i>Streptomyces</i> spp. prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) și microscopie cu rază ionică (FIB).....	24	60
9.1.5	Identificarea structurală și caracterizarea polipirolului (Ppy) format în culturile de <i>Streptomyces</i> spp. prin spectroscopie FTIR.....	24	61
9.2	Bioproducerea polipirolului (Ppy) în culturi submerse de fungi.....	25	62
9.2.1	Caracteristicile morfologice ale tulpinilor de fungi.....	-	63
9.2.2	Formarea polipirolului (Ppy) în culturi submerse de fungi.....	25	65
9.2.3	Identificarea polipirolului (Ppy) format în culturile de fungi prin tehnici de microscopie.....	26	66
9.2.4	Identificarea structurală și caracterizarea polipirolului (Ppy) format în culturile de fungi prin spectroscopie FTIR....	29	70
10.	Monitorizarea și caracterizarea spectroelectrochimică a formării polipirolului (Ppy) în culturile de fungi.....	31	74
10.1	Caracterizarea culturilor de fungi utilizate ca medii de polimerizare.....	31	75
10.1.1	Analiza calitativă a producției de peroxid de hidrogen (H ₂ O ₂) în culturile de fungi.....	-	75
10.1.2	Biosinteza proteinelor în culturile de fungi.....	32	75
10.1.3	Biosinteza fenoloxidazelor (PPO) în culturile de fungi.....	32	77
10.1.4	Biosinteza glucozoxidazei (GOx) în culturile de fungi.....	35	80

10.2 Monitorizarea și evaluarea oligomerizării pirolului (Py) prin spectroscopie de absorpție.....	36	83
10.2.1 Investigarea eficienței culturilor de fungi în oligomerizarea pirolului (Py).....	-	83
10.2.2 Evaluarea oligomerizării pirolului (Py) în culturile de fungi.....	36	85
10.2.3 Evaluarea oligomerizării pirolului cu peroxid de hidrogen (H ₂ O ₂).....	-	90
10.3 Monitorizarea și caracterizarea oligomerizării pirolului (Py) prin tehnici electrochimice.....	39	91
10.3.1 Caracterizarea oligomerizării pirolului (Py) în culturile de fungi prin voltametrie ciclică (CV).....	39	91
10.3.2 Caracteristicile electrochimice ale polipirolului (Ppy) în soluție de tampon fosfat (PBS).....	42	104
10.3.3 Caracteristicile electrochimice ale polipirolului (Ppy) în apă ultrapură.....	45	107
10.3.4 Caracterizarea oligomerizării pirolului (Py) cu peroxid de hidrogen (H ₂ O ₂) prin voltametrie ciclică (CV).....	-	108
10.3.5 Evoluția potențialului în circuit deschis (OCV) pe parcursul oligomerizării pirolului (Py) în culturile de fungi.....	45	110
10.3.6 Evoluția valorilor de pH pe parcursul oligomerizării pirolului (Py) în culturile de fungi.....	46	111
11. Aplicații bio-electrochimice pentru polipirolul (Ppy) format în culturile de fungi.....	48	114
11.1 Biosenzori microbieni pentru glucoză care utilizează polipirolul (Ppy) format în culturile de micromicete.....	49	114
11.1.1 Influența polipirolului (Ppy) format în cultura <i>Aspergillus niger</i> MIUG 35 în detecția de glucoză.....	49	115
11.1.2 Biosenzori microbieni pentru glucoză care utilizează polipirolul (Ppy) format în cultura <i>Aspergillus niger</i> MIUG 34.....	51	119
11.2 Biosenzori enzimatici pentru catechol care utilizează polipirolul (Ppy) format în supernatantul culturii <i>Trametes pubescens</i>	55	128
12. Concluzii generale, contribuții originale și perspective.....	61	140
Diseminarea rezultatelor cercetării.....	64	143
Bibliografie.....	-	145

Mulțumiri

În primul rând, mulțumesc comisiei științifice de îndrumare, și anume Prof. Dr. Gabriela-Elena BAHRIM, Prof. Dr. Geta CĂRĂC, Prof. Dr. Rodica Mihaela DINICĂ și Prof. Dr. Ștefan DIMA pentru sprijinul profesional și expertiza științifică. Îndeosebi, îi mulțumesc d-nei Prof. Dr. Gabriela-Elena BAHRIM pentru oportunitatea de a lucra în cadrul Infrastructurii Bioaliment beneficiind de îndrumare și resurse. De asemenea, îi mulțumesc și îi sunt recunoscătoare d-nei Prof. Dr. Geta CĂRĂC pentru îndrumare și pentru sprijinul neîncetat pe care mi l-a oferit pe parcursul studiilor academice.

Sunt recunoscătoare și d-lui Prof. Dr. Arunas Ramanvicius pentru îndrumare și pentru oportunitatea de a lucra în cadrul echipei de cercetare a Departamentului de Chimie-Fizică și a Centrului de Nanotehnologie și Știința Materialelor ale Universității Vilnius, Lituania. De asemenea, îi mulțumesc d-nei Prof. Dr. Pinar Camurlu pentru sprijinul și încurajările oferite pe parcursul stagiului de cercetare efectuat în Departamentul de Cercetare a Polimerilor al Universității Akdeniz, Turcia.

Aș dori să îmi exprim aprecierea și către Lect. Dr. Claudia Popa Ungureanu pentru binevoiență în îndrumare pe parcursul studiilor de master și către colectivul din cadrul Bioaliment, precum Dr. Mihaela Turturică și Dr. Elena Ioniță pentru prietenia și ajutorul constant. Îi mulțumesc și Dr. Merih Zeynep Cetin pentru prietenie și sprijin. Aș vrea să îi mulțumesc și d-nei Lect. Dr. Georgiana Parfene, Dr. Vicentiu Horincar și Lect. Dr. George Ifrim pentru prietenia și sprijinul oferite pe parcursul stagiului doctoral.

În cele din urma, multumiri sincere sunt dedicate mamei mele pentru încrederea și sprijinul nelimitat.

Introducere

Polimerii conductori (CPs) reprezintă o clasă importantă de materiale care prezintă proprietăți polimerice convenționale precum densitate scăzută, flexibilitate și procesabilitate alături de conductivitate electrică intrinsecă. CPs au reprezentat o provocare științifică care a fost inițiată odată cu acordarea premiului Nobel laureaților Heeger [1], MacDiarmid [2] și Shikarawa [3] și a fost abordată de cercetători în chimie, fizică și știința materialelor deopotrivă. Individualitatea lor este dată de unicitatea structurii chimice conjugate care constă în legături organice simple și duble cu hibridizare sp^2 . Importanța identificării acestor materiale este dată de oportunitatea de a înlocui materialele metalice conductoare cu unele organice care conferă proprietăți conductoare similare alături de facilitate de sinteză, flexibilitate și procesabilitate ridicată. Principalul obiectiv în cercetarea CPs a fost determinarea proprietăților electrochimice derivate din structura lor chimică și, în consecință, posibilitățile de prelucrare. Se recomandă cele două volume ale cărții „Handbook of Conducting Polymers” [4] pentru o înțelegere detaliată a datelor fundamentale în domeniul sintezei și caracterizării polimerilor conductori. Polipirolul (Ppy) este reprezentativ pentru această clasă de materiale datorită proprietăților sale precum: conductivitate electrică, maleabilitate, stabilitate și biocompatibilitate, care îi conferă relevanță în domeniul aplicațiilor biologice.

Metoda de sinteză utilizată în prepararea CPs este esențială deoarece este responsabilă cu prelucrarea materialului pentru aplicațiile dorite. De fapt, aceste materiale în stare neutră sunt dielectrice și doar în urma oxidării sau reducerii obțin proprietăți conductoare. Însă, procesul de polimerizare nu produce materialul în stare neutră, ci îi conferă proprietăți electrice în funcție de parametrii de sinteză. Diferite metode de sinteză sunt recunoscute precum polimerizarea electrochimică, care utilizează un potențial anodic și cea chimică, bazată pe oxidanți puternici, fiecare având scopul de a forma radicali cationi reactivi, cu electroni necuplați care, în urma reacțiilor reciproce, devin lanțuri polimerice. CPs sintetizați electrochimic și/sau chimic sunt performanți în domeniile fizico-chimice precum dispozitive electrocromice, condensatori, baterii, celule fotovoltaice și materiale anticorozive, însă domeniile bioanalitice necesită materiale biocompatibile, cu procesabilitate ridicată, caracter ecologic și eficient din punct de vedere economic.

Astfel, metode ecologice de sinteză a CPs sunt în continuă explorare și variază de la metode bazate pe oxidanți biologici la utilizarea unor cantități biocatalitice de oxidanți, toate acestea în condiții fiziologice de temperatură și pH, fără produși toxici secundari. Una dintre abordările cele mai cunoscute este cataliza enzimatică, deoarece enzimele reprezintă biocatalizatori ideali, capabili să înlocuiască cantități mari de oxidanți chimici, în condiții eficiente din punct de vedere termodinamic păstrându-și integritatea și funcționalitatea [5]. Diferite oxidoreductaze au fost utilizate precum peroxidaza, laccaza și glucozoxidaza. Însă, purificarea enzimelor constituie un proces dificil și costisitor, cu posibile dezavantaje precum denaturarea sau pierderea activității enzimatice. Prin urmare, acest studiu propune sinteza de Ppy în culturi de microorganisme capabile să biosintetizeze oxidoreductaze. Deși polimerizarea unor compuși plastici asistată de microorganisme a fost efectuată, acest procedeu nu a fost utilizat în producerea de CPs decât recent, prin tratarea componentelor microbiene cu oxidanți chimici, capabili să inițieze polimerizarea.

Astfel, teza de doctorat intitulată „**Studiul condițiilor biotehnologice de obținere a polipirolului, prin polimerizare *in situ*, cu microorganisme selecționate**” introduce un nou concept pentru sinteza de Ppy între cataliza cu enzime pure și cea inițiată de microorganisme funcționalizate chimic. Metoda biocatalitică propusă este bazată pe abilitatea microroganismelor selecționate de a biosintetiza oxidoreductaze, enzime implicate direct sau indirect în polimerizarea pirolului, în condiții de cultivare submersă și încurajează utilizarea culturilor celulare drept soluții de polimerizare. În acest mod, studiul deschide două noi direcții de cercetare: (i) producerea biocatalitică de Ppy datorată enzimelor sintetizate de celule; (ii) un proces biochimic inițiat de culturile de microorganisme *in vitro* fără a fi necesar tratamentul chimic al acestora. În acest scop, diferite tipuri de microorganisme au fost testate: tulpini de bacterii filamentoase care aparțin genului *Streptomyces*

spp. și tulpini fungice: macromicete (*Trametes* spp., *Irpex lacteus*) și micromicete (*Aspergillus niger*, *Rhizoctonia* spp.). Performanța microorganismelor testate a fost evaluată având în vedere formarea de Ppy în culturile celulare, în timpul cultivării, aspect analizat inițial prin tehnici microscopice. Selecția tulpinilor active a fost ulterior validată prin spectroscopie în infraroșu. Fezabilitatea bioproducției de Ppy în culturile celulare a fost estimată prin monitorizarea spectroelectrochimică a procesului de polimerizare și prin caracterizarea proprietăților optoelectrice ale produsului final prin comparație cu date din literatura de specialitate dedicate producției de Ppy prin cataliză enzimatică. În cele din urmă, beneficiile rutei ecologice propuse pentru sinteza de Ppy sunt relevante îndeosebi în domenii de cercetare biomedicale și bioanalitice. Așadar, aplicabilitatea Ppy în cadrul aplicațiilor bioelectrochimice a fost testată prin dezvoltarea de biosenzori amperometrici bazați pe Ppy format în culturile celulare sau în supernatantele culturilor celulare după separarea biomasei.

Cercetarea derulată pe parcursul studiilor doctorale a vizat următoarele obiective principale:

- Selecția și caracterizarea tulpinilor de microorganisme capabile să inițieze oligomerizarea pirolului (Py).
- Analiza mediilor culturale utilizate drept soluții de polimerizare din punct de vedere al biosintezei de enzime cu potențial în polimerizare, la nivel atât intra- cât și extracelular.
- Monitorizarea și evaluarea spectroelectrochimică a procesului de oligomerizare și caracterizarea optoelectrică a Ppy produs.
- Evaluarea influenței formării de Ppy în culturile celulare și în supernatante prin dezvoltarea de biosenzori amperometrici pe bază de celule și enzime native, modificate cu Ppy.

Teza de doctorat este structurată în trei secțiuni principale, după cum urmează:

I. Studiul documentar reprezintă o sinteză a celor mai noi informații publicate în domeniul metodelor biocatalitice de sinteză a CPs și al implicării lor extensive în bio-aplicații, având ca model Ppy. Acest capitol este structurat în patru subsecțiuni dedicate: (1) prezentării generale a CPs și a importanței acestora în cercetarea științifică, luând Ppy ca model de analiză; (2) informații esențiale asupra metodelor de sinteză ale CPs, detalii ale metodelor inovative și ecologice de preparare a Ppy și descrierea catalizatorilor enzimatici implicați din punct de vedere al originii și al mecanismelor catalitice; (3) modelele fundamentale de caracterizare spectroelectrochimică a Ppy și adaptarea lor în interpretarea proprietăților Ppy obținut prin biocataliză; (4) sinteza diverselor aplicații care evidențiază importanța Ppy ca bio-material cu precădere în tehnologia biosenzorilor și al celulelor de biocombustie.

II. Metodologia cercetării face referire la descrierea materialelor și metodelor utilizate pe parcursul studiului experimental, acest capitol fiind structurat în patru subsecțiuni dedicate: (5) condițiilor de cultivare ale tulpinilor de microorganisme analizate și detaliile procedurii de adăugare a pirolului în culturi *in vitro*; (6) descrierea metodelor și parametrilor de cuantificare biochimică a culturilor de celule (biosinteza de proteine și enzime intra- și extracelulare); (7) specificații privind metodele spectroelectrochimice de caracterizare a mediilor de biocataliză utilizate, incluzând echipamente și parametri operaționali; (8) construcția biosenzorilor, proiectarea biostratului și principiile de măsurare.

III. Rezultate și discuții ilustrează rezultatele investigațiilor originale realizate pe parcursul studiului doctoral în comparație cu date similare din literatura de specialitate. Această secțiune este structurată în patru subsecțiuni, fiecare cu obiective specifice de cercetare și concluzii parțiale. Subsecțiunea 9 intitulată „**Selecția și caracterizarea tulpinilor de microorganisme capabile să inițieze bioproducerea polipirolului (Ppy)**” ilustrează selecția tulpinilor de microorganisme bazată pe tehnici de microscopie (microscopie optică, microscopie electronică de baleiaj, microscopie cu fascicul focalizat de ioni) și spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier. În cadrul acestui studiu, douăzeci și cinci de tulpini de bacterii filamentoase din genul *Streptomyces* spp., cinci tulpini de macromicete (*Trametes versicolor*, *Trametes pubescens*, *Trametes hirsuta*, *Trametes gibbosa*, *Irpex*

lacteus) și șase tulpini de micromicete (*Aspergillus niger* MIUG 34, *Aspergillus niger* MIUG 35, *Rhizoctonia* spp. KM 53 and KM 55, KM 56 and KM 57) au fost testate privind capacitatea de inițiere a polimerizării, în condiții de cultivare submerse, iar cele mai performante tulpini au fost selectate pentru studiu ulterior. Subsecțiunea 10 denumită „**Monitorizarea și caracterizarea spectroelectrochimică a polipirolului (Ppy) format în culturile de fungi**” a fost dedicată monitorizării și caracterizării procesului de oligomerizare a Py prin metode spectroelectrochimice. În această etapă a cercetării, cea mai bună performanță a fost obținută cu două tulpini de macromicete (*Trametes versicolor*, *Trametes pubescens*) și două tulpini de mucegaiuri (*Aspergillus niger* MIUG 34, *Aspergillus niger* MIUG 35), motiv pentru care formarea de Ppy a fost analizată exclusiv în aceste patru culturi. De asemenea, s-a efectuat analiza culturilor de fungi utilizate drept soluții de polimerizare în ce privește biosinteza proteinelor și enzimelor. S-au propus mecanismele de formare a Ppy având în vedere investigațiile enzimatică. Subsecțiunea 11 intitulată „**Aplicații bioelectrochimice pentru polipirolul (Ppy) format în culturile de fungi**” este devotată studiului aplicabilității Ppy obținut prin biocataliză *in situ* în culturile fungice selecționate prin dezvoltarea de biosenzori amperometrici. Două concepte diferite au fost implementate, unul bazat pe formarea de Ppy în culturile de mucegai (*Aspergillus niger*) pentru prepararea de biosenzori microbieni pentru detecția glucozei și unul bazat pe formarea de Ppy în supernatantul culturii de macromicete *Trametes pubescens*, utilizat pentru biosenzori enzimatici pentru detecția catecholului.

Capitolul 12 prezintă „**Concluzii generale, contribuții originale și perspective**” derivate din investigațiile realizate în acest studiu, evidențiind importanța și caracterul inovativ al cercetării realizate în contextul domeniului științific abordat. În încheiere, diverse perspective de continuare și perfecționare a cercetării sunt propuse.

Teza de doctorat cuprinde 167 pagini, în care sunt incluse 92 figuri și 25 tabele. Studiul documentar reprezintă 15 % iar partea experimentală 85 %.

Diseminarea rezultatelor obținute în domeniul de cercetare abordat s-a realizat prin publicarea a 4 articole științifice în reviste cotate ISI (*Polymer* IF 3.68 , *Bulgarian Chemical Communications* IF 0.23 , *Bioelectrochemistry* IF 3.34) și indexate în baze de date internaționale (*Innovative Romanian Food Biotechnology*) și 7 participări la manifestări științifice naționale și internaționale relevante în domeniul biotehnologiei.

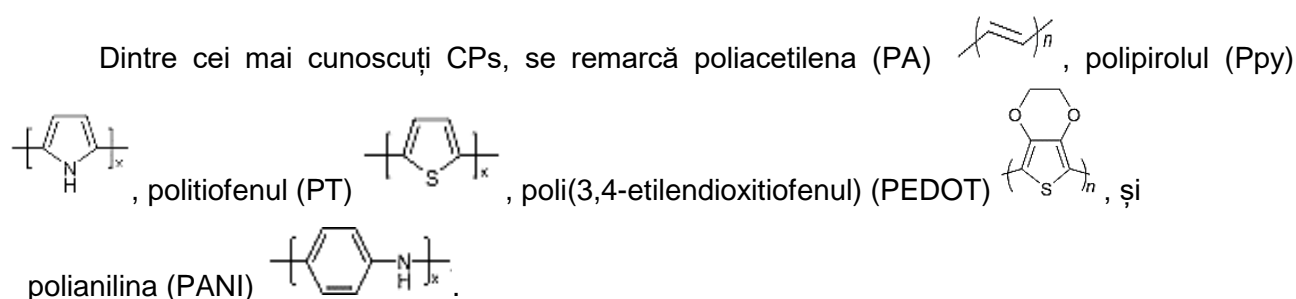
Activitățile de cercetare efectuate pe parcursul studiului doctoral au fost derulate utilizând infrastructura modernă a următoarelor unități de cercetare: **Centrul integrat de cercetare, expertiză și transfer tehnologic „BioAliment”** (www.bioaliment.ugal.ro) din cadrul Facultății de Știința și Ingineria Alimentelor, **Departamentul de Chimie, Fizică și Mediu** al Facultății de Științe și Mediu, Universitatea “Dunărea de Jos” din Galați; **Centrul de Nanotehnologie și Știința Materialelor și Departamentul de Chimie-Fizică** din cadrul Universității Vilnius, Lituania; **Departamentul de Cercetare în domeniul Polimerilor** din cadrul Universității Akdeniz, Turcia. Studiile au beneficiat de susținere științifică, logistică și financiară prin implicarea în mobilități de practică **Erasmus+** și participarea în proiectul **COST Acțiunea MP1407**.

Studiul doctoral s-a realizat sub coordonarea științifică a comisiei de îndrumare cu următoarea componență: **Prof.dr.ing. Gabriela-Elena BHRIM** – conducător de doctorat, **Prof.dr.chim. Geta CÂRÂC**, **Prof.dr.chim Rodica Mihaela DINICĂ**, **Prof.dr.chim Ștefan DIMA**.

I. Studiu documentar

Această sinteză are drept obiectiv prezentarea celor mai noi informații publicate în domeniul metodelor biocatalitice de sinteză a polimerilor conductori (CPs) și al implicării lor extensive în bio-aplicații. Manuscrisul începe prin introducerea diferitelor tipuri de CPs și a importanței acestora în cercetarea științifică luând drept model de analiză polipirolul (Ppy). Metodele de sinteză consacrate sunt revizuite, iar abordări biotehnologice pentru polimerizare sunt detaliate. Biocataliștii enzimatici implicați sunt prezentați din perspectiva originii și a funcției catalitice. În continuare, proprietățile optoelectronice ale Ppy sunt interpretate din analize spectroelectrochimice. În cele din urmă, implicarea amplă a Ppy în domeniul biomedical, în construcția biosenzorilor și a celulelor de biocombustibil, a sistemelor de livrare a medicamentelor și în ingineria tisulară este discutată în mod specific.

1. Perspective asupra polimerilor conductori (CPs)



1.1 Polipirolul (Ppy)

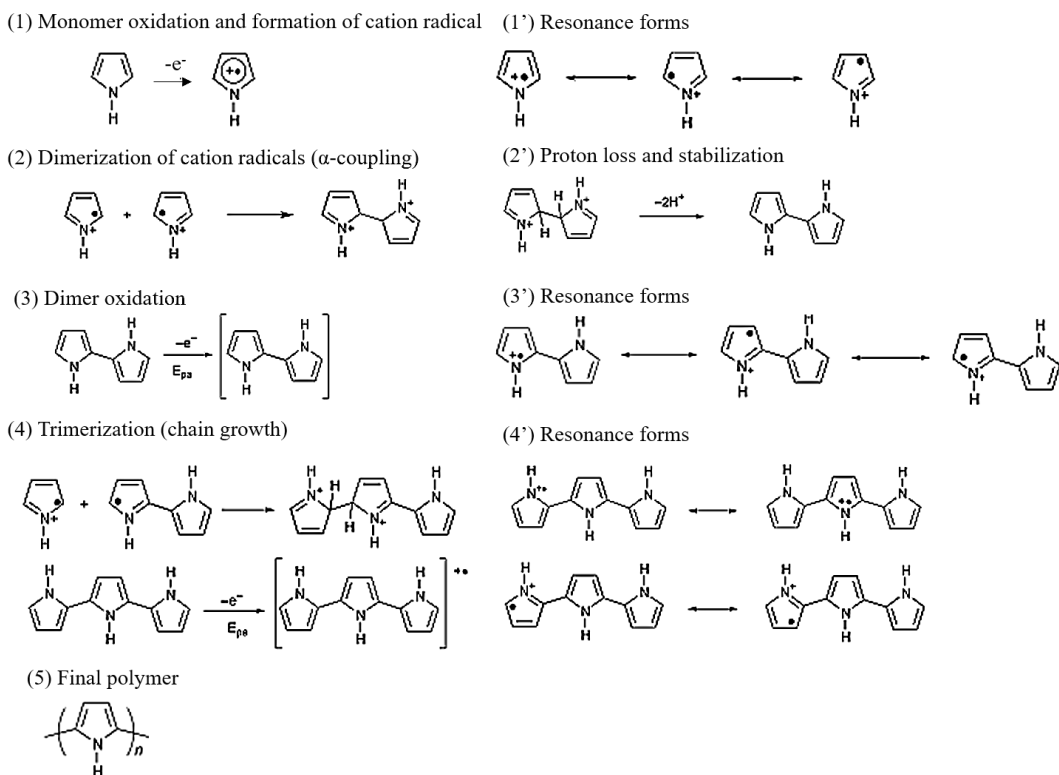


Figura 1.1. Mecanismul oxidativ al polymerizării pirolului propus de Diaz et al. [29] (adaptat din [24, 30]).

2. Sinteza polimerilor conductori (CPs)

Metoda de sinteză utilizată în prepararea CPs este fundamentală deoarece funcționează produsul final pentru aplicațiile dorite. Obiectivul acestei secțiuni este studiul metodelor de sinteză ale CPs în ceea ce privește întrebuințarea acestora în bio-aplicații.

2.1 Sinteza electrochimică

Procesul electrochimic constă în utilizarea unui potențial anodic pentru oxidarea monomerului dorit. În urma oxidării, unitățile monomerice devin radical cationi care, datorită densității de electroni fără pereche, reacționează rapid între ei, dimerizând și, în urma deprotonării, formează lanțuri polimerice (Figura 1.1) [8]. Dezavantajul acestei metode este dificultatea producției la scală industrială, deoarece polimerul poate fi electrodepozitat doar pe suprafețe conductoare și delimitate geometric, ceea ce limitează cantitatea de polimer.

2.2 Sinteza chimică

Polimerizarea chimică are o serie de avantaje comparativ cu procesul electrochimic și anume flexibilitatea sintezei și procesabilitatea polimerului prin oportunitatea modificării covalente [39]. Principalul impediment al acestui tip de sinteză este cantitatea mare de oxidant necesară pentru procesul de oxidare al monomerului [40].

CPs preparați chimic și electrochimic au aplicabilitate ridicată în domenii fizico-chimice precum dezvoltarea de dispozitive electrocrome de afișare [45-47], condensatoare [48], acumulatori [49], celule fotovoltaice [50] și materiale anticorozive [51], însă, domeniile bioanalitice necesită materiale biocompatibile, cu procesabilitate bună, eficiente economic și din punct de vedere al protecției mediului [52]. Astfel, metode ecologice de sinteză a CPs au fost explorate și vor fi prezentate în continuare.

2.3 Sinteza biocatalitică a polimerilor conductori (CPs): polipirol (Ppy)

Metodele biocatalitice pentru prepararea CPs cuprind o varietate de tehnici care utilizează oxidanți biologici și/sau cantități biocatalitice de oxidanți în condiții prietenoase cu mediul precum condiții fiziologice de temperatură și pH, fără produși toxici secundari [53]. Pentru sinteza polimerilor conjugați, enzimele utilizate sunt oxidoreductazele, care catalizează oxidarea monomerului și formarea de lanțuri polimerice [62].

2.3.1 Sinteza catalizată de peroxidază

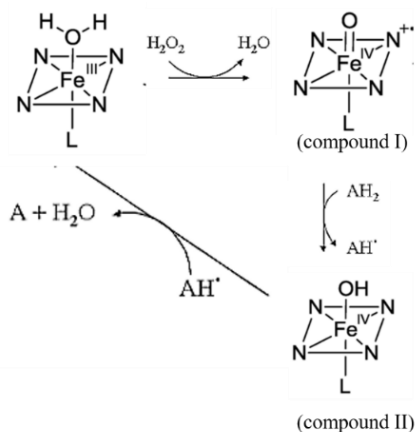


Figura 2.1. Mecanismul catalitic al peroxidazei (adaptat din [62, 74]).

2.3.2 Sinteza catalizată de laccază

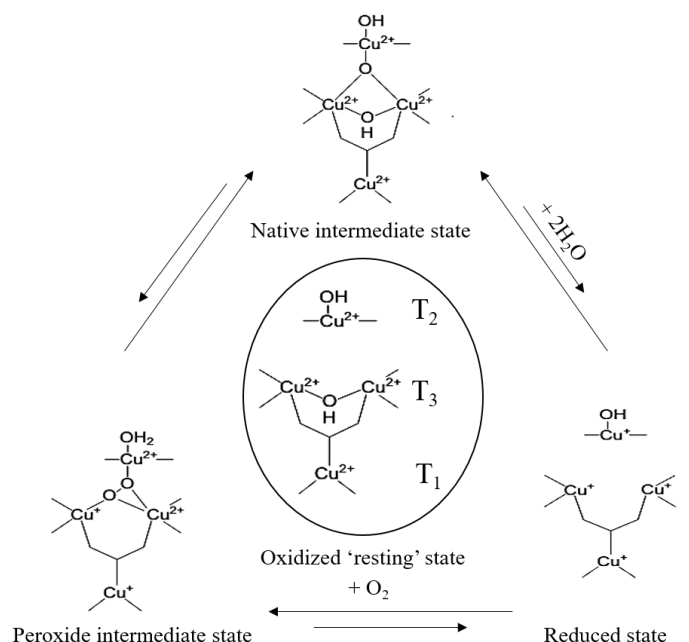


Figura 2.2. Mecanismul catalitic al laccazei (adaptat din [62]).

Cataliza laccazică diferă de cea peroxidazică deoarece acceptorul final de electroni al laccazei este oxigenul molecular, iar pentru peroxidază, prezența peroxidului de hidrogen este necesară [109]. Acest aspect este avantajos în sinteza CPs întrucât suplimentarea cu oxidanți chimici nu este necesară. În plus, laccaza manifestă stabilitate superioară în condiții acide [110, 111].

2.3.3 Biosinteza polymerilor conductori (CPs) cu alte enzime

Implicarea mecanismului catalitic al glucozoxidazei în obținerea CPs a fost introdusă relativ recent [27, 151, 152] și reprezintă o tehnică ingenioasă deoarece mecanismul catalitic nu depinde de suplimentarea progresivă cu H₂O₂ (cazul peroxidazei), ci utilizează oxigenul molecular și glucoza, pentru a genera H₂O₂ (Figura 2.3).

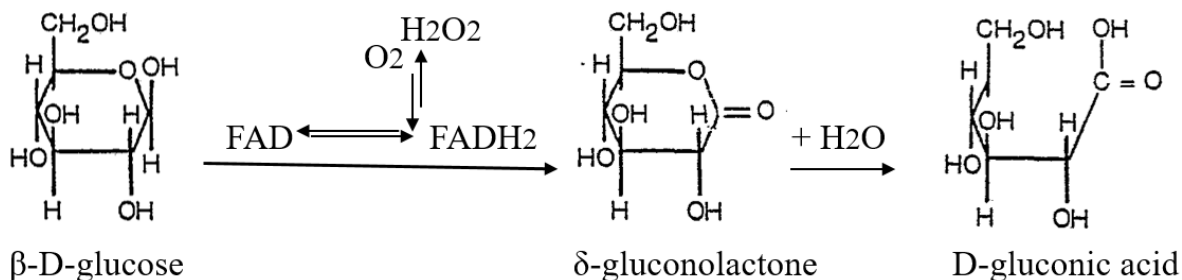


Figura 2.3. Mecanismul catalitic al glucozoxidazei (adaptat din [138]).

2.3.4 Sinteza polipirolului (Ppy) cu microorganisme

Polimerizarea materialelor plastice biocompatibile utilizând microorganisme a fost investigată anterior [144], însă sinteza CPs mediată de microorganisme a fost raportată abia recent. În urma cercetărilor menționate anterior, în cadrul cărora extracte enzimatiche crude au fost eficiente în sinteza polimerilor și în absența activității enzimatiche, în cadrul acestei cercetări, biosinteza polipirolului (Ppy) în culturi celulare a fost realizată. Bacterii filamentoase din genul *Streptomyces* spp., recunoscute pentru producția de fenoloxidaze (PPOs) [145] precum laccaza, au demonstrat abilitatea de a induce polimerizarea pirolului *in situ* [146]. În continuare, micromicete din genul *Aspergillus niger*, producătoare de glucoxidază au fost utilizate, iar, în urma polimerizării biocatalitice, suprafața biomasei fungice a fost acoperită cu Ppy [147]. Polimerizarea pirolului poate fi bazată și pe enzimele oxidative localizate în membrana celulară a drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*, care în urma funcționalizării cu molecula redox ($\text{Fe}(\text{CN})_6$), a demonstrat abilitatea de a induce producerea Ppy, oferind oportunități de aplicare a celulelor în domenii biomedicale [148, 149]. Recent, Zhang et al. [164] a raportat funcționalizarea celulelor de *Shewanella oneidensis* cu ioni de Fe^{3+} , ceea ce, în mod similar, duce la acoperirea celulelor bacteriene cu Ppy, intensificând proprietățile de transfer electronic și oferă posibilitatea aplicării în celule de biocombustibil (MBFCs).

3. Caracterizarea și proprietățile polimerilor conductori (CPs): polipirol (Ppy)

Caracteristica reprezentativă a CPs este natura intrinsec conductoare, iar această secțiune va fi dedicată studiului structural și optoelectronic a Ppy în funcție de metoda de sinteză. Studiul va evidenția proprietățile spectroelectrochimice ale Ppy preparat prin metode biocatalitice.

3.1 Modele fundamentale în caracterizarea spectroelectrochimică a polipirolului (Ppy)

Unul din modelele teoretice fundamentale în caracterizarea Ppy a fost consacrat de Bredas et al. [154, 155] și descrie oxidarea monomerului care rezultă în creșterea frecvenței legăturilor duble și scăderea frecvenței legăturilor simple în cadrul structurii polimerice conjugate. Acest proces este echivalent cu formarea distorsiunilor localizate datorate formării de purtători de sarcină electrică. Aceștia reprezintă cvasi-particule denumite radicali cationi/polaroni și radicali dicationi/bipolaroni. Polaroni sunt formați la nivele scăzute de oxidare iar la nivele de oxidare superioare, se asociază devenind bipolaroni. Astfel, conductivitatea electrică a CPs este un rezultat direct al mobilității purtătorilor de sarcină electrică de-a lungul lanțului conjugat [10].

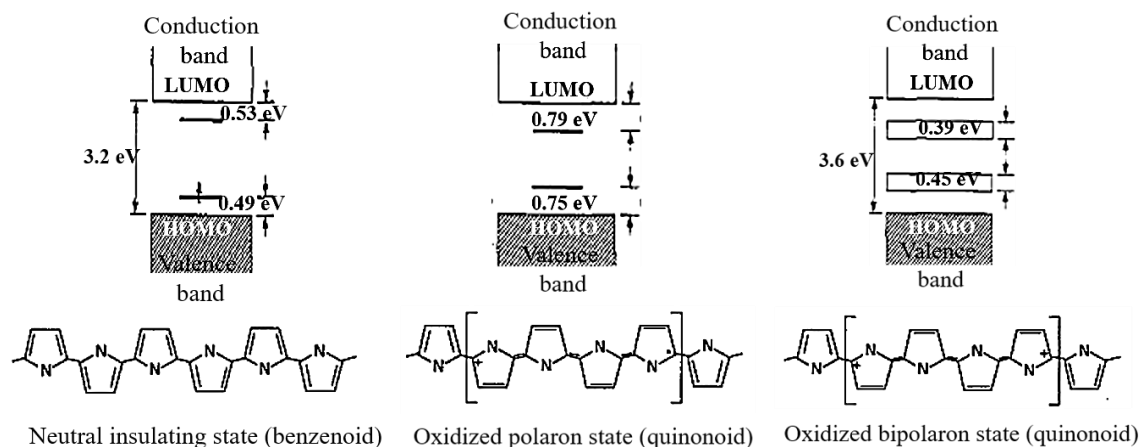


Figura 3.1. Diagrama de benzi energetice și evoluția structurii chimice a Ppy în stări oxidative progresive (adaptat din [10, 156]).

Caracterizarea optică, corelată cu proprietățile electrice ale CPs este validată de studii electrochimice [164-168] și structurale [169, 170]. Din punct de vedere electrochimic, mecanismul de alternare al Ppy din stare izolatoare în stare conductoare este un proces cheie. Alternarea caracterului electric este rezultatul transferului de electroni la sau de la structura de Ppy, simultan cu inserția sau repulsia ionilor de semn contrar din structura polimerică. Această reacție poate fi indusă prin variația potențialului și/sau a pH-ului ceea ce rezultă în schimbări de masă/volum, semnificative în domenii biomedicale precum sisteme de livrare a medicamentelor și mecanisme de bioacționare.

3.2 Caracteristici spectroelectrochimice ale polipirolului (Ppy) obținut prin biocataliză

În urma dezvoltării modelelor de caracterizare pe baza Ppy sintetizat chimic și electrochimic, interpretarea proprietăților Ppy-lui produs prin biocataliză este disponibilă. Caracteristicile spectroelectrochimice ale Ppy-lui biosintetizat denotă efectul oxidativ blând al biocatalizei enzimatică. Condițiile fiziologice precum mediul apos și pH-ul neutru sunt rareori adecvate formării de lanțuri polimerice extinse și ordonate. În cele multe cazuri, cataliza enzimatică promovează oligomerizarea și precipitarea oligomerilor de pirol datorită atacului nucleofilic al apei asupra lanțului polimeric. Defectele prezente în structura conjugată duc la pierderea conductivității electrice. Totuși, procesul poate fi perfecționat prin suplimentarea cu matrici polimerice tip șablon și/sau mediatori redox, ceea ce poate duce la un produs final cu o conductivitate adecvată printr-o sinteză prietenoasă cu mediul. În plus, încorporarea enzimei în structura polimerică este o caracteristică promițătoare pentru bio-aplicații.

4. Bio-aplicații ale polimerilor conductori (CPs): polipirol (Ppy)

Deși aplicațiile CPs originează în chimia-fizică, în urma identificării biocompatibilității lor, au fost explorați domenii bio-medicale de la stimularea electrică a creșterii și adeziunii celulelor și țesuturilor la livrarea medicamentelor, biosenzori și mecanisme de bio-acționare [181-186]. Avantajele prezentate sunt eficiența economică, facilitatea și versatilitatea sintezei precum și abilitatea de funcționalizare în funcție de specificitatea aplicației. Ppy-ul este reprezentativ în bio-aplicații datorită biocompatibilității sale și a proprietăților electrice, și anume conductivitatea și mecanismul redox alternant. Biosenzorii și celulele de biocombustibil beneficiază de natura sa conductivă, care, asociată biomoleculilor, intensifică transferul electronic, în timp ce, sistemele de livrare a medicamentelor și ingineria tisulară utilizează schimbarea masei și a volumului totodată cu alternarea caracterului redox pentru incluziunea și expluzarea controlată a moleculelor biologice și pentru controlul și monitorizarea activității celulare. Această secțiune reprezintă o sinteză a diverselor bio-aplicații care evidențiază potențialul Ppy. În particular, rolul Ppy în context electroanalitic va fi discutat.

Optimizarea proprietăților CPs pentru bio-aplicații constă în încorporarea moleculelor bioactive în structura polimerică, ceea ce se poate realiza printr-o varietate de tehnici [187, 188]. Metodele fizice includ încorporarea sau absorpția fizică, în timp ce o funcționalizare mai permanentă poate fi obținută prin modificare covalentă fie pre- sau post-polimerizare (Figura 4.1).

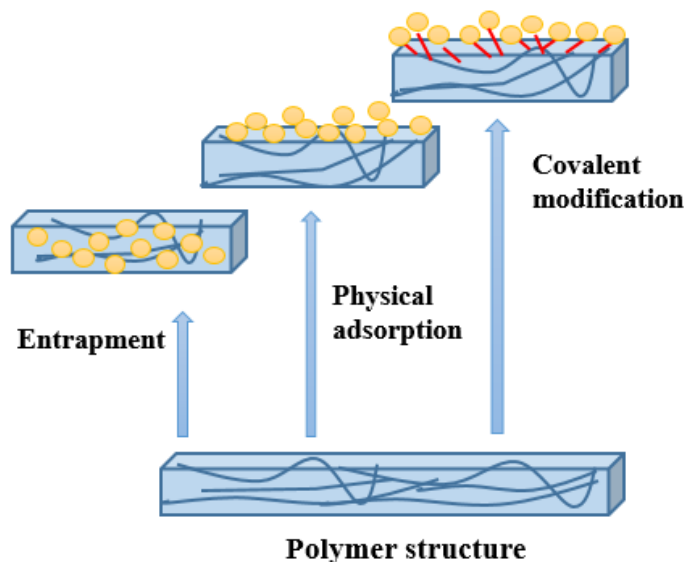


Figura 4.1. Exemple de funcționare a CPs (adaptat din [189]).

4.1 Biosenzori și celule de biocombustie

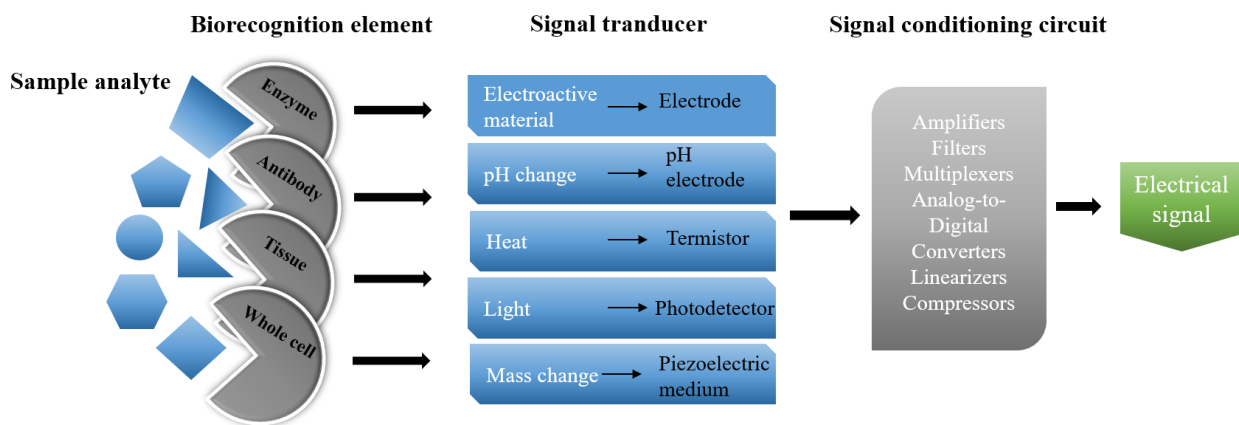


Figura 4.2. Conceptul de funcționare al unui biosenzor (adaptat din [233, 235]).

Obiectivul este acela de a obține un semnal electric echivalent concentrației unui analit specific. De obicei, biomolecula încorporată (ex. enzimă) manifestă un nivel înalt de selectivitate, însă este predispusă denaturării datorate factorilor externi precum: pH, temperatură etc. [236]. Mai mult decât atât, bio-specificitatea poate fi prejudiciată de selectivitatea electrodului. CPs sunt adecvați pentru a media contactul intim între moleculele receptoare și traductor, îmbunătățind detecția analitică [237-239]. Totuși, hidrofobicitatea, porozitatea și suprafața matricii de imobilizare trebuie reglată adecvat.

În ansamblu, Ppy este utilizat extensiv în fabricarea biosenzorilor din numeroase domenii de la diagnoză medicală, ADN și imunosenzori, la monitorizarea mediului și analize în industria alimentară. Mai mult decât atât, proprietățile electrice ale Ppy sunt aplicate în dezvoltarea celulelor de biocombustibil. Acestea sunt bazate pe conversia de energie din surse organice în energie electrică *via* transfer electronic [348-350]. Transferul de electroni poate fi îmbunătățit considerabil prin modificarea anodului cu CPs [351], fie în cadrul celulelor microbiene de biocombustibil (MBFCs) [352-354] sau a celor enzimatică (EBFCs) [355-357].

Concluzii

Acest studiu documentar a avut drept obiectiv evidențierea verisatilității CPs atât în sinteză cât și în aplicabilitate. În particular, s-au avut în vedere progresele efectuate în condiții ecologice și în domenii de cercetare biomedicale și bioanalitice. Astfel, sunt stabilite premisele pentru obținerea Ppy, prin polimerizare *in situ* cu componente biologice precum enzime, țesuturi, celule etc. precum și aplicabilitatea acestui Ppy biosintetizat.

II. Metodologia cercetării

5. Metode biologice de preparare a polipirolului (Ppy)

Tulpinile de microorganisme testate aparțin Colecției de Microorganisme a Centrului de Cercetare Bioaliment (acronim MIUG), Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor, Universitatea Dunarea de Jos din Galați, România. Tulpinile de macromicete aparțin Colecției de culturi a Universității Alexandru Ioan Cuza din Iași. Culturile stoc sunt prezervate în glicerol 20% la -70°C . Pentru studiul abordat, microorganismele utilizate au fost:

- Tulpini bacteriene: genul *Streptomyces* spp.
- Tulpini de macromicete: *Trametes* spp.; *Irpex* spp.
- Tulpini de micromicete: *Aspergillus* spp. (*A. niger*); *Rhizoctonia* spp.;

Reactivii utilizați au fost de cea mai înaltă calitate analitică (Sigma Aldrich) și în toate experimentele s-a utilizat apă distilată sau ultrapură (Smart-N Water Purification System, 18.2 MΩ.cm). Mediile de cultură preparate au fost sterilizate înainte de uz în autoclav la 121°C timp de 20 de minute.

5.1 Cultivarea tulpinilor bacteriene

Toate tulpinile bacteriene testate aparțin genului *Streptomyces* spp. și au fost reactivate prin cultivare solidă în mediu Gause-agar (GMA). Mediul de cultură a fost ajustat la pH 7.2-7.4 și conține: agar (2.5 %), fulgi de cartofi/amidon (2%), K_2HPO_4 (0.05 %), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05 %), KNO_3 (0.1%), NaCl (0.05 %), $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0.001 %). Pentru biosinteza enzimatică, tulpinile bacteriene au fost cultivate în condiții submerse timp de 14 zile la 150 rpm și 25°C (SI-300 53 Litre Shaker Incubator, Biotechnical Services, Inc.).

5.2 Cultivarea tulpinilor fungice

Culturile de fungi au fost reactivate din culturile stoc în plăci Petri cu mediu de cultură Czapek Dox Agar modificat, conținând: sucroză (6 %), KH_2PO_4 (0.1 %), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05 %), NaNO_3 (0.6 %), KCl (0.05 %), $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0.001 %) ajustat la pH 5.0. Pentru prepararea biosenzorilor, atunci când biomasa fungică a fost utilizată pentru biostrat, tulpinile de micromicete au fost reactivate în mediu Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Condițiile de cultivare au fost submerse și aerobe la 27°C și 180 rpm (Heidolph® Unimax 1010 Orbital Shaker).

5.3 Adăugarea pirolului (Py)

Adăugarea monomerului a fost efectuată în a șasea zi de cultivare submersă (30 mM pirol/100 mL cultură). Polimerizarea chimică a Py a fost realizată pentru studiu comparativ, prin adăugarea a 30 mM monomer și 5 mM peroxid de hidrogen (H_2O_2) în 100 mL PBS 0.1 M pH 2.0, metodă adaptată din literatură [17]. Polipirolul (Ppy) sintetizat electrochimic analizat prin spectroscopie în infraroșu aparține Departamentului de Chimie Fizică a Universității Vilnius, Lituania.

6. Analiza mediului de cultură/polimerizare

6.1 Test calitativ pentru detecția peroxidului de hidrogen (H₂O₂)

Testul calitativ pentru H₂O₂ a fost efectuat prin adăugarea de picături de K₂Cr₂O₇ în 1 mL de cultură pentru a observa reducția ionilor dicromat (VI) în ioni cromat (III) în prezența de H₂O₂ cu formarea unui inel de culoare albastru-verde închis [367]. Rezultatele au fost negative pentru toate probele culturale.

6.2 Estimarea conținutului de proteine

Concentrația de proteine a fost determinată estimativ prin metoda Bradford. Analiza oferă informații asupra cantității de proteine (μg) utilizând capacitatea proteinelor de a lega colorantul. Reactivul Bradford a fost preparat urmând protocoalele de specialitate [368, 369]. Conținutul proteic în probele culturale a fost dedus din curba standard de calibrare (Figura 6.1).

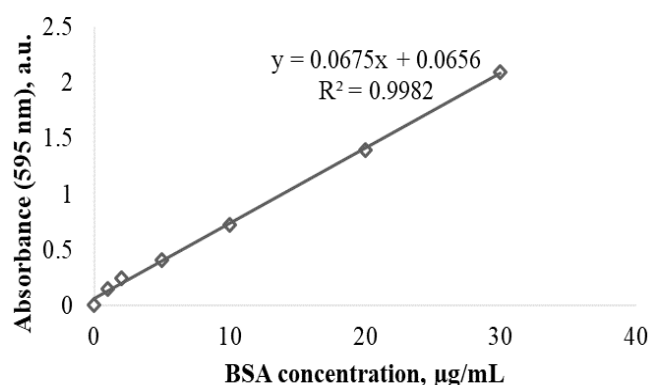


Figura 6.1. Curba de calibrare obținută prin protocolul Bradford.

6.3 Analiza activității fenoloxidazice

Toate analizele enzimatice au fost efectuate în cuvete de plastic (2 mL; 1 cm rază) utilizând spectrofotometrul UV-VIS T90⁺ (PG Instruments, Lutterworth, UK). Metoda analizei activității enzimatice cu siringaldazină drept substrat a fost adaptată din protocoalele Sigma-Aldrich pentru activitate laccazică [380]. Volumul total de reacție (3 mL) a conținut 2.2 mL PBS, 0.3 mL siringaldazină and 0.5 mL extract enzimatic crud. Volumul total de reacție în cazul celorlalte analize a fost 1.5 mL și a conținut 0.1 M soluție tampon, extract enzimatic crud and substrat în cantități egale (0.5 mL/fiecare). Particularitățile fiecărei soluții tampon și a lungimii de undă adecvate fiecărei determinări sunt detaliate în Tabelul 6.2.

Tabelul 6.2. Condițiile analitice pentru determinarea activității fenoloxidazice [371-378].

Substrate	Substrate Concentration, mM	Buffer solution 0.1 M	Wavelength, nm	References (adapted from)
ABTS	1	Acetate pH 5.0	420	[372,373]
Guaiacol	2	Acetate pH 5.0	470	[373,374]
Guaiacol + H ₂ O ₂	2	Acetate pH 5.0	470	[373,374]
Chlorogenic acid	10	Phosphate pH 6.5	400	[374,375]
L-DOPA	10	Phosphate pH 6.5	475	[376]
p-cresol	10	Phosphate pH 6.5	400	[377]

Ferrulic acid	10	Phosphate pH 6.5	410	[378]
Caffeic acid	10	Phosphate pH 6.5	420	[373]
Pyrogallol	10	Phosphate pH 6.5	430	[375]
Pyrocatechol	10	Phosphate pH 6.5	410	[373]
Catechin	10	Phosphate pH 6.5	387	[373]

6.4 Analiza activității glucozoxidazice

Analiza activității glucozoxidazice a fost adaptată din protocoalele Sigma-Aldrich [371] și a constat dintr-un amestec de reacție având compoziția: 0.15 mL soluție de *o*-dianizidină 0.21 mM, 0.1 mL soluție de D-glucoză 10%, 0.15 mL soluție de peroxidază (60 U/mL) și 0.3 extract enzimatic crud sau soluție tampon de Na (50 mM, pH 5.1) pentru proba blank.

Pentru toate analizele activității enzimaticе, creșterea în absorbantă a fost considerată liniară cu conținutul enzimatic. O unitate de activitate enzimatică s-a considerat echivalentul a creșterii absorbantei cu 0.001 pe minut, în condițiile specificate.

6.5 Separarea biomasei și analize de activitate enzimatică intracelulară

Estimarea conținutului proteic și analiza activității enzimaticе la nivel intracelular au fost efectuate pentru biomasa de micromicete (*A. niger*) și de macromicete (*Trametes versicolor* și *Trametes pubescens*). În toate experimentele, biomasa umedă (1g) a fost separată de cultura celulară prin centrifugare la 1000 rpm timp de 10 minute (Hettich® Universal 320R, Sigma-Aldrich), spălare cu soluție salină, mojarare cu 1g nisip de siliciu și omogenizare prin ultrasonicare timp de 10 minute la 27°C (Professional Ultrasonic, GT SONIC). Extractul enzimatic final a fost obținut prin filtrarea fazei lichide rezultate după centrifugare [379].

7. Caracterizarea polipirolului (Ppy) prin metode fizico-chimice și microscopie

7.1 Spectroscopie de absorbție

Analizele preliminare au fost efectuate în cuvete de plastic (2 mL; 1 cm rază) utilizând spectrofotometrul Lambda 25 de la Perkin Elmer (Waltham, US). Spectrele optice înregistrate în a 4-a zi de oligomerizare pentru probele colectate din culturile celulare și din supernatante (diluare 1:10 cu apă ultrapure) au fost luate în considerare în selecția microorganismelor. În continuare, probele colectate în fiecare zi (24h) timp de 8 zile de monitorizare a procesului, au fost diluate cu apă ultrapură (1:20) și analizate în cuvete de cuarț (2 mL; 1 cm rază). Spectrele au fost înregistrate cu spectrofotometrul UV-VIS T90+ (PG Instruments, Lutterworth, UK). Oligomerizarea indusă de H₂O₂ a fost monitorizată timp de 6 zile.

7.2 Metode electrochimice

7.2.1 Voltametrie ciclică (CV) și măsurători în circuit deschis (OCV)

Pentru măsurătorile de CV și OCV s-a utilizat potențostatul Bio-logic SP -150 (Claix, France) cu o celulă electrochimică care conține un fir de Pt - electrod auxiliary, SCE - electrod de referință și GCE - electrod de lucru. Kitul de polizare BASi® a fost utilizat pentru șlefuirea electrozilor care au fost curățați cu etanol/apă înaintea fiecărui experiment. Măsurătorile voltametricе s-au realizat la temperatură ambientală în domeniul de potențial $E = \pm 1V$ vs SCE la viteze de scanare progresive 1-100 mV/s.

Probele analizate au fost: (i) 10 mL fază lichidă/filtrat de cultură separat prin centrifugare (1:10 diluție) înainte și după adăugarea de Py ; (ii) precipitat Ppy-cultură suspendat în PBS 0.1 M pH 6.0; (iii) precipitat Ppy-cultură suspendat în apă ultrapură.

7.2.2 Măsurători de pH

Măsurătorile de pH au fost realizate cu pH-metrul Multiparameter Consort C862 (Turnhout, Belgium) la fiecare 24h timp de 14 zile.

7.3 Tehnici de microscopie

Microscopul digital USB Digital Microscope 500X a fost utilizat pentru vizualizarea caracteristicilor topografice ale peleților fungici implicați în construcția biosenzorilor.

7.3.1 Microscopie optică (OM)

Pentru analiză optică, 1 mL de precipitat Ppy din cultură a fost depus pe o lama de sticlă și uscat în incubator sau la temperatura camerei. Imaginile optice au fost înregistrate cu microscopul optic Brightfield microscope BX51 Olympus (Japan) la magnificare 40x.

7.3.2 Microscopie electronică de baleiaj (SEM)

Investigațiile electronice ale particulelor de Ppy au fost realizate de asemenea pe sediment Ppy-cultură depozitat pe lama metalică/acoperită în folie de aluminiu (SEM) sau pe lama aurită (SEM-FIB). Pentru analizele SEM-FIB, sedimentul a fost acoperit cu folie de Pt. Microscopul electronic JEOL (Boston, US) și FEI Helios Nanolab™ DualBeam™ (Thermo Fisher Scientific) cu fașcicul ionic de Ga⁺ au fost utilizate.

7.4 Spectroscopie FTIR

Spectroscopia FTIR a Ppy format în culturile bacteriene a fost realizată prin două metode: (i) metoda cu peleți de KBr; (ii) metoda reflexiei totale atenuate (ATR). Spectrele realizate cu peleți de KBr au fost înregistrate cu 'BRUKER VERTEX 70' FTIR (USA). Spectrele ATR au fost realizate cu spectrofotometrul BRUKER ALPHA' FTIR (USA). Spectrele FTIR pentru Ppy format în culturile de fungi au fost înregistrate cu spectrometrul Nicolet iS50 Analytical FTIR Spectrometer și programul Software from Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). Domeniul de colecție a datelor a fost 4000–400 cm⁻¹ la rezoluția de 4 cm⁻¹.

8. Construcția și funcționalitatea biosenzorilor

8.1 Măsurători amperometrice și de microscopie electrochimică (SCEM) a biomasei de *Aspergillus niger* MIUG 35

8.1.1 Tratarea electrodului de lucru și prepararea biostratului

Tije de grafit (GR) au fost modificate prin imobilizare a 0.5 mg biomasă umedă cu 4.5 μL 1,10-fenantrolin-5,6-dionă (PD) și atașarea unei membrane carbonat (pori de 3 μm) cu un tub de silicon pentru a evita desprinderea celulelor în soluție.

8.1.2 Principiul măsurătorilor

Investigațiile electrochimice au fost efectuate utilizând potențostatul PGSTAT 30/Autolab (EcoChemie, Utrecht, The Netherlands) și programul GPES 4.9. Sistemul a fost constituit din trei electrozi și anume, electrod de grafit modificat, drept electrod de lucru, electrod de Pt - electrod auxiliar și electrod de Ag/AgCl_(3M KCl) Metrohm (Herisau, Switzerland) - electrod de referință. Experimentele au fost realizate la temperatură ambientală în PBS 1M, pH 6.0 cu 0.1 M KCl și 0.01 M hexacianoferrat drept mediator redox. Detecția electrochimică a fost efectuată prin aditii progresive de glucoză în domeniul de concentrație 5-300 mM.

8.1.3 Imobilizarea biomasei pentru măsurători de microscopie electrochimică (SECM)

Biomasa umedă (1.5 mg) a fost imobilizată cu poli-L-lizină (0.5 μL) și vapori de gluteraldehidă. Conceptul de operare al biosenzorului este ilustrat în Figura 11.1.

8.1.4 Evaluarea activității biomasei prin microscopie electrochimică (SECM)

Sistemul electrochimic a fost format din potențiosstatul PGSTAT 30 Autolab de la EcoChemie (Utrecht, The Netherlands), echipamentul SECM de la Sensolytics (Bochum, Germany) și o celulă electrochimică cu trei electrozi. Un ultramicro electrod (UME) de Pt cu diametrul de 20 μm a fost utilizat drept electrod de lucru, Ag/AgCl - electrod de referință și fir de Pt - electrod auxiliar. Analiza SCEM s-a bazat pe metoda de colectare-generare prin deplasarea microelectrodului pe axa verticală z la viteză de 10 $\mu\text{m s}^{-1}$ și potențial de +0.4 V. În acest context, curba de abordare oferă informații legate de activitatea electrochimică și valorile maxime de curent.

8.2 Măsurători amperometrice pentru biomasa de *Aspergillus niger* MIUG 34

8.2.1 Prepararea biostratului

Pentru biosenzorul microbial simplu, miceliu fungic (biomasă umedă) a fost colectat după 48h de cultivare și separat de cultura celulară (subsecțiunea 6.5). În acest punct al experimentului, monomerul Py (30 mM/100 mL) a fost adăugat în cultura de *A. niger* MIUG 34 rezultând într-un amestec Ppy-biomasă umedă, care a fost colectat după 72h pentru construcția biosenzorului microbial modificat cu Ppy. Conceptul de operare a biosenzorilor dezvoltati este ilustrat în Figura 11.7.

8.2.2 Principiul măsurătorilor

Măsurătorile amperometrice au fost efectuate în condiții de agitare magnetică constantă (120 rpm) iar consumul de oxigen a fost monitorizat la potențial negativ în domeniul 0.55 - -0.7 V vs Ag/AgCl. Experimentele au fost realizate la temperatură ambientală în PBS 0.1 M. S-au utilizat potențiosstatul Gamry și programul Gamry Echem Analyst pentru analiza datelor. Un sistem electrochimic conventional cu electrod de referință (Ag/AgCl), electrod auxiliar (fir de Pt) și electrod de lucru (GCE) a fost utilizat. Kitul de polizare BASi® a fost utilizat pentru șlefuirea electrozilor care au fost curățați cu etanol/apă înainte de fiecare experiment.

8.3 Măsurători amperometrice pentru extractul enzimatic de *Trametes pubescens*

8.3.1 Prepararea biostratului

Pentru primul tip de biosenzor (*TP* biosenzor), extractul enzimatic crud (72h de cultivare submersă) a fost utilizat. În acest punct al experimentului, monomerul Py (30 mM/100 mL) a fost adăugat în supernatantul culturii. Ppy rezultat, colectat după 96h a fost folosit pentru dezvoltarea unui al doilea tip de biosenzor (BioPpy biosenzor). Al treilea tip de biosenzor s-a bazat pe amestecul în proporții egale (1:1) de Ppy biosintetizat și extract enzimatic crud. Al patrulea tip de biosenzor a fost preparat dintr-un amestec în proporții egale (1:1) de Ppy sintetizat chimic și extract enzimatic crud (ChemPpy-*TP* biosenzor). Conceptul biosenzorilor dezvoltati este ilustrat în Figura 11.16.

8.3.2 Principiul măsurătorilor

Măsurătorile au fost bazate pe consumul de oxigen la potențial negativ între -0.55 și -0.8 V vs Ag/AgCl. Catecholul a fost desemnat drept model de substrat fenolic. Concentrații progresive de catechol au fost adăugate în condiții de agitare magnetică constantă (120 rpm) iar consumul de oxigen a fost determinat amperometric. S-au utilizat potențiosstatul Gamry și programul Gamry Echem Analyst pentru analiza datelor. Un sistem electrochimic convențional cu electrod de referință

(Ag/AgCl), electrod auxiliar (fir de Pt) și electrod de lucru (GCE) a fost utilizat. Kitul de polizare BASi® a fost utilizat pentru șlefuirea electrozilor care au fost curățați cu etanol/apă înainte de fiecare experiment.

8.3.3 Analiza în probe reale

Pentru analize în sistem real trei tipuri de vin de fructe: afine, mure și rodie au fost selectate (Kutman Winery brand). Pentru a compara performanța biosenzorilor bazati pe extract enzimatic TP, analiza spectrofotometrică a conținutului fenolic din vin a fost efectuată prin protocolul Folin-Ciocalteu [382]. Pentru analiza spectrofotometrică a probelor de vin, acidul galic a fost înlocuit cu proba de vin diluată 1:10 (20 μL). Rezultatele au fost calculate prin interpolarea valorilor de absorbanță obținute în calibrare.

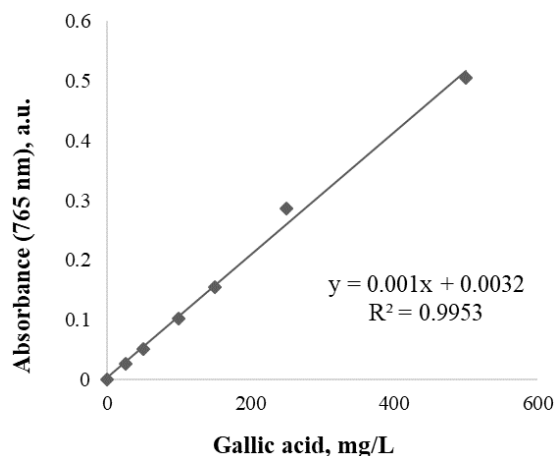


Figura 8.4. Curba de calibrare obținută prin protocolul Folin-Ciocalteu de determinare a conținutului fenolic.

8.4 Analiza statistică și interpretarea rezultatelor

Toate experimentele au fost efectuate în triplicat iar media dintre cele trei valori obținute a fost considerată. Microsoft Excel a fost utilizat pentru determinarea valorilor medii, a deviației și variației standard. Dependența hiperbolică între răspunsul amperometric și concentrația de analit a fost observată în studiul biosenzorilor iar calculul parametrilor cinetici precum curentul maxim (I_{\max}) și constanta Michaelis-Menten (K_m) a fost derivat din analiza curbei reciproce curbei de calibrare (valoare curent (I) vs concentrație substrat (C)), adică curba Lineweaver–Burk ($1/I$ vs $1/C$). Sensibilitatea biosenzorilor a fost calculată astfel: Sensibilitate ($\mu\text{A}/\text{mMcm}^{-1}$) = Ecuație calibrare/Aria electrodului (cm^{-1}). Limita de detecție (LOD) a fost calculată pe baza răspunsului la minim zece adiții separate a câte 0.01 analit, utilizând formula $3 \times$ Deviația Standard la Concentrație Minimă/ Ecuație calibrare [381].

III. Rezultate și discuții

9. Selecția și caracterizarea tulpinilor de microorganisme implicate în bioproducerea polipirolului (Ppy)

Obiectivul preliminar al acestei cercetări a fost testarea diferitor tipuri de microorganisme în scopul selecției celor capabile să inițieze bioconversia pirolului (Py) în polipirol (Ppy). Performanța culturilor de microorganisme testate a fost evaluată în funcție de formarea de Ppy, care a fost determinată prin diferite tehnici. Inițial, tehnici de microscopie precum microscopia optică (OM), microscopia electronică de baleiaj (SEM) și microscopia cu fașcicul ionic (FIB) au fost utilizate pentru vizualizarea formării de Ppy. În plus, analiza spectroscopică în infraroșu (FTIR) s-a aplicat pentru

identificarea legăturilor chimice corespondente structurii de Ppy. Selecția culturilor adecvate și caracterizarea Ppy format sunt prezentate în cadrul acestui capitol.

9.1 Bioproducerea polipirolului (Ppy) în culturi submerse de bacterii filamentoase

9.1.2 Formarea polipirolului (Ppy) în culturi submerse de *Streptomyces* spp.

Închiderea la culoare a culturilor în urma adăugării de monomer a fost considerată un prim indiciu calitativ. Din 25 de tulpini, 11 au demonstrat închidere la culoare în timpul cultivării submerse, indiciu al bioconversiei pirolului. Tulpinile respective sunt enumerate în Tabelul 9.2.

Tabelul 9.2. Abilitatea culturilor de *Streptomyces* spp. de a iniția bioproducția de Ppy

<i>Streptomyces</i> spp. code	Ppy bioproduction	<i>Streptomyces</i> spp. code	Ppy bioproduction
MIUG 12p	<input checked="" type="checkbox"/>	RA	<input checked="" type="checkbox"/>
MIUG 4.88	<input checked="" type="checkbox"/>	RD	<input checked="" type="checkbox"/>
MIUG 4.89	<input checked="" type="checkbox"/>	RE	<input checked="" type="checkbox"/>
LP1	<input checked="" type="checkbox"/>	1b4	<input checked="" type="checkbox"/>
LP2	<input checked="" type="checkbox"/>	b2	<input checked="" type="checkbox"/>
B	<input checked="" type="checkbox"/>	41	<input checked="" type="checkbox"/>
3Fi	<input checked="" type="checkbox"/>	46	<input checked="" type="checkbox"/>
3Fs	<input checked="" type="checkbox"/>	72	<input checked="" type="checkbox"/>
3Fsc	<input checked="" type="checkbox"/>	107	<input checked="" type="checkbox"/>
S1	<input checked="" type="checkbox"/>	LH	<input checked="" type="checkbox"/>
S3	<input checked="" type="checkbox"/>	8p	<input checked="" type="checkbox"/>
MIUG 4.38	<input checked="" type="checkbox"/>	SNA	<input checked="" type="checkbox"/>
V3C	<input checked="" type="checkbox"/>		

9.1.3 Identificarea polipirolului (Ppy) format în culturile de *Streptomyces* spp. prin microscopie optică (OM)

Formarea de Ppy a avut loc sub formă de microparticule sferice de culoare neagră în jurul coloniilor bacteriene, observabile în 48h de la adăugarea monomerului. Două culturi de *Streptomyces* spp. modificate cu Ppy (MIUG 12p și MIUG 4.88) au fost selectate drept modele de analiză.

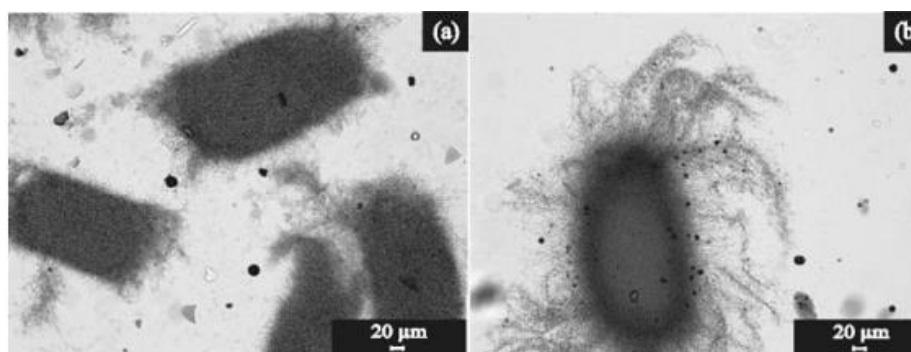


Figura 9.3 Identificarea de Ppy în culturile de *Streptomyces* spp.: (a) MIUG 12p; (b) MIUG 4.88.

În continuare, evaluarea optică a formării de Ppy a fost realizată în toate culturile de *Streptomyces* ssp. cu rezultat pozitiv (Tabelul 9.2) iar identificarea de Ppy este ilustrată în Figura 9.4.

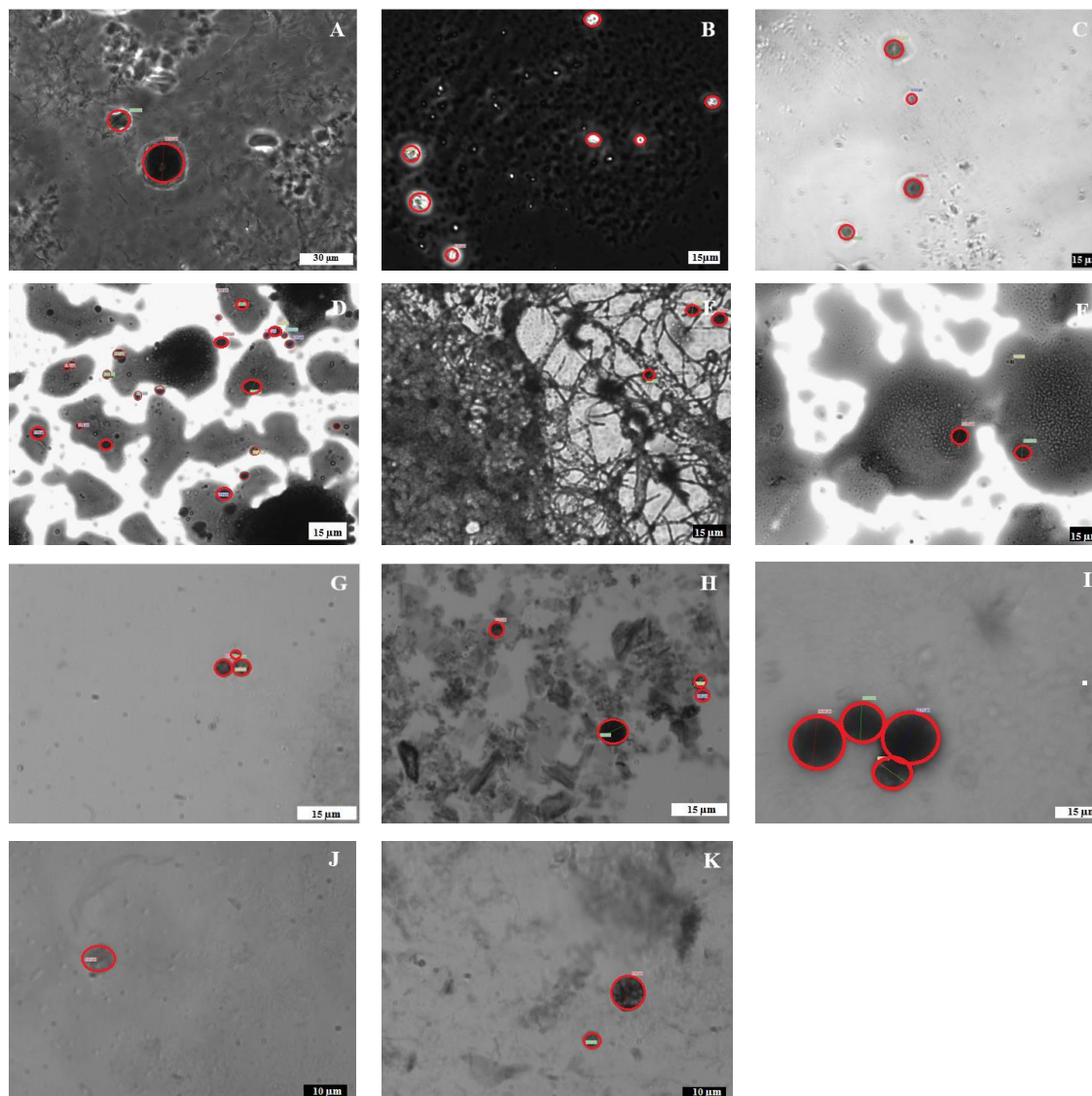


Figura 9.4. Identificarea de Ppy în culturile de *Streptomyces* ssp. (de la stânga la dreapta): (A) MIUG 12p; (B) MIUG 4.88; (C) MIUG 4.89; (D) LP1; (E) LP2; (F) B; (G) S1; (H) RD; (I) RE; (J) 41; (K) 72.

Diferențele în mărime și frecvență a particulelor de Ppy identificate prin OM (Figura 9.4.) sunt datorate diferențelor în eficiență oxidativă a culturilor de *Streptomyces* spp., care catalizează bioconversia Py la rate diferite. Astfel, s-a observat că o concentrație mică de particule de Ppy este asociată cu diametre ridicate ale particulelor (în cazul Ppy-MIUG 12p), iar o frecvență mai mare a particulelor este întâlnită în cazul particulelor cu dimensiuni mai mici (Ppy-MIUG 4.88). Este posibil ca pe parcursul procesului de oligomerizare să aibă loc conglomerarea particulelor de Ppy în unele culturi, precum *Streptomyces* ssp. MIUG 12p, ceea ce explică dimensiunile ridicate și frecvența scăzută a particulelor.

9.1.4 Identificarea polipirolului (Ppy) format în culturile de *Streptomyces* spp. prin microscopie electronică de baleiaj (SEM) și microscopie cu rază ionică (FIB)

Investigații adiționale asupra morfologiei și topografiei structurilor de Ppy au fost realizate cu SEM și SEM-FIB.

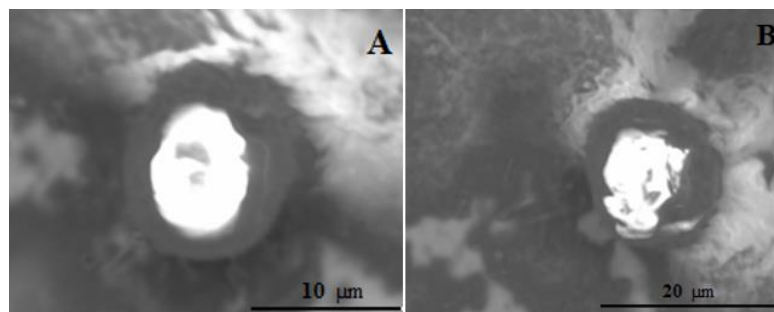


Figura 9.5. Identificarea de Ppy în culturile de *Streptomyces* spp. prin SEM: (A) MIUG 12p; (B) MIUG 4.88.

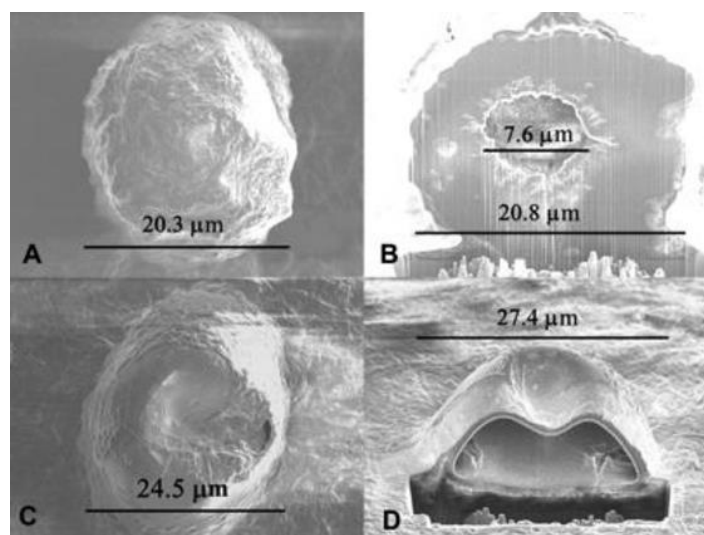


Figure 9.6. Vizualizare FIB-SEM a: (A, B) Ppy - MIUG 12p; (C, D) Ppy - MIUG 4.88; A, C - perspectivă de suprafață; B, D - secțiune interioară.

Perspectiva interioară obținută prin tehnica FIB confirmă interiorul vid al particulelor de Ppy, o caracteristică interesantă cu potențial în aplicații care necesită imobilizarea și eliberarea controlată a moleculelor precum sistemele de livrare ale medicamentelor (DDSs) [183, 215].

Precum s-a observat din OM, particulele de Ppy-MIUG 12p au dimensiuni ridicate și frecvență mai redusă decât cele de Ppy-MIUG 4.88. Astfel, caracterul compact al structurilor de Ppy-MIUG 12p ilustrate mai sus poate fi datorat procesului de conglomerare discutat anterior. Polimerizarea mai rapidă permite dezvoltarea suplimentară a structurilor polimerice cu agregarea particulelor de dimensiuni mai mici în structuri conglomerate și compacte.

9.1.5 Identificarea structurală și caracterizarea polipirolui (Ppy) format în culturile de *Streptomyces* spp. prin spectroscopie FTIR

Spectroscopia FTIR reprezintă o tehnică de spectroscopie în infraroșu care identifică compușii chimici prin detecția de legături chimice. Acest studiu este bazat pe premisa că adăugarea de Py în culturi de microorganisme care biosintetizează oxidoreductaze duce la formarea de Ppy. Validarea acestei premise este dată de analiza în infraroșu a microparticulelor formate.

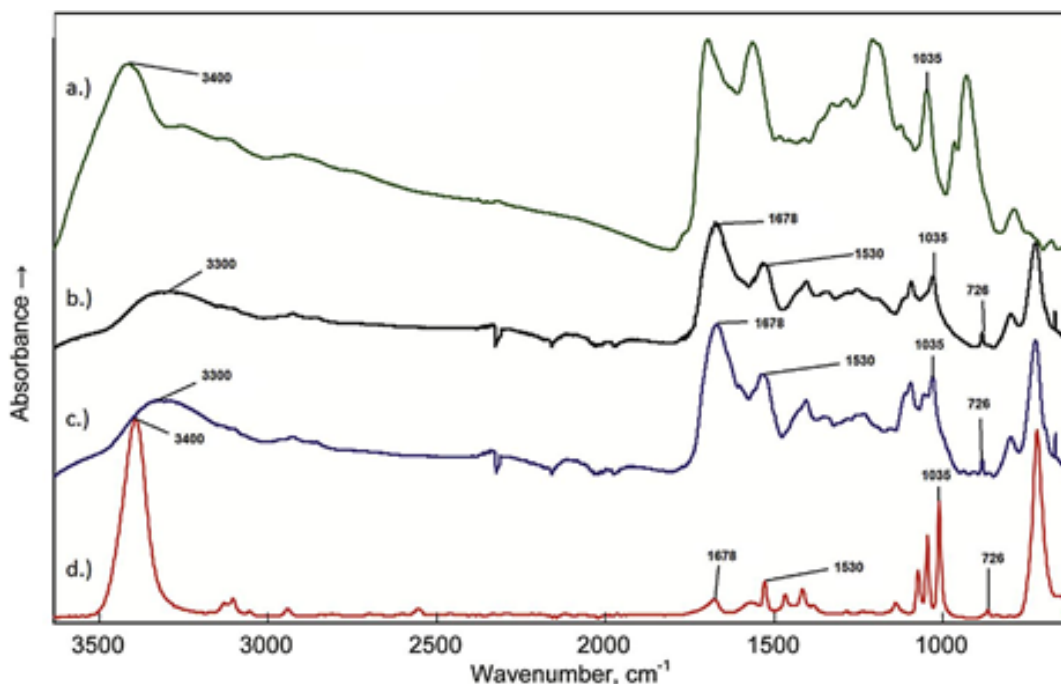


Figura 9.7. Spectre FTIR pentru: (a) Electro-Ppy; (b) Ppy- MIUG 12p; (c) Ppy-MIUG 4.88; (d) Py.

Benzile caracteristice structurii Ppy sunt observate, și anume: 1530 cm^{-1} , indică vibrația de întindere a inelului de pirol (C-C/C=C); $1450\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$, întinderea legăturilor conjugate C-C și C-N, 1236 cm^{-1} , vibrația de deformare planară a C-N, 1035 cm^{-1} și 726 cm^{-1} , vibrația de agitare a legăturii N-H. Banda extinsă înregistrată între $3300\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ în probele analizate este atribuită vibrațiilor de întindere ale legăturii N-H din inelul pirolic și este asociată cu Ppy în stare primară [386, 387]. Banda de vibrație la 1678 cm^{-1} corespunde întinderii grupării C=O și este datorată mediului apos de polimerizare și efectul acestuia asupra structurii polimerice.

9.2 Bioproducerea polipirolului (Ppy) în culturi submerse de fungi

În urma analizei formării de Ppy în culturile bacteriene, procesul a fost explorat mai departe. Observațiile asupra catalizei efectuate de culturile bacteriene precum facilitatea de sinteză, caracterul ecologic și aspectele economice au inspirat explorarea formării de Ppy prin implicarea altor tipuri de microorganisme.

9.2.2 Formarea polipirolului (Ppy) în culturi submerse de fungi

În urma schimbării culorii culturilor drept indicator al abilității acestora de a iniția bioproducția de Ppy, două din cinci culturi de macromicete au fost evidențiate, enumerate în Tabelul 9.5. În mod similar, două din șase culturi de micromicete au demonstrat abilitatea de a iniția bioproducția de Ppy (enumerate în Tabelul 9.6).

Tabelul 9.5. Abilitatea culturilor de macromicete de a iniția bioproducția de Ppy.

Strain classification	Ppy bioproduction
<i>Trametes versicolor</i>	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Trametes pubescens</i>	<input checked="" type="checkbox"/>
<i>Trametes hirsuta</i>	<input type="checkbox"/>
<i>Trametes gibosa</i>	<input type="checkbox"/>
<i>Irpex lacteus</i>	<input type="checkbox"/>

Tabelul 9.6. Abilitatea culturilor de micromicete de a iniția bioproducția de Ppy.

Strain isolation code	Ppy bioproduction
MIUG 34	<input checked="" type="checkbox"/>
MIUG 35	<input checked="" type="checkbox"/>
KM 53	<input type="checkbox"/>
KM 56	<input type="checkbox"/>
KM 55	<input type="checkbox"/>
KM 57	<input type="checkbox"/>

9.2.3 Identificarea polipirolului (Ppy) format în culturile de funghi prin tehnici de microscopie

Evaluarea microscopică a particulelor de Ppy formate în cele două tipuri de culturi fungi testate (macro- și micromicete) va fi prezentată în continuare.

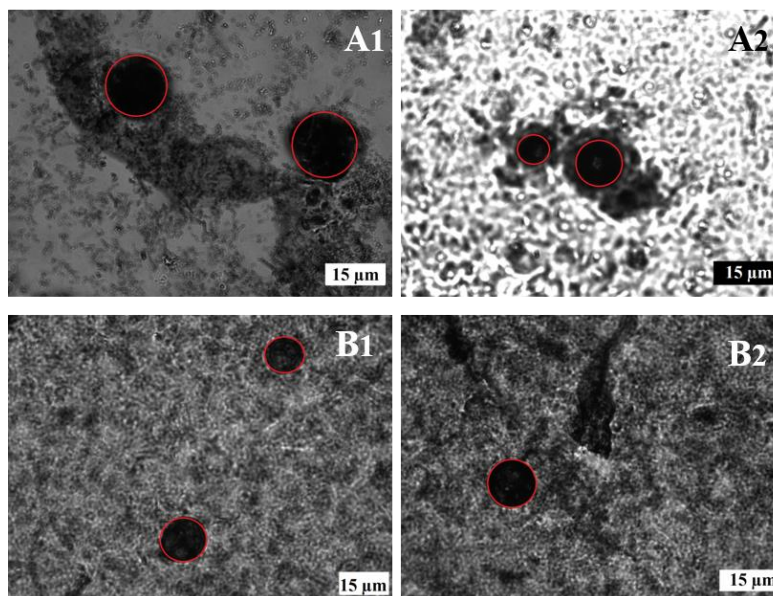


Figura 9.12. Identificarea de Ppy în culturile submerse de macromicete: (A₁, A₂) TV, (B₁, B₂) TP.

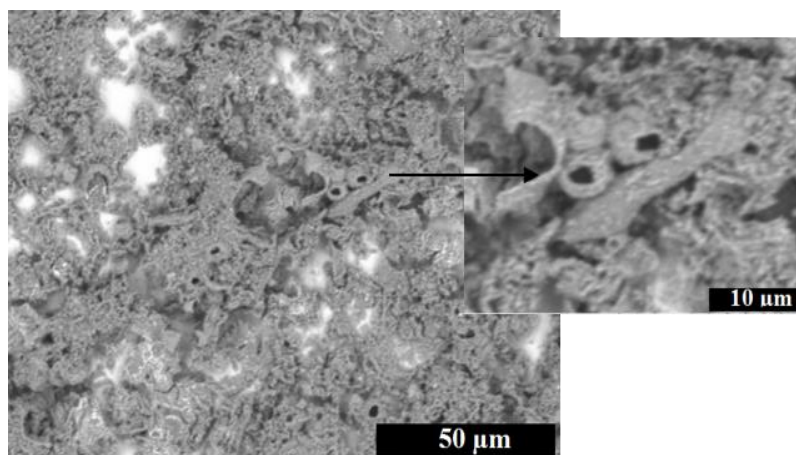


Figura 9.13. Identificarea de Ppy în cultura TV prin SEM.

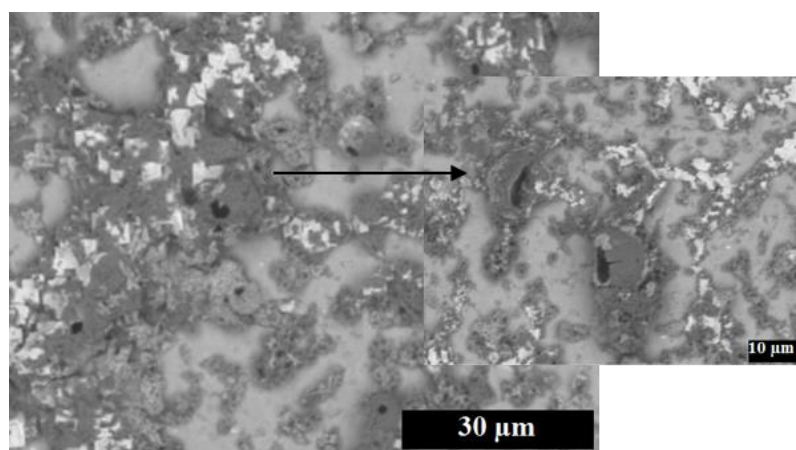


Figura 9.14. Identificarea de Ppy în cultura TP prin SEM.

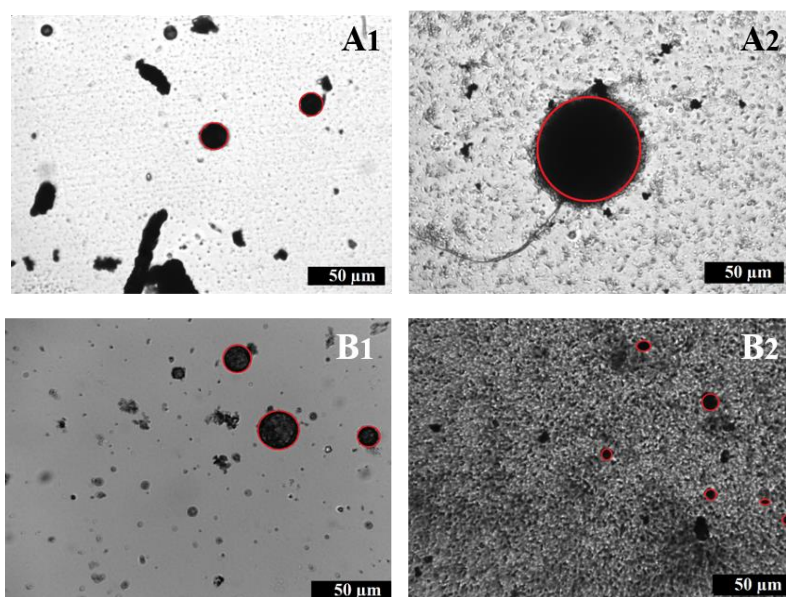


Figura 9.15. Identificarea de Ppy în culturile de micromicete: (A₁, A₂) *A. niger* MIUG 34; (B₁, B₂) *A. niger* MIUG 35.

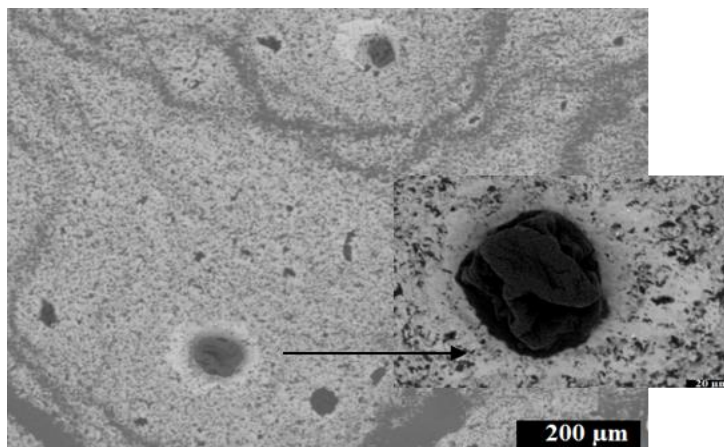


Figura 9.16. Identificarea de Ppy în cultura *A. niger* MIUG 34 prin SEM.

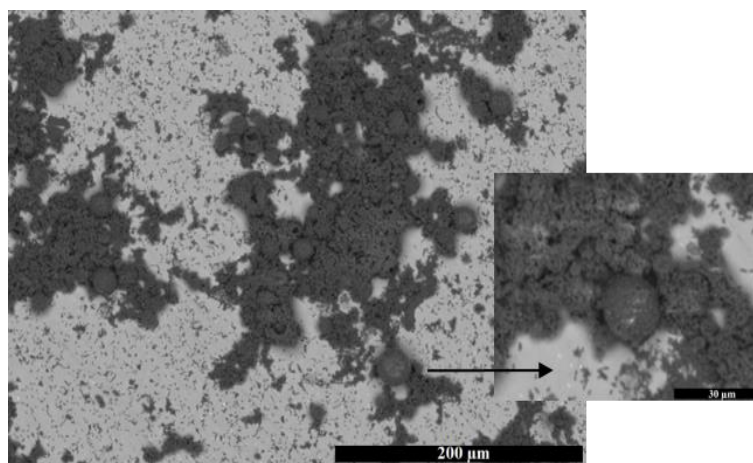


Figura 9.17. Identificarea de Ppy în cultura *A. niger* MIUG 35 prin SEM.

Din evaluarea optică realizată, poate fi estimat faptul că frecvența particulelor de Ppy este mai scăzută în culturile de macromicete decât în culturile de *Streptomyces* spp., iar dimensiunea particulelor este similară (diametrul 10-20 μm).

În urma investigațiilor formării de Ppy în culturile submerse de micromicete, concluziile sunt: (1) frecvența particulelor de Ppy-MIUG 35 este mai mare decât a celor de Ppy-MIUG 34; (2) dimensiunea particulelor de Ppy-MIUG 34 este superioară. Diametrul particulei de Ppy ilustrată în Figura 9.16 (Ppy-MIUG 34) este de aprox. 75 μm iar cele ilustrate în Figura 9.17 (Ppy-MIUG 35) variază în diametru între 10-30 μm.

Imagistica SEM demonstrează faptul că particulele de Ppy formate în culturile de micromicete au caracteristici structurale similare cu cele identificate în culturile de macromicete și de bacterii filamentoase, precum densitate scăzută și tendință spre deformare mecanică sub acțiunea factorilor externi. S-a concluzionat că bioproducția de Ppy este favorizată în culturile de fungi comparativ cu cele bacteriene din punct de vedere al vitezei de bioconversie. Acest aspect poate fi atribuit biosintezei de oxidoreductaze în sistem submers și/sau pH-ului de sinteză.

9.2.4 Identificarea structurală și caracterizarea polipirolului (Ppy) format în culturile de fungi prin spectroscopie FTIR

Spectrele FTIR oferă informații asupra caracteristicilor structurale ale materialelor cu conductivitate intrinsecă precum CPs datorită abilității de a vizualiza nivelul de conjugare, adică întinderea legăturilor duble și restrângerea celor simple, proces corespondent cu dezvoltarea conductivității [177, 393-395]. Atribuirea benzilor în infraroșu a fost inspirată din literatura de specialitate [387, 396, 397] și este detaliată în Tabelele 9.7 și 9.8 (detalii asupra protocolului FTIR în Secțiunea II, subcapitolul 7.4).

Tabelul 9.7. Atribuirea benzilor FTIR pentru Ppy format în culturile de macromicete: Ppy-TV and Ppy-TP.

Assignment	Ppy-TV	Ppy-TP
C-H / N-H in-plane deformation	1035 cm ⁻¹	1035 cm ⁻¹
C-N stretching	1396 cm ⁻¹	1396 cm ⁻¹
C-C / C=C backbone stretching	1532 cm ⁻¹	1532 cm ⁻¹
C=O stretching vibrations	1624 cm ⁻¹	1624 cm ⁻¹
CH₂ asymmetric stretching and symmetric vibrations	2920 cm ⁻¹	2920 cm ⁻¹
N-H / C-H stretching vibrations	3270 cm ⁻¹	3270 cm ⁻¹

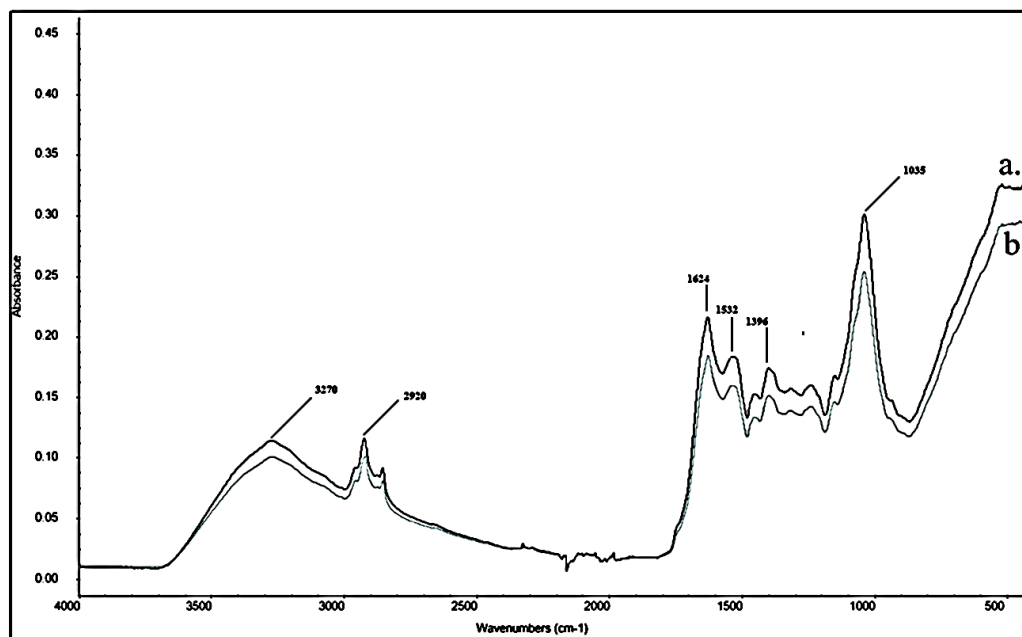


Figura 9.18. Spectrele FTIR ale Ppy format în culturile de macromicete: (a.) Ppy-TV; (b.) Ppy-TP.

Tabelul 9.8. Atribuirea benzilor FTIR pentru Ppy format în culturile de micromicete: Ppy - MIUG 34 and Ppy - MIUG 35.

Assignment	Ppy-MIUG 34	Ppy-MIUG 35
C-H / N-H out-of-plane deformation ring breathing vibration	1027 cm ⁻¹	1027 cm ⁻¹
C-H / C-N in-plane deformation	1247 cm ⁻¹	1247 cm ⁻¹
C-N conjugated stretching	1374 cm ⁻¹	1374 cm ⁻¹
C–C / C=C backbone stretching	1548 cm ⁻¹	1548 cm ⁻¹
C=O stretching vibrations	1744 cm ⁻¹ - 1640 cm ⁻¹	1744 cm ⁻¹ - 1640 cm ⁻¹
CH ₂ asymmetric stretching and symmetric vibrations	2923 cm ⁻¹ - 2853 cm ⁻¹	2923 cm ⁻¹ - 2853 cm ⁻¹
N-H / C-H stretching vibrations	3276 cm ⁻¹	3273 cm ⁻¹

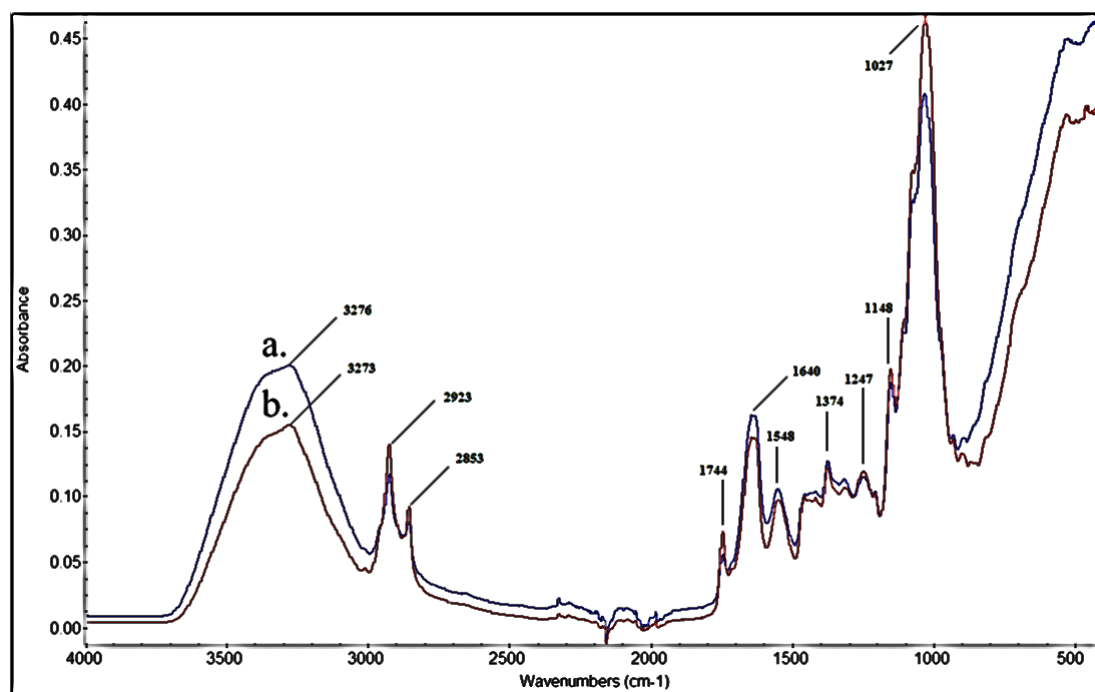


Figura 9.19. Spectrele FTIR ale Ppy format în culturile de micromicete: (a.) Ppy-MIUG 34; (b.) Ppy-MIUG 35.

Spectrele prezentate în figurile de mai sus dovedesc că microparticulele formate în culturile de fungi au legături chimice specifice structurii Ppy.

Concluzii

Obiectul preliminar al acestei cercetări a fost selecția tulpinilor de microorganisme cu abilitatea de a induce bioconversia Py în condiții prietenoase cu mediul, economice și eficiente. În acest scop, douăzeci și cinci de tulpini de bacterii filamentoase din genul *Streptomyces* spp., cinci tulpini de macromicete (*Trametes* spp., *Irpex* spp.) și șase tulpini de micromicete (*Aspergillus niger*, *Rhizoctonia* spp.) au fost testate prin cultivare submersă și adăugare ulterioară de Py. Tulpinile de *Streptomyces* ssp. au fost testate inițial iar particule de Ppy au fost observate în unsprezece din cele douăzeci și cinci de tulpini. Dintre tulpinile de fungi testate, particule de Ppy s-au format doar în patru culturi, două de macromicete din genul *Trametes* spp. și două de micromicete din genul *Aspergillus niger* sp..

Observarea particulelor de Ppy a fost efectuată prin diverse tehnici de microscopie. OM a arătat că structurile de Ppy sunt sferice și micrometrice în toate probele analizate. Datorită diferenței în eficiență oxidativă a culturilor, dimensiunile și frecvența particulelor de Ppy formate sunt dependente de cultura utilizată drept mediu de polimerizare. În continuare, tehnici de microscopie SEM și SEM-FIB au fost utilizate pentru obținerea unei perspective tri-dimensionale a particulelor polimerice.

Analiza spectroscopică FTIR a identificat compoziția particulelor formate prin detecția legăturilor chimice și a dovedit că sunt structurate din Ppy. În plus, această tehnică a oferit informații cu privire la structura Ppy format. Benzile de vibrație principale, specifice structurii de Ppy au fost similare pentru Ppy format în cele trei tipuri de culturi (bacteriene, de macromicete și de micromicete). În afara benzilor principale specifice structurii chimice a Ppy, benzi adiționale au indicat nivelul oxidativ scăzut al polimerului format precum și prezența grupării acetat datorită efectului mediului apos de polimerizare.

Deși culturile microbiene reprezintă medii extrem de complexe care nu au permis cuantificarea cantității de Ppy bioproduct, performanța culturilor investigate în această etapă a studiului a fost evaluată din punct de vedere al ratei de oligomerizare și doar cele patru tulpini fungice (*TV*, *TP*, *A. niger* MIUG 34, *A. niger* MIUG 35) au fost selectate pentru continuarea cercetării. Conceptul propus are caracter preliminar, promovând noutatea bioproducției de Ppy prin utilizarea de resurse sustenabile.

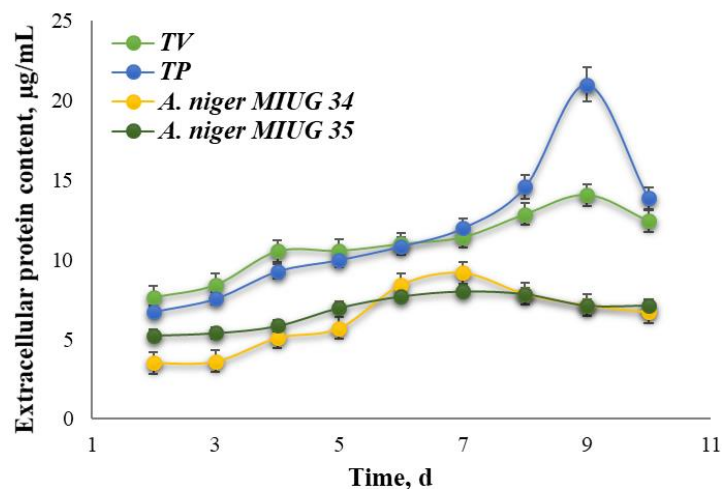
10. Monitorizarea și caracterizarea spectroelectrochimică a formării polipirolului (Ppy) în culturile de fungi

Acest capitol este devotat monitorizării și caracterizării procesului de bioproducție a Ppy. Deoarece conceptul propus este bazat pe producția de oxidoreductaze de către tulpinile de microorganisme în condiții de cultivare submerse, obiectivul primar a fost analiza celor patru culturi fungice utilizate drept medii de polimerizare. Pentru fiecare cultură în parte s-au efectuat estimări de conținut proteic și analize de activitate enzimatică pentru fenoloxidaze (PPOs) și glucozoxidază (GOx). În urma investigațiilor enzimatiche, mecanisme de formare ale Ppy sunt propuse.

Procesul de oligomerizare și proprietățile optoelectrice ale Ppy format au fost investigate îndeaproape prin spectroscopie de absorbție și măsurători electrochimice (voltametrie ciclică, măsurători în circuit deschis, pH).

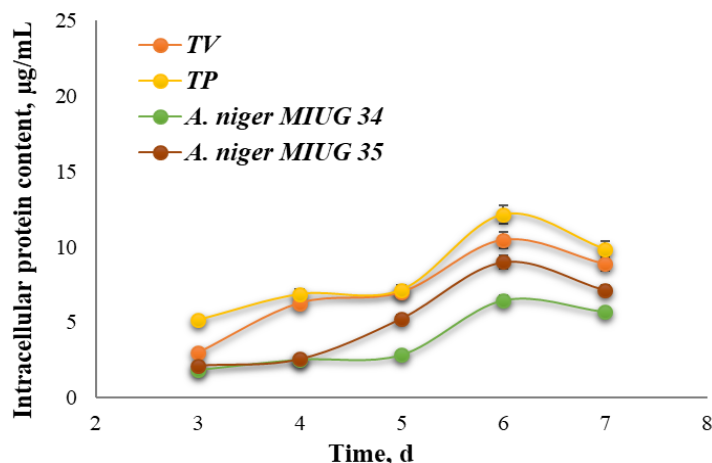
10.1 Caracterizarea culturilor de fungi utilizate ca medii de polimerizare

10.1.2 Biosinteza proteinelor în culturile de fungi



Rezultatele denotă un randament de proteine mai ridicat în culturile de macromicete (*TV*, *TP*) decât în culturile de micromicete (*A. niger* MIUG 34, *A. niger* MIUG 35) atât la nivel extracelular cât și intracelular. Totuși, diferența este evidențiată mai ales extracelular. Importanța evaluării biosintezei de proteine este legată de faptul că secreția de proteine reprezintă un proces cheie în dezvoltarea fungilor [400].

Figura 10.1. Estimarea conținutului proteic la nivel extracelular.

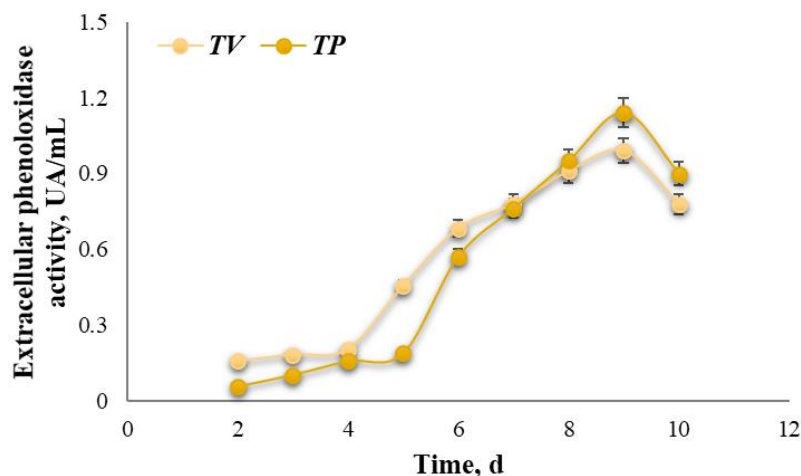


Iar momentul optim de adăugare a monomerului Py a fost ales în funcție de evoluția creșterii fungilor.

Figura 10.2. Estimarea conținutului proteic la nivel intracelular.

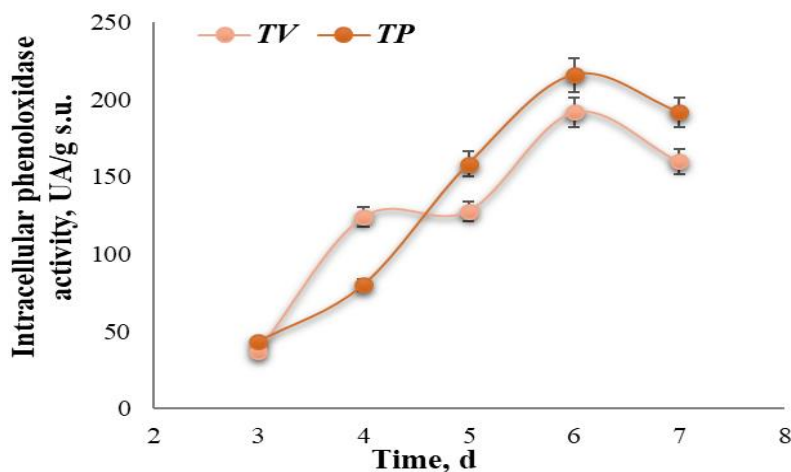
10.1.3 Biosinteza fenoloxidazelor (PPOs) în culturile de fungi

Cei mai uzuali biocatalizatori implicați sunt discutați în Secțiunea I, subsecțiunea 2.3 și includ peroxidazele, laccaza și glucozoxidaza (GOx). Studiul a exclus peroxidaza deoarece nu s-a adăugat H_2O_2 în cultură pe durata oligomerizării iar testul calitativ efectuat pentru detecția de H_2O_2 endogen a fost negativ (subsecțiunea 10.1.1). Astfel, cercetarea s-a centrat pe analiza activității laccazice, ca parte a grupului de fenoloxidaze (PPOs) și a activității glucozoxidazice.



Analiza enzimatică extracelulară indică randament ascendent de PPO până în ziua a 9-a de cultivare pentru ambele probe culturale (Figura 10.3).

Figura 10.3. Activitatea fenoloxidazică extracelulară în culturile de maromicete.



Investigațiile intracelulare indică creșterea activității enzimatică până în ziua a 6-a de cultivare (Figura 10.4).

Cultura *TP* denotă randament enzimatic ușor superior comparativ cu *TV*, ceea ce poate fi anticipat din estimările de conținut proteic. Rezultatele analizelor enzimatică sunt similare cu datele din literatură referitoare la abilitatea macromicetelor de a biosinteza PPOs [412-414].

Figura 10.4. Activitatea fenoloxidazică intracelulară în culturile de maromicete.

Randamentul enzimatic desemnează culturile de macromicete drept medii de polimerizare adecvate atât în prezența cât și în absența biomasei, deoarece biosinteza enzimatică are loc atât la nivel extracelular cât și intracelular.

Dificultatea în a diferenția activitatea laccazică comparativ cu activitatea altor tipuri de fenoloxidaze e derivată din sensibilitatea la analiză, dependentă de eficiența substratului enzimatic [416]. Astfel, pentru a obține informații adiționale asupra tipului de PPO biosintetizată în culturile de fungi selectate, extractul enzimatic extracelular a fost analizat cu 11 substraturi diferite. Această analiză are rol în înțelegerea originii și eficienței catalitice a celor două culturi de macromicete implicate în oxidarea Py.

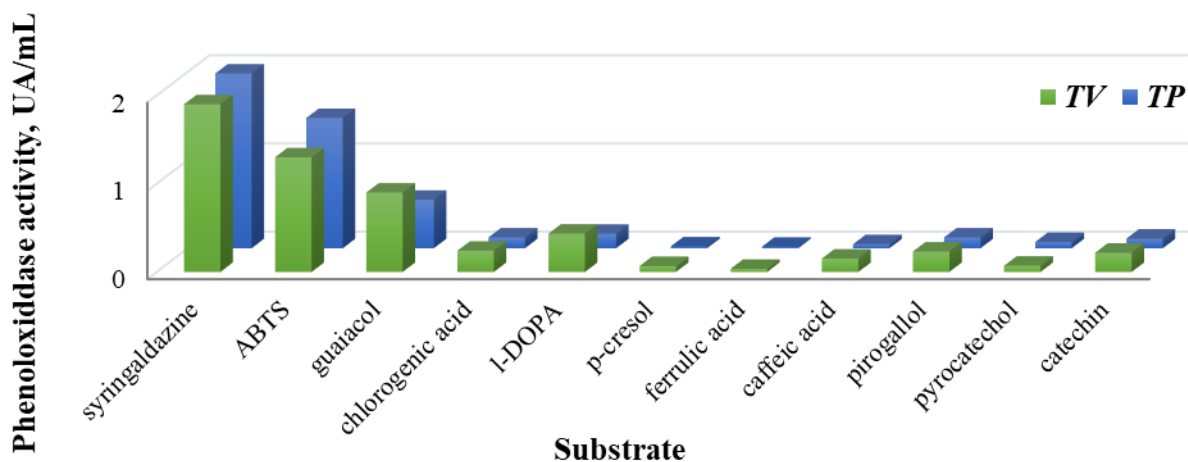


Figura 10.5. Activitatea fenoloxidază extracelulară la diferite substraturi.

Randamentul enzimatic cel mai ridicat a fost înregistrat pentru substraturile enzimice specifice laccazei precum ABTS și siringaldazină, ceea ce denotă că enzima biosintetizată prevalent în cele două culturi este laccaza [97, 105, 417].

Mecanismul de producție a Ppy bazat pe laccază a fost identificat în literatura de specialitate și implică reacția redox dintre ionii de Cu(II) și Cu(I) care are loc la situsul activ al enzimei, rezultând în oxidarea a patru unități de Py de către cei patru ioni de cupru, urmată de dimerizare și polymerizare. Astfel, mecanismul propus pentru formarea de Ppy prin cataliză laccazică este ilustrat în Figura 10.6.

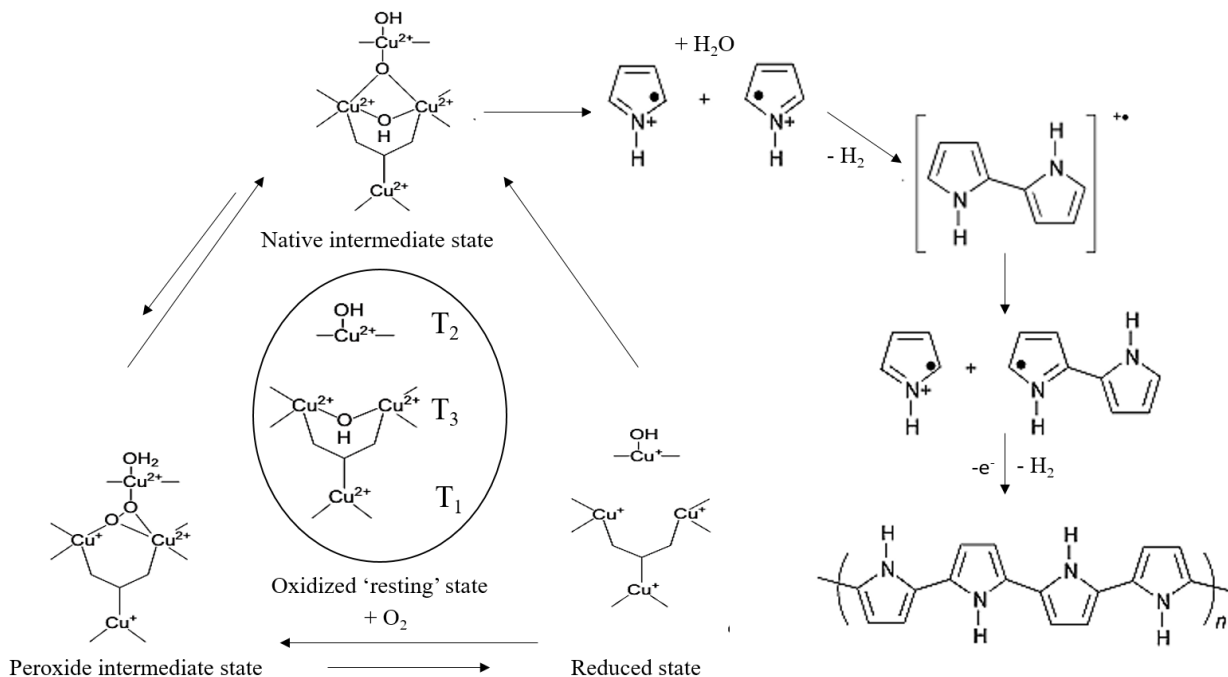
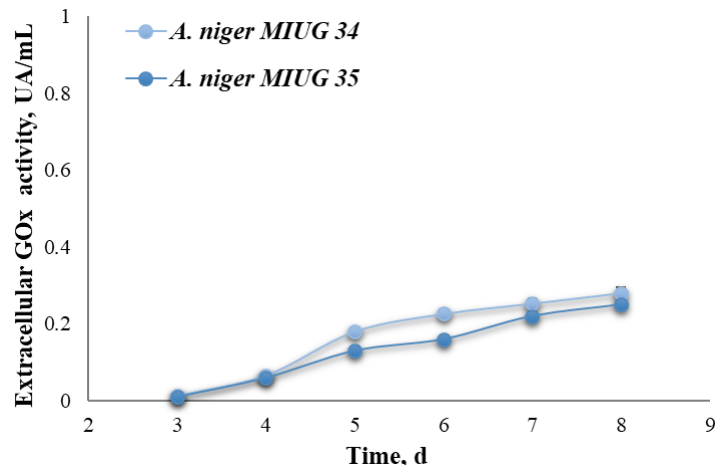


Figura 10.6. Ruta propusă pentru producția de Ppy prin acțiunea biocatalitică a laccazei (inspirată din [62, 117]).

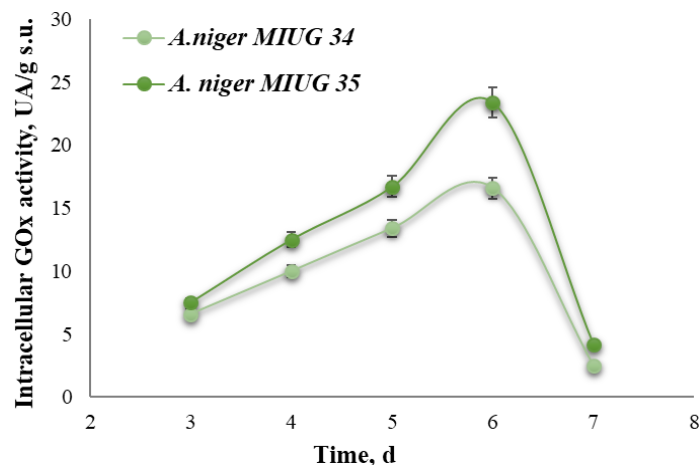
10.1.4 Biosinteza glucozoxidazei (GOx) în culturile de fungi

Rezultatele analizelor de activitate glucozoxidazică au fost negative pentru probele din culturile de macromicete (*TV*, *TP*), care au demonstrat anterior activitate fenoloxidazică. Activitatea glucozoxidazică evaluată în culturile de *A. niger* MIUG 34 și *A. niger* MIUG 35 extra- și intracelulară este ilustrată în Figurile 10.7 și 10.8.



La nivel extracelular, activitatea GOx este similară în ambele probe, iar intracelular, *A. niger* MIUG 35 are randament enzimatic superior.

Figura 10.7. Activitatea glucozoxidazică extracelulară în culturile de micromicete.



Activitate GOx a fost mai scăzută a extracelular decât intracelular pentru cele două culturi de micromicete, ceea ce este în acord cu datele din literatură asupra localizării GOx în miceliul de *A. niger* [133, 134].

Figura 10.8. Activitatea glucozoxidazică intracelulară în culturile de micromicete.

În timp ce procesul de oligomerizare în culturile de macromicete (*TV*, *TP*) nu poate fi atribuit unei singure enzime deoarece numeroase proteine cu situs activ de cupru sunt biosintetizate în mediu, în cazul culturilor de micromicete, este admisibil că acțiunea catalitică a GOx este dominantă în oligomerizarea Py. Deși alți factori enzimatici pot fi prezenți, H_2O_2 reprezintă un oxidant puternic care are acțiune prevalentă în inițierea oxidării Py.

Mecanismul prin care GOx catalizează bioproducția de Ppy poate fi descris astfel: GOx catalizează conversia D-glucozei în acid gluconic în prezența oxigenului, generând H_2O_2 , care la rândul lui, inițiază oxidarea Py. Mecanismul biocatalitic, inspirat din literatura de specialitate [135, 136, 343] este ilustrat în Figura 10.9.

Predilecția pentru biosinteza intracelulară a GOx în culturile de micromicete indică favorizarea bioproducției de Ppy în prezența biomasei decât în supernatantul culturilor datorită secreției enzimatică limitate în afara membranei celulare. Acest aspect impune bioproducția de Ppy utilizând

culturi celulare și oferă potențial pentru bio-aplicații care beneficiază de componente microbiene precum biosenzorii microbieni sau celulele microbiene de combustibil.

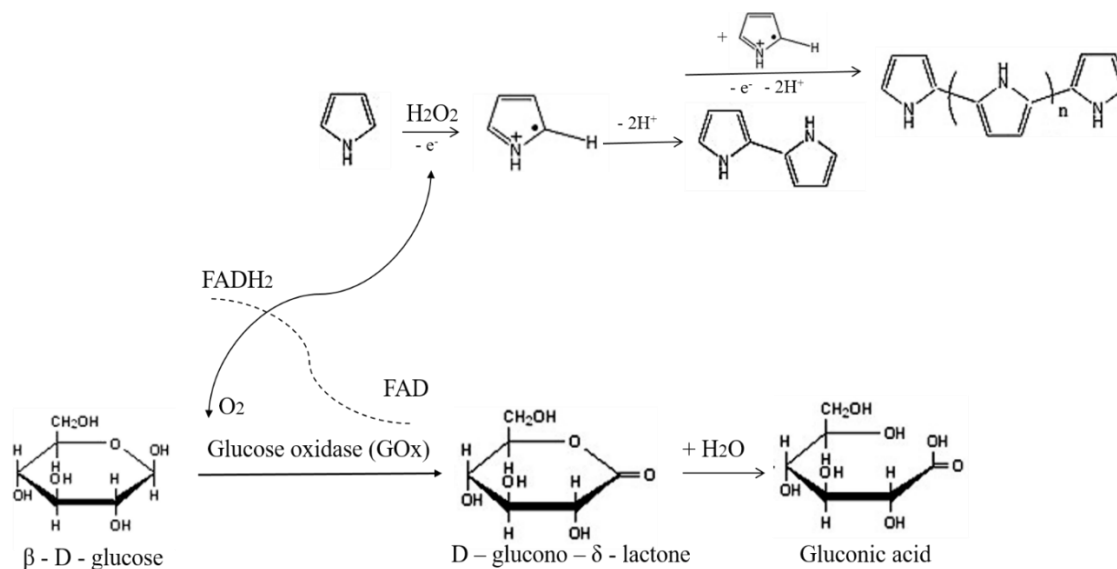


Figura 10.9. Ruta propusă pentru producția de Ppy prin cataliză glucozoxidazică (inspirată din [27, 28]).

10.2. Monitorizarea și evaluarea oligomerizării pirolului (Py) prin spectroscopie de absorbție

Spectroscopia UV-Vis este o tehnică adecvată pentru observarea procesului de oligomerizare a Py întrucât benzile de absorbție optică indică formarea lanțului de Ppy și caracteristicile electrice intrinsece ale acestuia (sintetizat în Secțiunea I, subsecțiunea 3). Caracteristicile electrice ale polymerului conductiv sunt rezultatul direct al lățimii benzii energetice dintre banda de valență (VB) și banda de conducție (CB), corespondente cu nivelele energetice ale orbitalilor moleculari. Formarea și oxidarea lanțurilor polimerice au drept rezultat formarea de stări electronice localizate în interiorul benzii interzise care denotă creșteri energetice spre lungimi de undă mai mari [10, 152, 155, 159]. Gradul de oxidare al polymerului duce la formarea de purtători de sarcină cationici și/sau dicationici, fiecare cu un nivel de energie specific (lungime de undă).

Acest studiu a monitorizat oligomerizarea Py prin spectroscopie UV-Vis datorită aspectelor inovative introduse de formarea de Ppy prin biocataliză *in situ*. S-au observat efectele oxidative ale culturilor de fungi prin estimarea lungimii și conductivității oligomerilor de Py formați.

10.2.2 Evaluarea oligomerizării pirolului (Py) în culturile de fungi

Monitorizarea oligomerizării de Py a fost efectuată pentru fiecare tulpină selectată în (i) cultura celulară și în (ii) supernatantul culturii (detalii de metodologie în Secțiunea II, subsecțiunea 7.1). Această analiză validează importanța activității enzimatică (estimate în secțiunea anterioară) în formarea de Ppy.

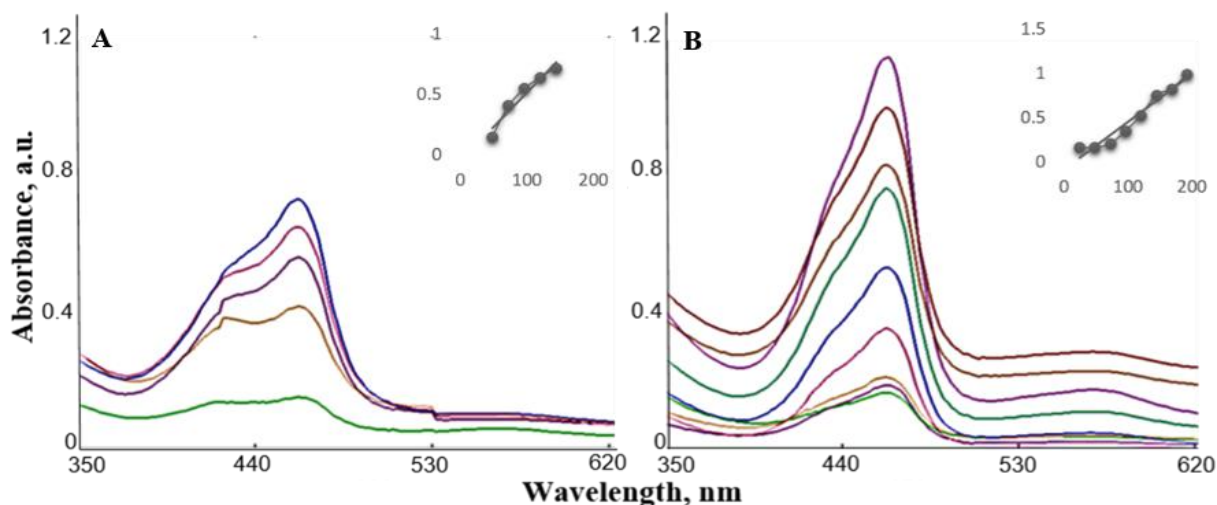


Figura 10.12. Monitorizarea producției de Ppy în TV prin spectroscopie de absorbție: A. supernatant; B. cultură celulară; Creșterea în absorbanță la 460 nm în timp (h) este inserată.

Analizând creșterea în absorbanță, se poate observa faptul că oligomerizarea evoluează mai rapid în cultură celulară (Figura 10.12B) decât în supernatantul culturii (Figure 10.12A). Discrepanța este datorată randamentului superior de PPO în prezența biomasei, ceea ce susține procesul timp mai îndelungat.

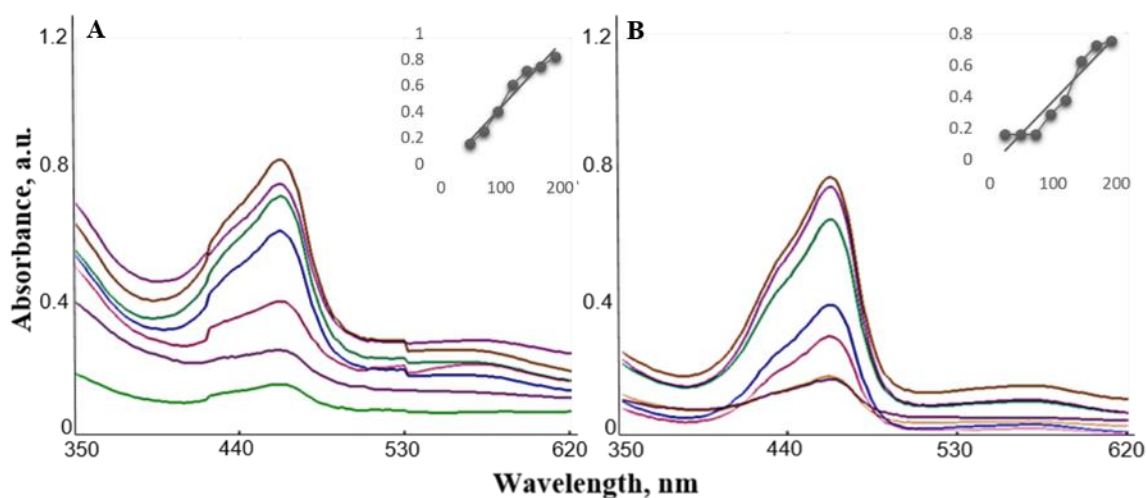


Figura 10.13. Monitorizarea producției de Ppy în TP prin spectroscopie de absorbție: A. supernatant; B. cultură celulară; Creșterea în absorbanță la 460 nm în timp (h) este inserată.

Formarea de Ppy în supernatant (A) și în cultură celulară (B) sunt ilustrate în Figura 10.13. Evoluția lanțului polimeric este similară în ambele cazuri luând în considerare intensitatea absorbanței. Se observă similaritatea cu procesul de oligomerizare înregistrat în TV, din punct de vedere al faptului că supernatantul culturii duce la formarea de lanțuri oligomerice mai scurte, care se unesc și devin lanțuri extinse în timp ce cultura celulară promovează formarea directă de lanțuri extinse de Ppy.

Monitorizarea optică a formării de Ppy prin biocataliza culturilor de micromicete este ilustrată în Figura 10.14.

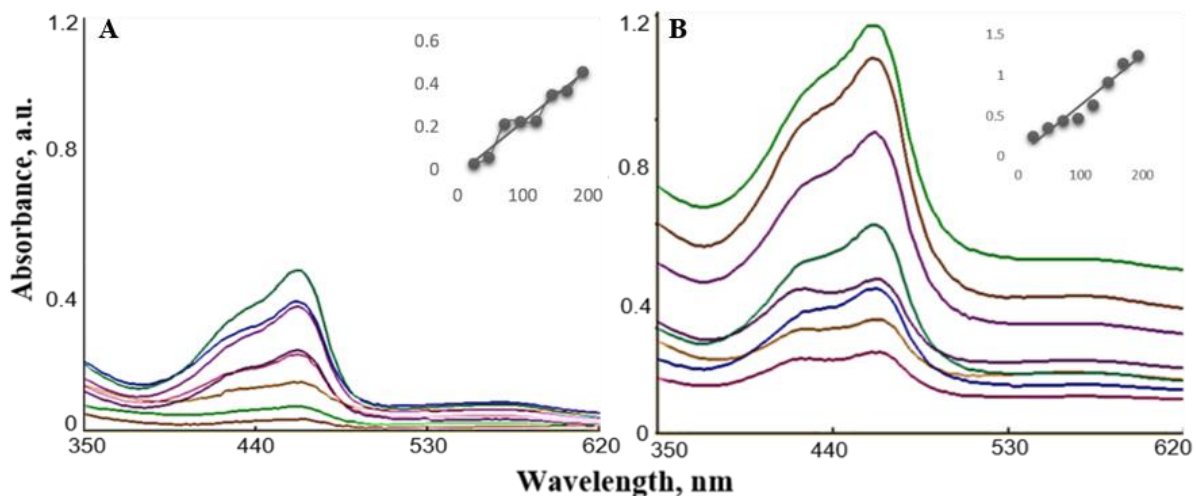


Figura 10.14. Monitorizarea producției de Ppy în *A. niger* MIUG 34 prin spectroscopie de absorpție: A. supernatant; B. cultură celulară; Creșterea în absorbantă la 460 nm în timp (h) este inserată.

După cum se observă din Figura 10.14, diferența între formarea de Ppy în supernatantul culturii (Figure 10.1A) și în cultura celulară (Figure 10.14B) a tulpinii *A. niger* MIUG 34 este considerabilă. Oligomerizarea are loc într-o manieră cvasi-liniară în ambele cazuri: formarea unui lanț oligomeric mai scurt, indicat prin absorpția la 420 nm (Ppy II) și a unui lanț oligomeric mai lung ($\lambda_{\max} = 460$ nm - Ppy I). Totuși, intensitatea de absorpție a fost de trei ori mai mare în cultura celulară decât în supernatant, ceea ce este un indicator al abilității scăzute de a susține bioconversia Py în absența biomasei în cazul culturilor de micromicete. Lanțuri oligomerice separate sunt formate și devin elongate datorită reacției de oligomerizare repetată, unindu-se în două lanțuri principale. În final, unul dintre lanțuri devine extins ($\lambda_{\max} = 460$ nm). Nu au fost observate benzi de absorpție la lungimi de undă mai mari ceea ce denotă ca lanțul de Ppy format cu *A. niger* MIUG 34 nu deține purtători de sarcină.

Discrepanțele între formarea de Ppy în supernatantul (Figure 10.15A) și în cultura celulară (Figure 10.15B) a tulpinii *A. niger* MIUG 35 nu sunt atât de mari. Deși intensitatea de absorpție este aproape dublă în cultura celulară, oligomerizarea evoluează similar în ambele cazuri. Astfel, formarea de lanțuri oligomerice scurte este neglijabilă iar formarea unui lanț extensiv de Ppy ($\lambda_{\max} = 460$ nm) cu intensitate de absorpție ridicată este prevalentă. În plus, o bandă de absorpție la 570 nm, consistentă cu dezvoltarea de sarcini electrice de-a lungul lanțului de Ppy, s-a observat mai ales în cazul polimerizării în cultură.

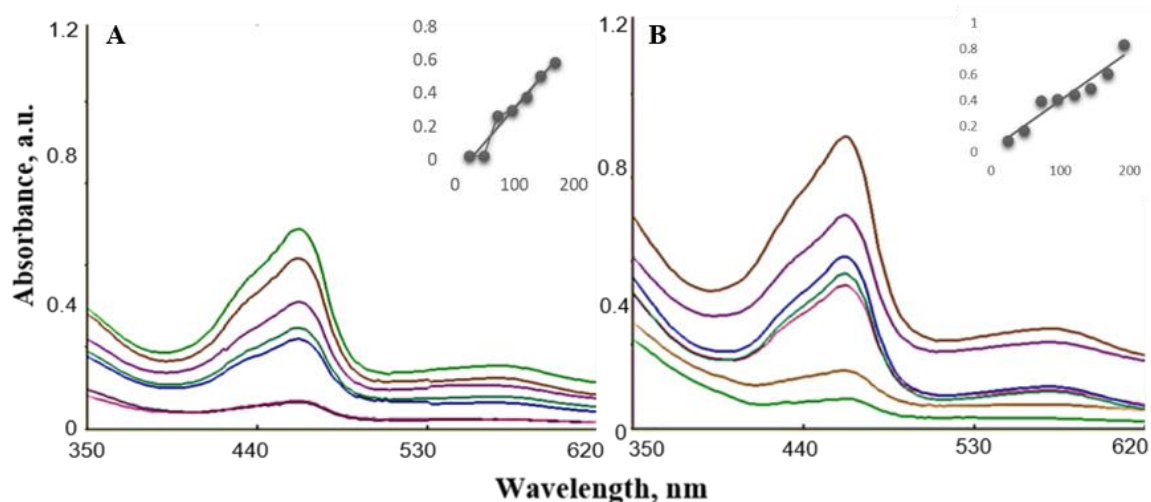


Figura 10.15. Monitorizarea producției de Ppy în *A. niger* MIUG 35 prin spectroscopie de absorbție: A. supernatant; B. cultură celulară; Creșterea în absorbanță la 460 nm în timp (h) este inserată.

Monitorizarea oligomerizării Py catalizată de culturile de micromicete a demonstrat o serie de diferențe în cinetica procesului comparativ cu cataliza efectuată de culturile de macromicete. Discrepanța constă în evoluția procesului în absența vs prezența biomasei. Dacă oligomerizarea este similară pentru *TV* (Figura 10.12) și *TP* (Figura 10.13) fie că supernatantul culturii sau cultura este utilizată drept mediu de polimerizare, în cazul tulpinilor de micromicete (*A. niger* MIUG 34 și *A. niger* MIUG 35), performanța superioară a culturii celulare a fost vizibilă. Acest aspect este legat de biosinteza și localizarea enzimatică.

10.3. Monitorizarea și caracterizarea oligomerizării pirolului (Py) prin tehnici electrochimice

Măsurătorile de absorbție optică au fost utile în evaluarea oligomerizării Py și a formării de lanțuri de Ppy, însă pentru o analiză aprofundată a proprietăților electrice ale Ppy format, s-au utilizat tehnici electrochimice precum voltametrie ciclică (CV), măsurători în circuit deschis (OCV) și măsurători de pH (detalii asupra metodologiei în Secțiunea II, subsecțiunea 7.2).

10.3.1 Caracterizarea oligomerizării pirolului (Py) în culturile de fungi prin voltametrie ciclică (CV)

La viteza de scanare de 1 mV/s, oxidarea monomerului este promovată [172], astfel procesul a fost înregistrat în ziua a 2-a și a 8-a a oligomerizării, oferind posibilitatea comparării epuizării de monomer în fiecare probă. Figurile 10.21 (*TV*, *TP*) și 10.22 (*A.niger* MIUG 34, *A.niger* MIUG 35) ilustrează ciclurile voltametrice primare, deoarece înregistrarea oxidării Py nu ar fi fost adecvată în ciclurile următoare.

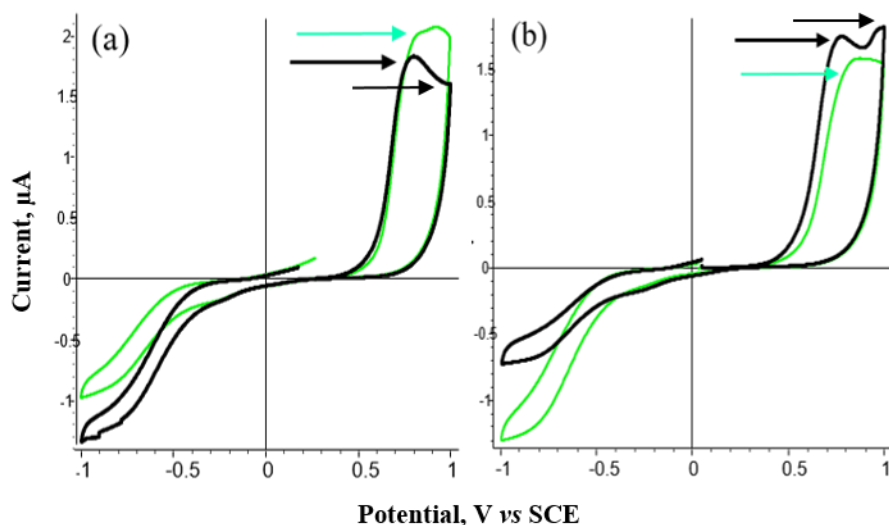


Figura 10.21. Voltamogramele ciclice ale oligomerizării Py în cultura celulară a: (a) *TV*, (b) *TP* în ziua 2 (-), 8 (-); Viteza de scanare: 1 mV/s.

Depleția monomerului Py a progresat cu diferențe minore între cele două culturi de micromicete. În cultura *TV*, s-a observat creșterea în valorile de curent în timp, indicând oxidarea continuă a Py. Evoluția contrară a avut loc în cultura *TP*, ceea ce denotă ca Ppy format nu este susceptibil la oxidare electrochimică. În afara acestor distincții, valorile de potențial anodic au fost foarte similare pentru ambele probe culturale, indicând analogia proceselor.

Intensitatea curentului a fost elevată în cadrul formării Ppy în culturile de micromicete (Figura 10.22) comparativ cu culturile de macromicete (Figure 10.21). În cultura *A. niger* MIUG 34 (Figura 10.22(a)), oxidarea Py evoluează spre valori ridicate de curent în timp, după cum a fost observat și în cultura *TV*, deși peak-urile de oxidare adiționale sunt neglijabile. Oligomerizarea Py în cultura *A. niger* MIUG 35 înregistrează un maxim al intensității curentului în primele două zile, după care curentul scade considerabil.

Astfel, oligomerizarea are loc rapid în cultura *A. niger* MIUG 35 iar produsul Ppy-MIUG 35 nu este disponibil pentru oxidare electrochimică în urma finalizării procesului, la fel ca Ppy-*TP*. Caracteristicile electrochimice ale formării de Ppy-MIUG 34 timp de opt zile (Figura 10.22 (a)-linia verde) prezintă similarități cu evoluția formării de Ppy-MIUG 35 după două zile (Figura 10.22 (b)-linia neagră), astfel cele două culturi de micromicete au o abordare similară în bioconversia de Py, deși la viteze diferite.

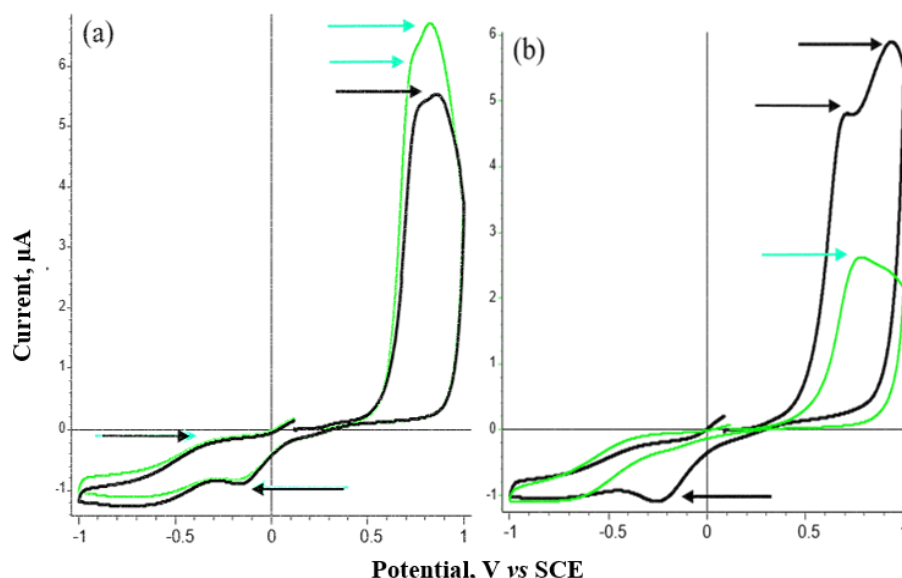


Figura 10.22. Voltamogramele ciclice ale oligomerizării Py în cultura celulară a: (a) *A. niger* MIUG 34, (b) *A. niger* MIUG 35 în ziua 2 (-), 8 (-); Viteza de scanare: 1 mV/s.

În continuare, viteza de scanare a fost elevată la 100 mV/s. Aceste diagrame curent-potențial descriu reacția de oxidoreducere care are loc în timpul procesului de oligomerizare a Py. Analiza parametrilor electrochimici (Tabelele 10.7 și 10.8) indică evoluția reversibilității redox a polimerului pe parcursul oligomerizării. Schimbul electronic este derivat din valoarea lui ΔE_p , care este 0.059, în caz ideal, pentru transferul rapid al unui singur electron la temperatura de 298 K [431] iar reversibilitatea reacției redox este indicată de raportul valorilor de curent (I_{pa}/I_{pc}), care este aproximativ egal cu unitatea pentru reacții reversibile și cvasi-reversibile iar în cazul reacțiilor ireversibile are valoare mai mică decât unitatea [432]. Figurile 10.27 (TV, TP) și 10.28 (*A. niger* MIUG 34, *A. niger* MIUG 35) ilustrează ciclurile voltametrice secundare înregistrate la 100 mV/s.

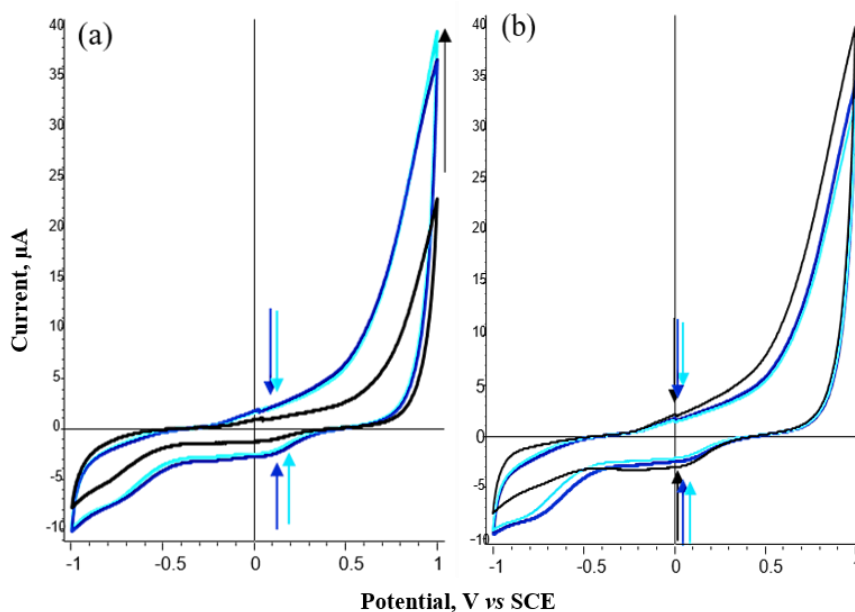


Figura 10.27. Voltamogramele ciclice ale oligomerizării Py în cultura celulară a: (a) TV, (b) TP în ziua 2 (-), 4 (-), 6 (-) și 8 (-); Săgețile laterale indică evoluția scanării; Viteza de scanare: 100 mV/s.

Tabelul 10.7. Parametrii electrochimici înregistrați pe parcursul oligomerizării Py în culturile de macromicete la viteza de scanare de 100 mV/s.

Scan speed: 100 mV/s		E_{pa} , V	I_{pa} , μA	E_{pc} , V	I_{pc} , μA	ΔE_p	I_{pa}/I_{pc}
Ppy-TV	2 nd d.	0.143	1.156	0.083	- 1.138	0.060	1.01
	4 th d.	0.099	2.173	0.086	- 2.367	0.013	0.91
	6 th d.	0.071	2.246	0.124	- 2.385	0.053	0.94
Ppy-TP	2 nd d.	0.024	2.051	0.076	- 2.785	0.052	0.73
	4 th d.	0.022	1.628	0.081	- 2.269	0.059	0.71
	6 th d.	0.021	1.441	0.086	- 1.928	0.065	0.74

Un singur transfer electronic reversibil a fost înregistrat pentru Ppy-TV în primele două zile de reacție. Mai târziu, reversibilitatea descrește iar transferul electronic este limitat. Ppy-TP evoluează către un transfer electronic cvasi-reversibil pe parcursul oligomerizării. Diagramele CV obținute în a 8-a zi de oligomerizare se suprapun cu cele înregistrate în a 6-a zi, ceea ce indică oprirea evoluției procesului sau atingerea stării de echilibru.

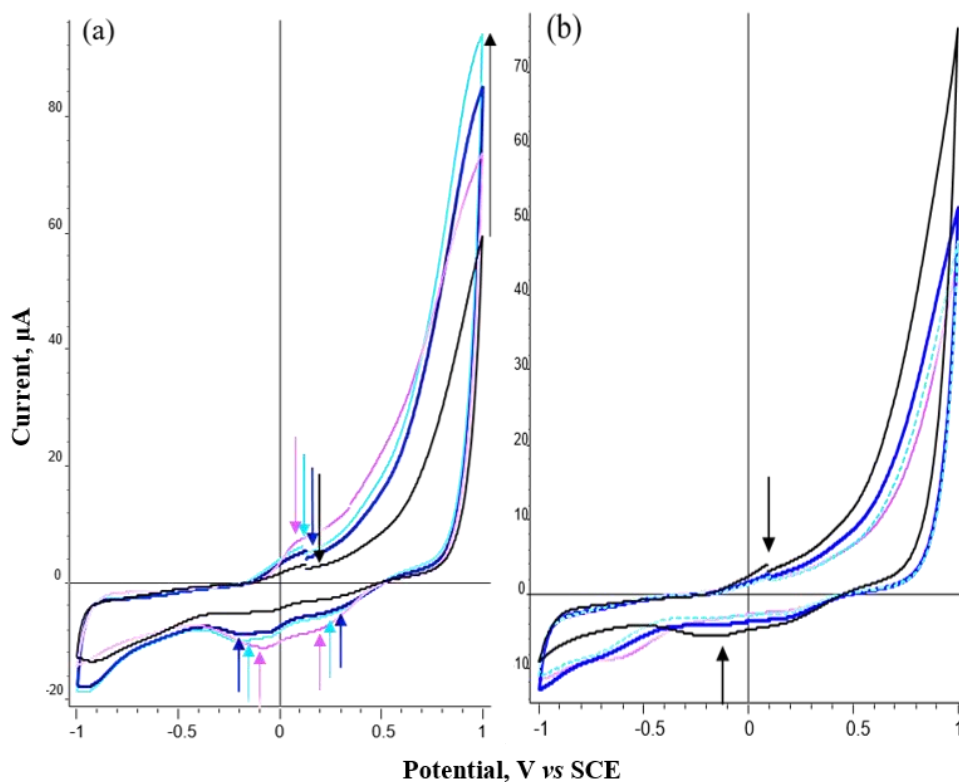


Figura 10.28. Voltamogramele ciclice ale oligomerizării Py în cultura celulară a: (a) *A. niger* MIUG 34, (b) *A. niger* MIUG 35 în ziua 2 (-), 4 (-), 6 (-) și 8 (-); Săgețile laterale indică evoluția scanării; Viteza de scanare: 100 mV/s.

Tabelul 10.8. Parametrii electrochimici înregistrați pe parcursul oligomerizării Py în culturile de micromicete la viteza de scanare de 100 mV/s.

Scan speed: 100 mV/s		E_{pa} , V	I_{pa} , μA	E_{pc} , V	I_{pc} , μA	ΔE_p	I_{pa}/I_{pc}
Ppy-MIUG 34	2 nd d.	0.124	3.058	- 0.026/0.280	-4.81/- 2.57	0.098/0.156	0.63/1.18
	4 th d.	0.117	5.332	- 0.060/0.270	-8.54/- 4.61	0.057/0.153	0.62/1.15
	6 th d.	0.110	5.981	- 0.080/0.260	- 9.71/- 5.88	0.030/0.150	0.61/1.01
	8 th d.	0.091	7.154	- 0.090/0.230	-11.08/- 6.91	0.001/0.139	0.64/1.03
Ppy-MIUG 35	2 nd d.	0.096	3.90	- 0.160/0.170	-5.75/- 4.16	0.064/0.074	0.67/0.93
	4 th d.	0.098	3.26	0.140	- 3.90	0.042	0.83
	6 th d.	0.105	2.69	0.120	- 3.79	0.012	0.70
	8 th d.	0.171	2.20	0.100	- 3.04	0.071	0.72

Ppy-MIUG 34 prezintă un peak anodic și două peak-uri catodice cu creștere în intensitatea curentului în timp. Un transfer electronic dublu este observat din peak-urile redox corespondente, iar peak-ul catodic secundar ireversibil indică expulzarea ionilor din structura Ppy. Activitatea electrochimică se menține pe parcursul celor opt zile de oligomerizare. Schimbul electronic înregistrat pentru Ppy-MIUG 35 este neglijabil și cvasi-reversibil cu descreștere a intensității curentului în timp.

În urma analizei electrochimice a procesului de oligomerizare a Py, concluziile sunt următoarele: (i) schimbul electronic observat pentru Ppy format în culturile de micromicete este moderat, ceea ce denotă eficiență oxidativă moderată a acestor culturi; (ii) comportament redox adecvat este observat pentru Ppy format în culturile de micromicete, mai ales pentru Ppy-MIUG 34, indicând performanță oxidativă superioară; (iii) oligomerizarea mai rapidă poate duce la pierdere în electroactivitate/ susceptibilitate la oxidare în timp pentru Ppy-TP and Ppy-MIUG 35, datorită lipsei de substanțe reactive în mediile de cultură; (iv) rata de oligomerizare mai scăzută rezultă în reactivitate continuă la oxidare electrochimică pentru Ppy-TV și Ppy- MIUG 34, probabil datorită resturilor de monomer și/sau oligomeri nepolimerizați.

10.3.2 Caracteristicile electrochimice ale polipirolului (Ppy) în soluție de tampon fosfat (PBS)

În urma analizelor comportamentului redox a Ppy în mediile de polimerizare, Ppy precipitat a fost colectat. Deși mediile culturale nu prezintă caracter electric, rezultatele anterioare au fost dependente de interacțiunea la interfața Ppy/cultură celulară. Deoarece capacitatea unui material este dependentă de conductanța și concentrația soluției electrolit [434, 435], caracterul redox al Ppy colectat a fost analizat în PBS. Ppy suspendat în PBS (pH=6.0, 0.1M, detalii experimentale în Secțiunea II, subsecțiunea 7.2) a fost analizat la 100 mV/s pentru a observa migrarea ionilor spre și dinspre structura polimerică și sustenabilitatea electrochimică.

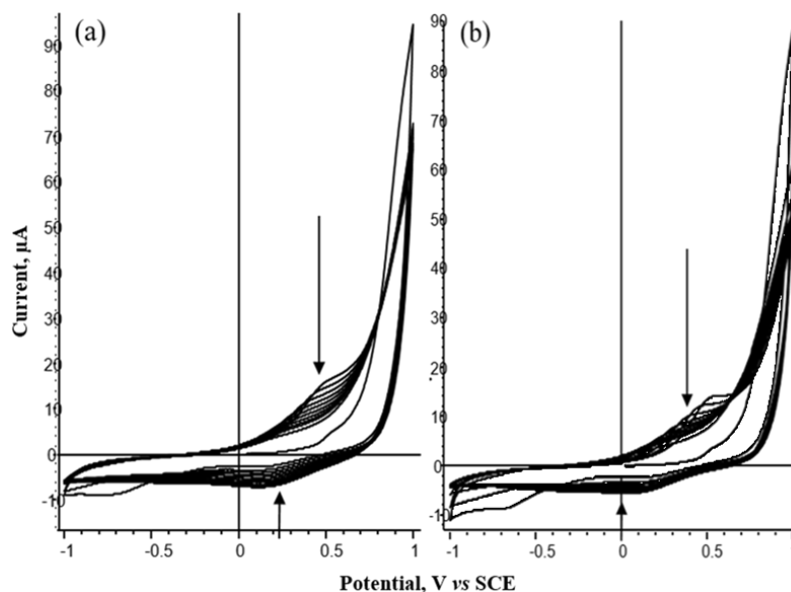


Figura 10.31. Caracterul redox al Ppy produs în: (a) *TV*; (b) *TP* după 8 zile și suspendat în PBS; Săgețile laterale indică evoluția scanării; Viteza de scanare: 100 mV/s.

Reacțiile redox descrise în Figura 10.31 ilustrează caracterul electroactiv adecvat al bioprodusilor Ppy-*TV* și Ppy-*TP*. Peak-urile de oxidoreducere sunt evidențiate pentru Ppy-*TV* mai ales cele cu caracter anodic, echivalente încorporării de ioni în structura Ppy.

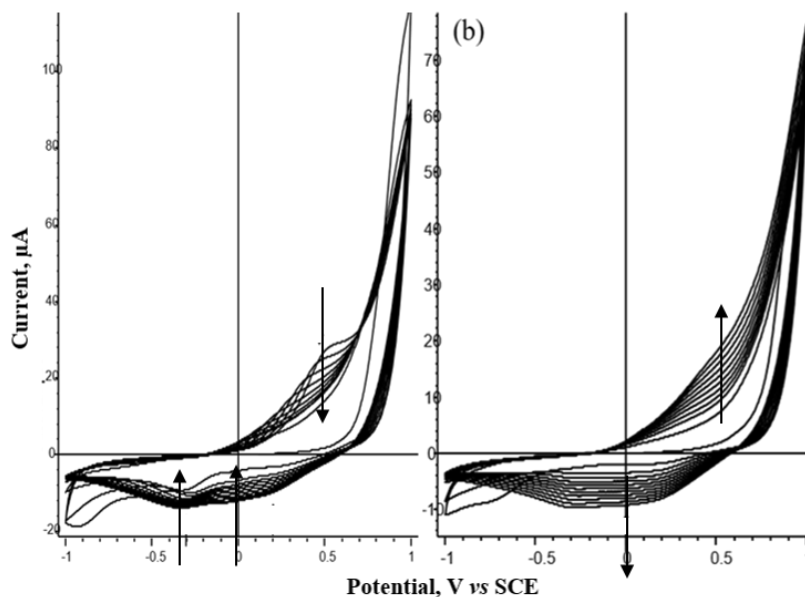


Figura 10.32. Caracterul redox al Ppy produs în: (a) *A. niger* MIUG 34; (b) *A. niger* MIUG 35 după 8 zile și suspendat în PBS; Săgețile laterale indică evoluția scanării; Viteza de scanare: 100 mV/s.

Ppy-MIUG 34 prezintă un peak anodic și două peak-uri catodice, similar cu analiza în cultură, indicând o expulzare treptată a ionilor din structura polimerică. Totuși, intensitatea schimbului electronic este diminuată în comparație cu analiza voltametrică în cultura celulară. Cea mai bună activitate redox a fost observată pentru Ppy-MIUG 35, confirmând predilecția acestui produs pentru expulzarea mai mult decât pentru inserția ionilor, aspect datorat stării sale oxidative ridicate. Astfel

se explică interacțiunea minimă a acestui produs cu mediul de cultură în cadrul analizelor anterioare, datorită lipsei de unități monomerică/oligomerică disponibile pentru oxidare electrochimică.

Relevanța acestei analize a caracterului redox al Ppy în soluție de tampon fosfat este legată de aplicabilitatea Ppy în dezvoltarea membranelor de purificare/schimbătoare de ioni, care necesită materiale capabile să extragă ioni din sânge sau fluide fiziologice [436, 437].

10.3.3 Caracteristicile electrochimice ale polipirolului (Ppy) în apă ultrapură

Caracterizarea comportamentului capacitiv al Ppy a fost efectuată prin colectarea polimerului și suspendarea în apă ultrapură. În acest mod, migrările anionice și/sau cationice pot fi excluse. Sustenabilitatea capacitivă a fost evaluată prin înregistrarea a 10 cicluri voltametrice consecutive la viteza de scanare de 100 mV/s (Figurile 10.33 (TV, TP) și 10.34 (*A. niger* MIUG 34, *A. niger* MIUG 35)).

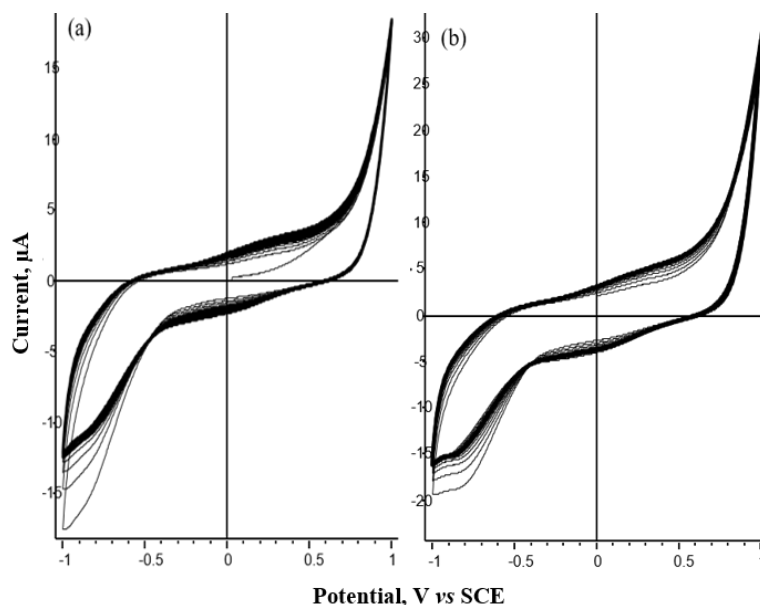


Figura 10.33. Caracterul redox al Ppy produs în: (a) TV; (b) TP după 8 zile și suspendat în apă ultrapură; Viteza de scanare: 100 mV/s.

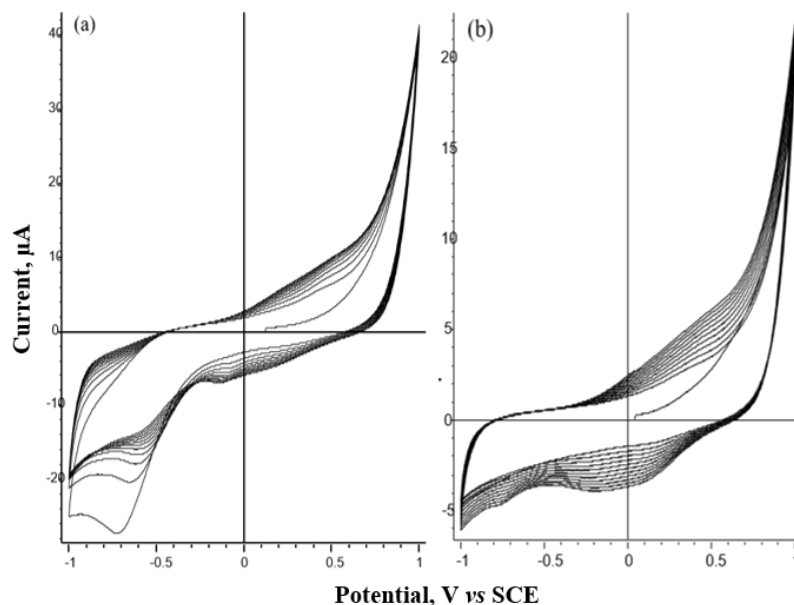


Figura 10.34. Caracterul redox al Ppy produs în: (a) *A. niger* MIUG 34; (b) *A. niger* MIUG 35 după 8 zile și suspendat în apă ultrapură; Viteza de scanare: 100 mV/s.

Comportamentul capacitiv al Ppy format este important în aplicații care necesită materiale compozite conductoare pentru condensatori electrochimici. Caracteristicile Ppy format în culturile de fungi sunt adecvate, luând în considerare forma rectangulară a ciclului voltametric și simetria curent-potențial recomandate de literatura de specialitate [173, 430, 438, 439].

10.3.5 Evoluția potențialului în circuit deschis (OCV) pe parcursul oligomerizării pirolului (Py) în culturile de fungi

Tehnica OCV a fost utilizată suplimentar tehnicii de CV datorită abilității sale de a indica starea oxidativă a Ppy format. Astfel, se poate observa susceptibilitatea redox în absența unui potențial continuu. Evoluția OCV în fiecare mediu de cultură este ilustrată în Figurile 10.36 (*TV*, *TP*) și 10.37 (*A.niger* MIUG 34, *A.niger* MIUG 35).

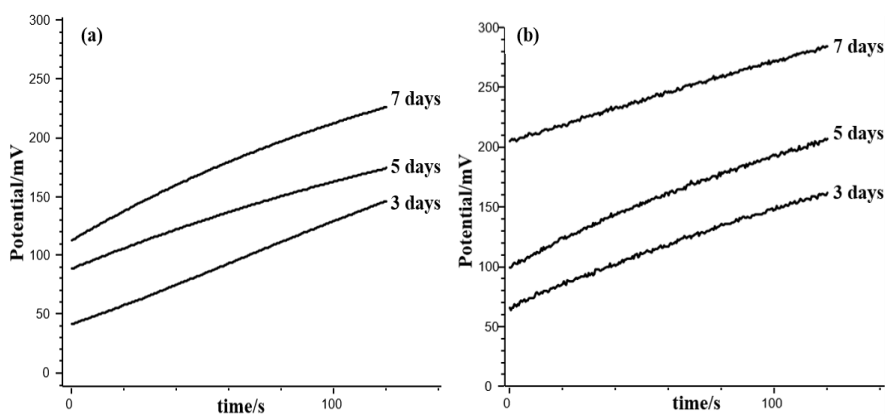


Figura 10.36. Evoluția potențialului în circuit deschis pe parcursul oligomerizării Py în culturile de macromicete: (a) *TV*; (b) *TP*.

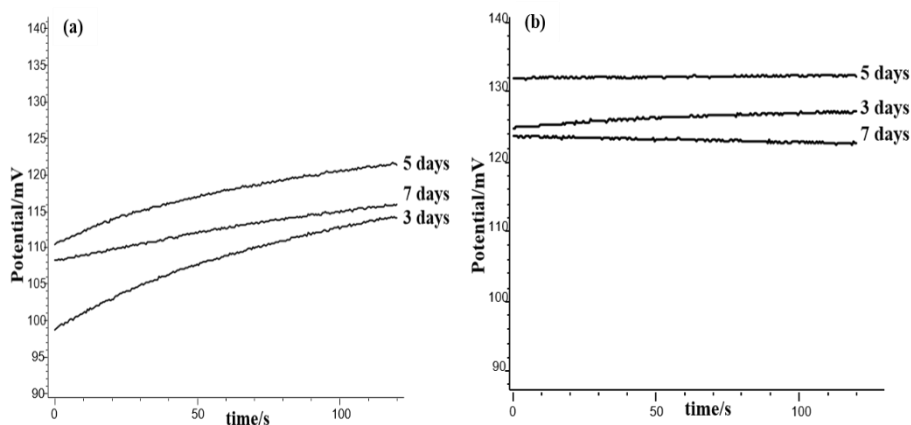
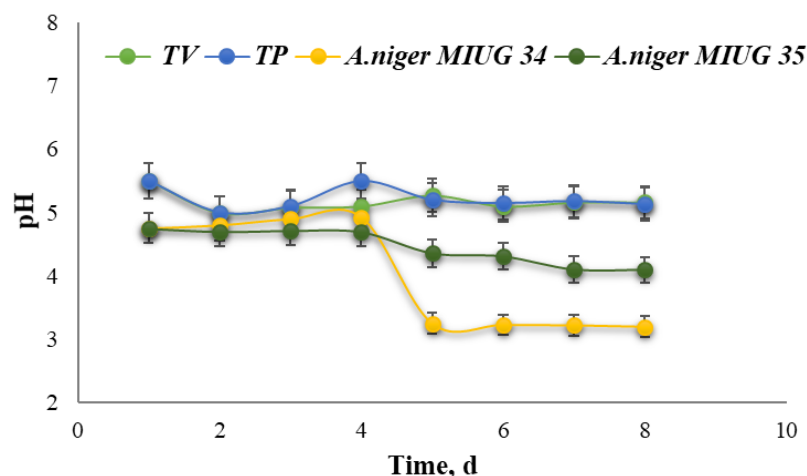


Figura 10.37. Evoluția potențialului în circuit deschis pe parcursul oligomerizării Py în culturile de micromicete: (a) *A. niger* MIUG 34; (b) *A. niger* MIUG 35.

Evoluția OCV pe parcursul oligomerizării Py în culturile de macromicete este ascendentă, indicând susceptibilitatea la oxidare. Valorile de OCV înregistrate în culturile de micromicete sunt în creștere moderată în cultura *A. niger* MIUG 34 și relativ stabile, chiar deșcedente în cultura *A. niger* MIUG 35. Produsul Ppy-MIUG 34 evoluează spre o stare de oxidare superioară în timp, iar Ppy-MIUG 35 nu prezintă susceptibilitate la oxidare (încorporare de ioni), ci dezvoltă o tendință spre reducere (expulzare de ioni).

10.3.6 Evoluția valorilor de pH pe parcursul oligomerizării pirolului (Py) în culturile de fungi

Monitorizarea pH-ului a permis observarea evoluției fiecărei culturi de fungi pe parcursul polimerizării Py (Figure 10.38).



Evoluția pH-ului în culturile de macromicete a început de la 5.5 și a rămas relativ stabilă înregistrând o ușoară scădere până la pH 5.1. pH-ul în culturile de micromicete a fost reglat la 5.0 înainte de inoculare și a descrescut constant pe parcursul oligomerizării Py datorită sintezei de H_2O_2 și acid gluconic prin cataliza glucozoxidazei.

Figura 10.38. Evoluția pH-ului pe parcursul oligomerizării Py în culturile de fungi.

Cele mai bune proprietăți electrice au fost identificate pentru Ppy format în culturile de micromicete comparativ cu Ppy format în culturile de macromicete ceea ce este dependent de pH-ul mediului de polimerizare. Sinteza chimică a Ppy cu H_2O_2 necesită valori de pH mai scăzute precum 2.0 [17] sau 3.1 [73]. Cataliza peroxidazică utilizează soluții tampon cu valori de pH de la 3.5 [92] la 4.0 [91] deoarece valori mai scăzute, precum pH = 2.0 [89] pot duce la inactivarea enzimei. Formarea de Ppy prin cataliză laccazică are loc la valori de pH mai ridicate de la 3.5 [119] la 4.0 [117] sau 5.0

[118]. Așadar, valorile de pH din acest studiu sunt în limitele acceptate care permit oligomerizarea Py fără a duce la inactivarea biocatalizatorilor.

Concluzii

Obiectivul acestui subcapitol a fost analiza amănunțită a parametrilor de oligomerizare a Py. În subcapitolul anterior, s-a realizat selecția celor mai performante tulpini și cercetarea a fost restrânsă la patru tulpini de fungi: *TV*, *TP*, *A. niger* MIUG 34 and *A. niger* MIUG 35. Astfel, s-a efectuat analiza fiecăreia din punct de vedere al biosintezei de proteine și enzime. Culturile de micromicete au demonstrat activitate fenoxidazică, atât intra- cât și extracelular, cu randament mai ridicat pentru tulpina *TP*. În acest context, enzima produsă prevalent a fost laccaza iar ruta bioconversiei de Py prin mecanismul catalitic al laccazei a fost descris. Producția de GOx a fost determinată în culturile de micromicete mai ales la nivel intracelular cu cel mai bun randament oferit de tulpina *A. niger* MIUG 35. Deoarece mecanismul catalitic al GOx este bazat pe generarea de H₂O₂ și formarea de Ppy utilizând GOx este disponibilă în literatura de specialitate, mecanismul de oxidare a Py a fost descris în consecință.

Monitorizarea și evaluarea procesului de oligomerizare a Py a fost realizată prin metode spectroelectrochimice. S-a observat că oligomerizarea are o evoluție similară în culturile de micromicete, performanță adecvată fiind obținută fie în prezența sau în absența biomasei. Acest aspect este legat de randamentul enzimatic similar atât intra- cât și extracelular. În cazul culturilor de micromicete, evoluția oligomerizării a fost superioară atât din punct de vedere al timpului de reacție cât și a caracteristicilor electrice a produșilor formați. Aceasta se datorează efectului oxidativ mai puternic al acestor culturi datorită generării de H₂O₂ prin cataliza GOx. Procesul a fost favorizat în prezența biomasei după cum s-a anticipat din randamentul enzimatic superior la nivel intracelular.

Investigațiile electrochimice precum CV, OCV și măsurătorile de pH au oferit informații asupra caracteristicilor redox ale Ppy. Reversibilitate redox și comportament capacitiv adecvate au fost observate pentru Ppy format în fiecare cultură, vizibil din voltamogramele ciclice efectuate în PBS și în apă ultrapură, iar cele mai performante caracteristici electrochimice au fost dovedite de produsul Ppy-MIUG 35.

În ansamblu, diferențele în eficacitatea culturilor de fungi în bioconversia Py sunt legate de o serie de factori, precum: (i) catalizatorul enzimatic; (ii) ruta de polimerizare; (iii) pH-ul optim. Procesul a fost validat și caracterizat prin tehnici spectroelectrochimice iar perspectivele de perfecționare ale procesului includ adăugarea de molecule tip șablon și/sau mediatori redox în mediul de polimerizare pentru a prepara un lanț polimeric ordonat și conductiv printr-o metodă biocatalitică, economică și prietenoasă cu mediul.

11. Aplicații bio-electrochimice pentru polipirolul (Ppy) format în culturile de fungi

Obiectivul acestui subcapitol reprezintă scopul final al acestui studiu, și anume testarea aplicabilității Ppy obținut prin biocataliză *in situ* în culturile de fungi. Având în vedere cercetarea extensivă dedicată aplicațiilor electrochimice microbiene [310, 313, 314, 440, 441] și beneficiile utilizării Ppy în construcția biosenzorilor [135, 267, 268, 329, 347, 442, 443] (studiu documentar în Secțiunea I, subsecțiunea 4), diferite sisteme de biosenzori amperometrici au fost realizate.

Polimerul format în culturile de micromicete (celule acoperite cu Ppy) a fost evaluat din perspectiva prezervării funcției și integrității biomasei fungice totodată cu abilitatea de a îmbunătăți caracteristicile analitice ale unui biosenzor microbial, astfel oferind microorganismelor producătoare de GOx scopuri multiple: (i) de a cataliza oligomerizarea Py, (ii) de a-și prezerva abilitățile catalitice pentru detecția de analiți.

În cazul microorganismelor producătoare de fenoloxidaze (PPOs) (tulpinile de macromicete), Ppy format în supernatantele culturilor a fost utilizat drept amestec extract PPO-Ppy. Aceasta a fost considerată o alternativă avantajoasă utilizării de enzimă pură în biosenzori, deoarece purificarea enzimatică nu este necesară iar producția de Ppy este catalizată *in situ* de către extractul enzimatic.

Rezultatele obținute reflectă: (i) abilitatea Ppy de a îmbunătăți detecția în dispozitive electrochimice; (ii) simplitatea conceptului propus; (iii) caracterul biocompatibil al Ppy biosintetizat (BioPpy).

11.1 Biosenzori microbieni pentru glucoză care utilizează polipirolul (Ppy) format în culturile de micromicete

11.1.1 Influența polipirolului (Ppy) format în cultura *Aspergillus niger* MIUG 35 în detecția de glucoză

Analize amperometrice și microscopia electrochimică (SCEM) au fost utilizate pentru observarea răspunsului electrochimic la glucoză de către biomasa de *A. niger* MIUG 35 simplă și modificată cu Ppy. În această configurație, s-a utilizat un sistem dublu de mediere implicând un mediator lipofilic (1,10-fenantrolin-5,6-dionă (PD) sau 9,10-fenantrenchinonă (PQ)), cu abilitatea de a îmbunătăți permeabilitatea membranei celulare și un mediator hidroflic (ferocianura de potasiu), responsabil cu intensificarea reacției catalitice în soluție (Figure 11.1).

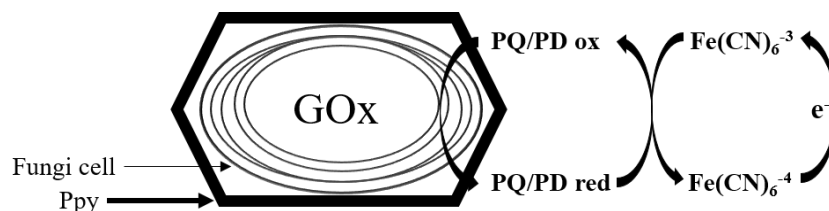


Figura 11.1. Conceptul de operare al biosenzorului pentru investigarea răspunsului amperometric la glucoză a biomasei de *A. niger* MIUG 35 simplă și modificată cu Ppy; Doi mediatori redox: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, PQ/PD (9,10-fenantrenchinonă/ 1,10-fenantrolin-5,6-dionă).

Aspectul culturii *A. niger* MIUG 35 observat înaintea adăugării de Py și după patru zile de formare a Ppy a fost înregistrat digital și este ilustrat în Figura 11.2.

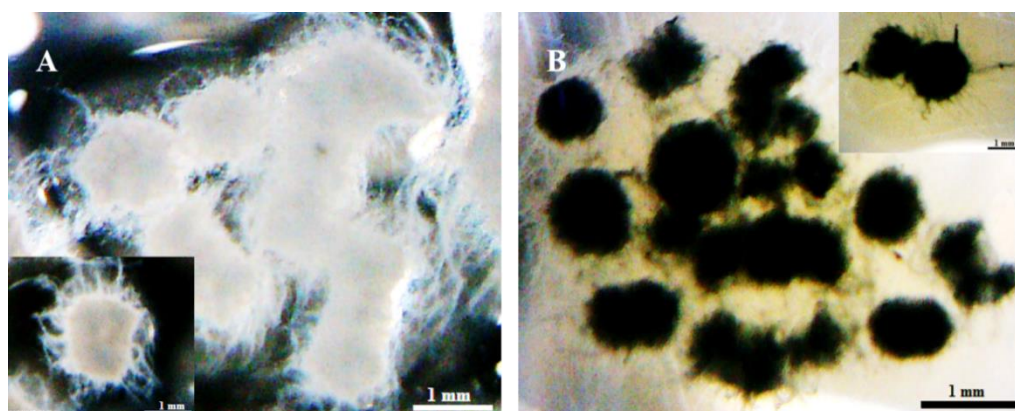


Figura 11.2. Aspectul culturii *A. niger* MIUG 35: a) înaintea adăugării de Py și b) după 4 zile de formare a Ppy.

Tehnica SCEM este bazată pe măsurători amperometrice cu un ultramicroelectrod (UME) la distanțe specifice față de probele microbiene. Reactivitatea electrochimică la suprafața probei a fost comparată pentru cele două tipuri de probe în prezența a 10 μm glucoză la diferite distanțe.

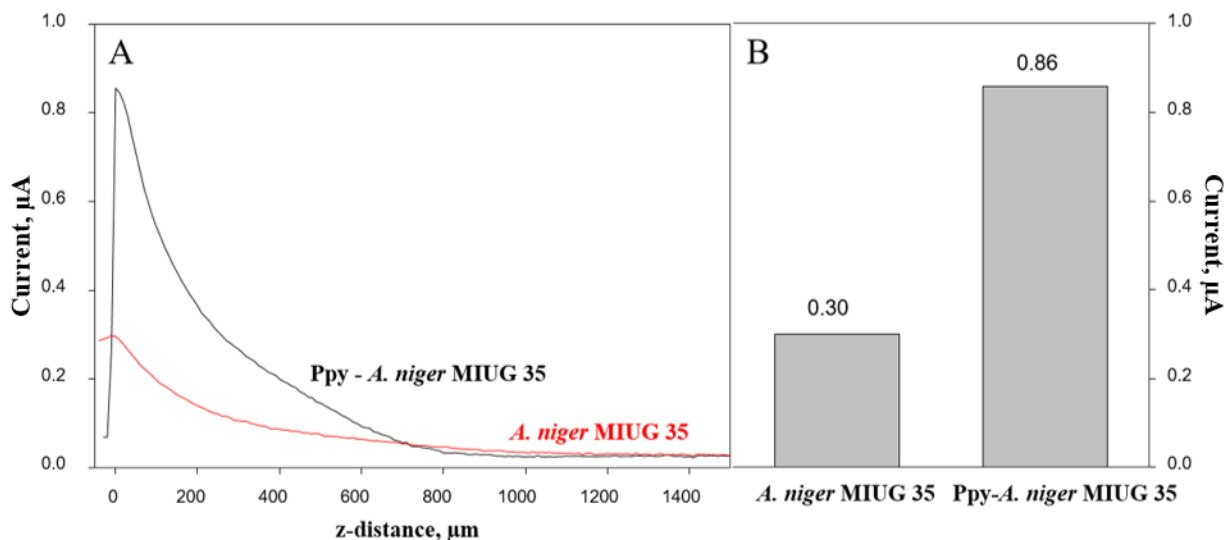


Figura 11.3. A. Curba de abordare la 0 μm distanță față de probele microbiene imobilizate înregistrată prin SECM metoda generare-colectare; B. Activitatea electrochimică a biomasei de *A. niger* MIUG 35 simplă și modificată Cu Ppy la 0 μm cu 10 μm glucoză; Potențialul operațional: 0.4 V vs Ag/AgCl, viteza de scanare de 10 μm/s.

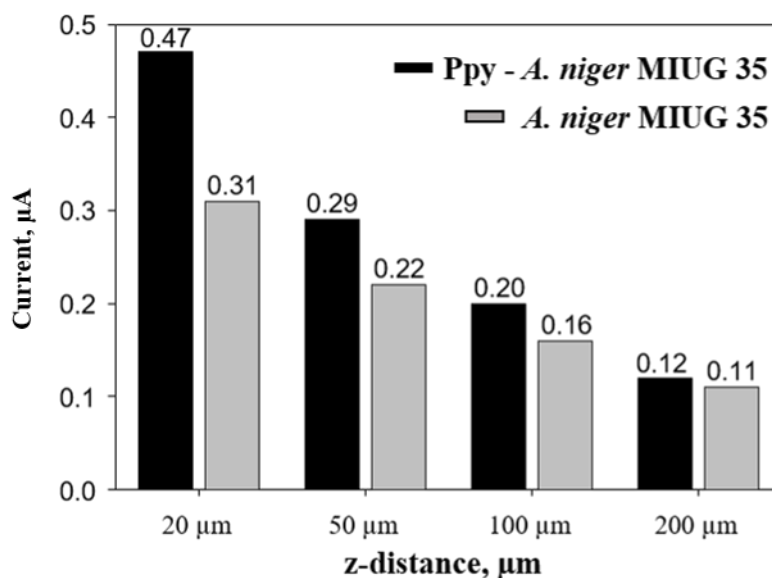


Figura 11.5. Diferențele de curent maxime înregistrate la diferite distanțe pe parcursul scanărilor orizontale SECM pentru biomasa de *A. niger* MIUG 35 simplă și modificată cu Ppy.

La distanța de 0 μm, valorile amperometrice înregistrate pentru probele microbiene cu Ppy au fost de trei ori mai mari decât pentru probele microbiene simple, la 20 μm, diferența a fost de 1.5 iar la 200 μm, valorile au fost similare. Aceasta se datorează gradientului de concentrație și difuziei sferice. Prin această tehnică, s-a constatat că biomasa fungică își păstrează activitatea metabolică în urma modificărilor cu Ppy produs *in situ*, și, mai mult decât atât, detecția analitică este facilitată de natura conductoare a Ppy. Pe această premisă, studiul electroanalitic a continuat prin construcția de biosenzori microbieni pentru detecția glucozei utilizând ambele tipuri de probe (simple și modificate cu Ppy).

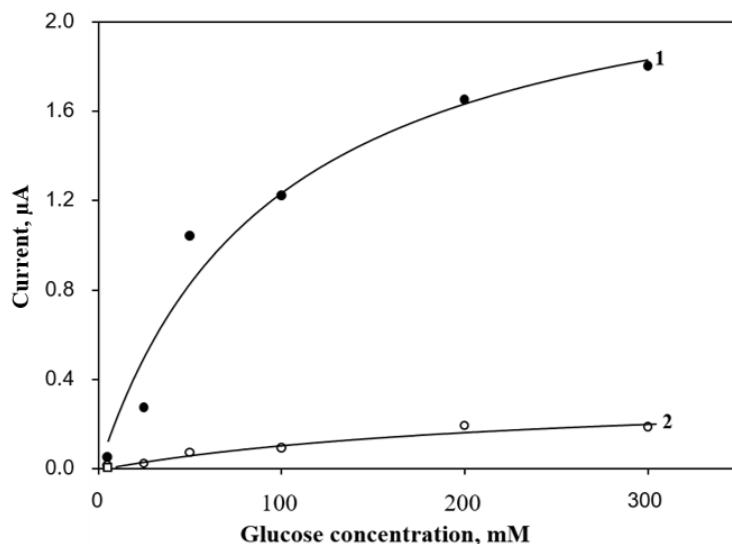


Figura 11.6. Răspunsul amperometric la glucoză al biosenzorilor microbieni bazați pe biomasă: simplă (○, curba 2) și acoperită cu Ppy (●, curba 1); PBS pH 6.0, 10 mM $K_3[Fe(CN)]_6$; 0.3 V vs Ag/AgCl/3 M KCl.

Analiza amperometrică a fost realizată într-un domeniu larg de concentrație pentru a obține o perspectivă de ansamblu asupra abilității de detecție a glucozei. Intensitate ridicată a curentului a fost observată pentru biosenzorul microbial cu Ppy, de șase ori mai mare decât cea obținută cu biosenzorul microbial simplu în domeniul de concentrație 0-300 mM glucoză.

Rezultatele obținute utilizând biomasă de *A. niger* MIUG 35 cu Ppy au fost adecvate și au inspirat continuarea investigațiilor electrochimice a celulelor modificate cu Ppy. S-a concluzionat că Ppy, prin natura sa conductoare, îmbunătățește comunicarea între biomolecule și traductor în biosenzori. În continuare, biomasă de *A. niger* MIUG 34 a fost testată.

11.1.2 Biosenzori microbieni pentru glucoză care utilizează polipirolul (Ppy) format în cultura *Aspergillus niger* MIUG 34

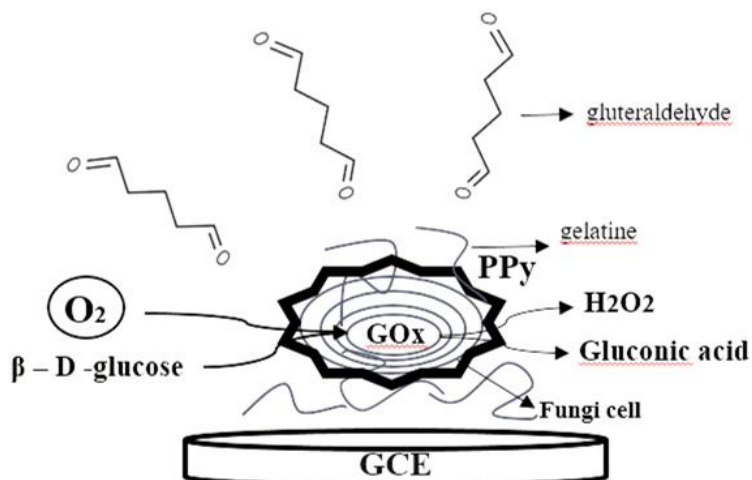


Figura 11.7. Conceptul de operare al biosenzorilor pentru glucoză cu biomasă de *A. niger* MIUG 34 simplă și modificată cu Ppy, imobilizată pe suprafața unui electrod de carbon vitros (GCE).

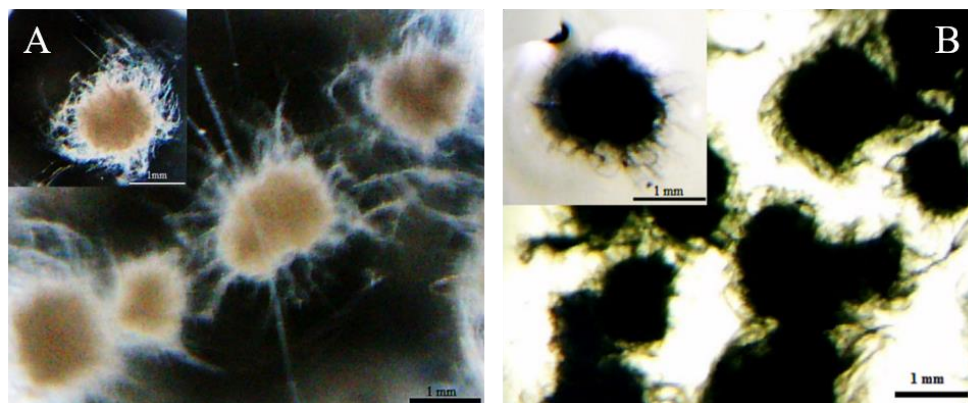
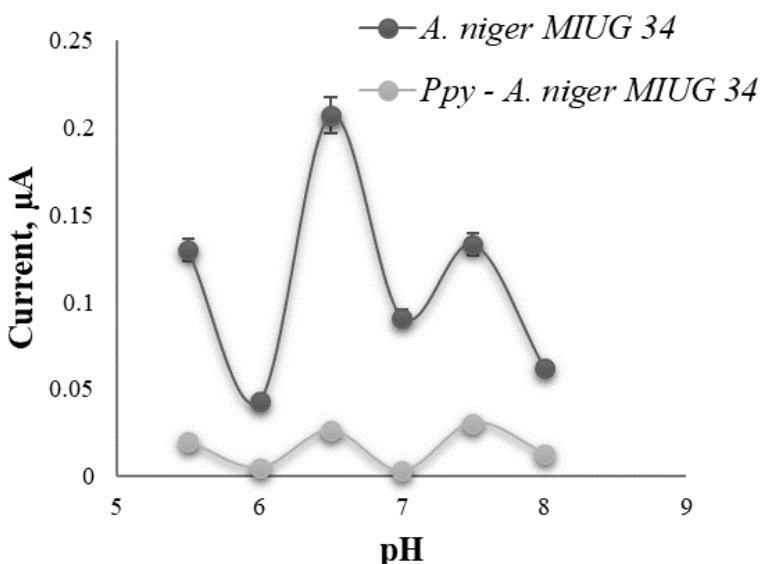


Figure 11.8. Aspectul culturii *A. niger* MIUG 34: a) înainte adăugării de Ppy și b) după 4 zile de formare a Ppy.

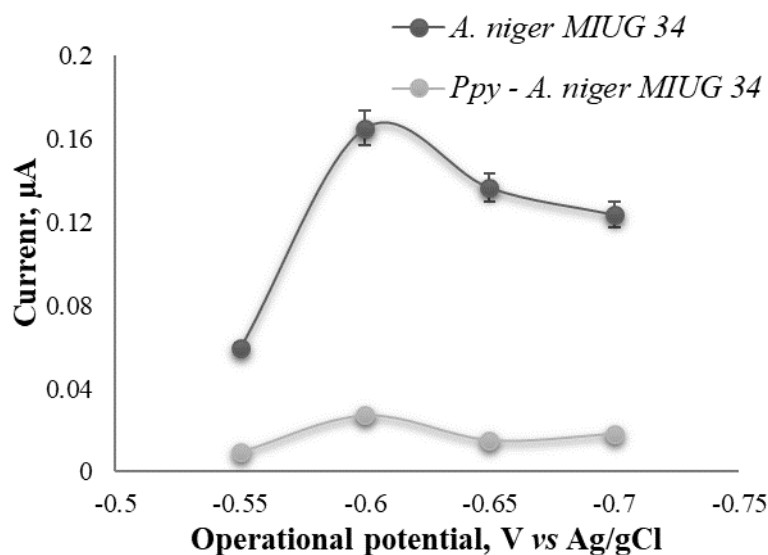
Efectul pH-ului asupra performanței biosenzorilor microbieni a fost examinat în domeniul 5.5 – 8.0 în PBS 0.1M iar pH-ul optim a fost 6.5 pentru biosenzorul microbial simplu și 7.5 pentru cel modificat cu Ppy (Figure 11.9).

Adițiile progresive de glucoză au început la concentrația de 0.01 mM. Fiecare adiție a dus la o creștere a curentului care după stabilizare s-a considerat a fi noua valoare de echilibru. În consecință, diferența dintre două valori de echilibru consecutive a fost calculată drept răspunsul biosenzorului la concentrația de glucoză adăugată. Evoluția valorilor amperometrice a fost reprezentată grafic în contrast cu evoluția concentrației de substrat, astfel s-a obținut curba de calibrare a biosenzorilor microbieni. Adiția glucozei a fost oprită atunci când curba de calibrare a început să devieze de la liniaritate, indicator al saturației enzimaticе.



Valorile optime de pH și de potențial operațional au fost similare comparativ între biosenzorul microbial simplu și cel modificat cu Ppy, ceea ce denotă că Ppy nu are un efect drastic asupra condițiilor reacției enzimaticе care este responsabilă cu detecția analitică.

Figura 11.9. Valoarea optimă de pH pentru detecția glucozei utilizând biosenzorii microbieni (simplu și modificat cu Ppy) bazați pe biomasa de *A.niger* MIUG 34; 0.1M PBS, V=-0.6 V vs Ag/AgCl; adiții de 0.5 mM glucoză.



Mai mult decât atât, valorile optime din aceste configurații sunt în acord cu valorile optime pentru biosenzori cu enzimă pură (GOx) [243, 444], ceea ce sugerează că acoperirea cu Ppy a biomasei nu a alterat profilul de pH al enzimei intracelulare.

Figura 11.10. Potențialul operațional optim pentru detecția glucozei utilizând biosenzorii microbieni (simplu și modificat cu Ppy) bazați pe biomasă de *A.niger* MIUG 34; 0.1 M PBS, pH = 6.5/7.5; aditii de 0.5 mM glucoză.

Curbele de calibrare ale celor două tipuri de biosenzori sunt ilustrate în Figurile 11.12 și 11.13. Răspunsul la glucoză a fost separat în două secțiuni: pe un domeniu de concentrație extins (a) și la concentrații minime (b), pentru a obține o comparație validă între cele două sisteme.

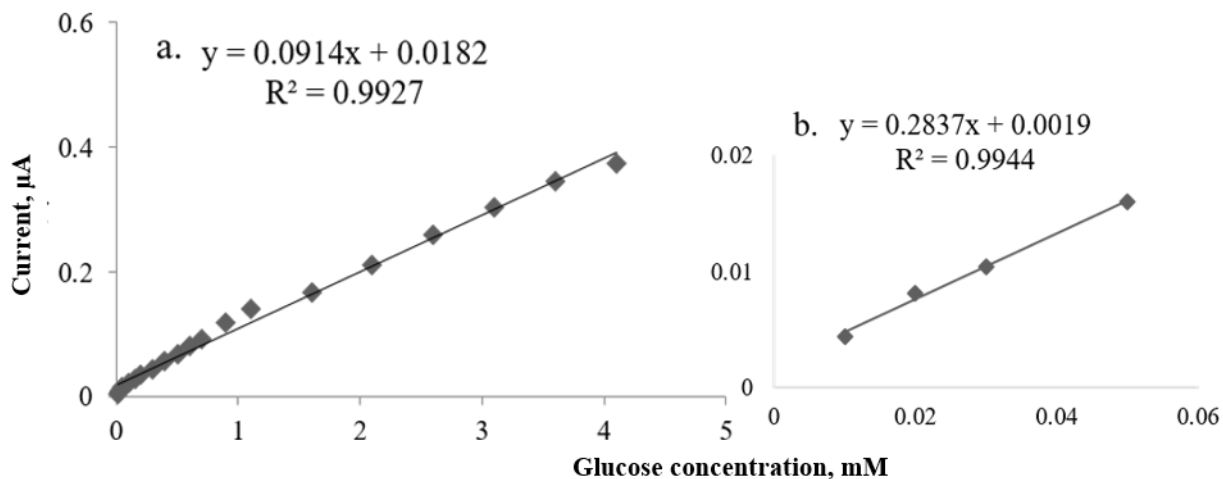


Figura 11.12. Curba de calibrare pentru glucoză obținută cu biosenzorul bazat pe biomasă de *A. niger* MIUG 34 la: a. un domeniu extins de concentrație (0.01 – 4.1 mM) și b. concentrații minime (0.01 – 0.05 mM).

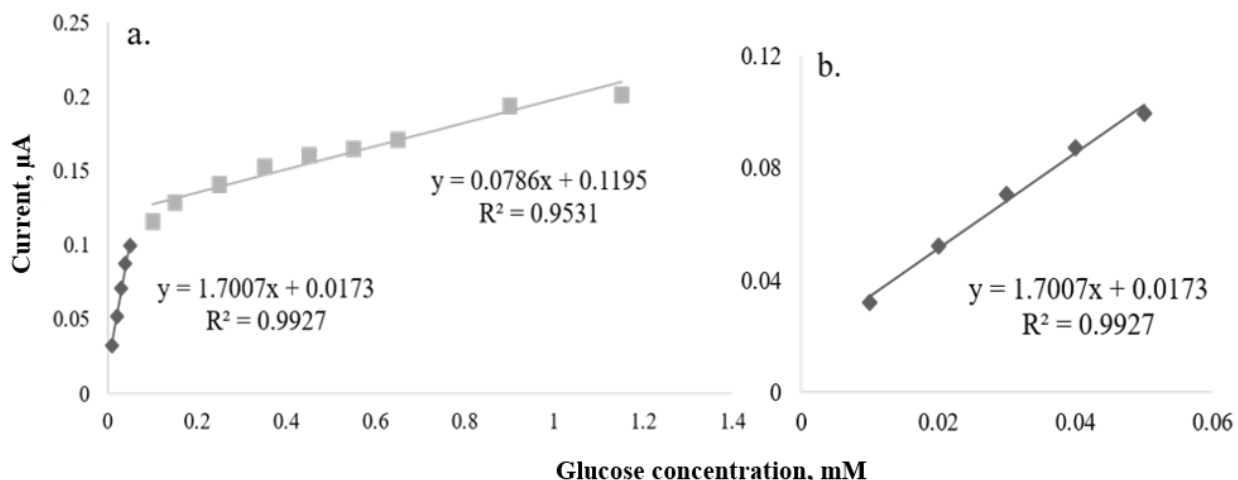


Figura 11.13. Curba de calibrare pentru glucoză obținută cu biosenzorul bazat pe biomasa de *A. niger* MIUG 34 modificată cu Ppy la: a. un domeniu extins de concentrație (0.01 – 1.15 mM) și b. concentrații minime (0.01 – 0.05 mM).

Biosenzorul microbial simplu a demonstrat liniaritate atât pe un domeniu extins de concentrație de glucoză (0.01-4.1 mM - Figura 11.12a) cât și la concentrații minime între 0.01 – 0.05 mM (Figure 11.12b), în timp ce liniaritatea biosenzorului modificat cu Ppy a fost limitată la concentrații minime (0.01 – 0.05 mM - Figura 11.13b). Totuși, sensibilitatea biosenzorului cu Ppy a fost de 13 ori mai mare decât cea a biosenzorului simplu, având în vedere domeniul extins de concentrație. Desigur că extensia domeniului de liniaritate spre concentrații ridicate de substrat duce la descreșterea sensibilității în cazul biosenzorului microbial simplu. Dar și atunci când același domeniu de liniaritate este comparat, biosenzorul modificat cu Ppy este de cinci ori mai performant (Figura 11.12b vs Figura 11.13b). Avantajele modificării cu Ppy sunt evidențiate la concentrații minime de analit, deoarece curba de calibrare deviază prompt de la liniaritate atunci când concentrația de glucoză depășește 0.05 mM. Acest aspect poate fi datorat reacției enzimice intensificate în prezența Ppy, ceea ce duce la o detecție foarte sensibilă însă și la saturație enzimatică mai rapidă.

Astfel, limita de detecție (LOD) determinată pentru biosenzorul microbial cu Ppy este superioară, de șapte ori mai mică decât LOD obținută cu biosenzorul microbial simplu prin compararea aceluiași domeniu linear (0.01 - 0.05 mM). Parametrii analitici derivați din curbele de calibrare sunt prezentați în Tabelul 11.2.

Tabelul 11.2. Caracteristicile analitice ale biosenzorilor microbieni.

Type	Linear range, mM	Sensitivity*, $\mu\text{A}/\text{mMcm}^{-1}$	LOD, mM	I_{max} , μA	K_m , mM
<i>A. niger</i> MIUG 34 biosensor	0.01 – 4.1	1.97 ± 0.45	0.114	0.068	0.148
	0.01 – 0.05	5.03 ± 1.05	0.036		
Ppy- <i>A. niger</i> MIUG 34 biosensor	0.01 - 0.05	27.25 ± 1.84	0.005	0.186	0.048

*Rezultatul analizelor în triplicat

Cercetarea dedicată biosenzorilor microbieni bazați pe fungi producători de GOx [445, 446] indică valori de sensibilitate similare cu cele obținute în acest studiu cu biosenzorul microbial simplu, care, în mod usual, sunt îmbunătățite prin utilizarea mediatorilor redox pentru intensificarea reacției

enzimatice. O altă alternativă de perfecționare este utilizarea polimerilor conductori (CPs). Literatura de specialitate raportează imobilizarea GOx în timpul electrosintezei Ppy, ceea ce extinde domeniul linear însă sensibilitatea rămâne moderată [254, 265, 447-449]. Acest lucru e atribuit pierderii și/sau denaturării enzimei în timpul electropolimerizării. Extinderea domeniului linear rezultă în scăderea sensibilității, însă energia necesară pentru cataliza enzimatică este mai mică atunci când Ppy este inclus [262]. Metode avansate de imobilizare au fost dezvoltate în scopul de a beneficia de proprietățile conductoare ale Ppy produs electrochimic fără pierderea activității enzimatice, ceea ce permite un domeniu linear extins totodată cu o sensibilitate adecvată [264, 266, 275].

Acest studiu permite dezvoltarea de Ppy conductiv pe suprafața celulelor producătoare de GOx datorită biocatalizei *in situ*, ceea ce oferă avantaje multiple: (i) îmbunătățirea permeabilității și conductivității membranei celulare; (ii) intensificarea comunicării între enzima intracelulară și traductor; (iii) probabilitate mai scăzută de pierdere/denaturare a enzimei. Ppy facilitează reacția enzimatică îmbunătățind sensibilitatea la concentrații minime de glucoză.

Aplicabilitatea biosenzorilor dezvoltați în acest studiu a fost evaluată prin detecția de glucoză în sucuri de fructe. S-au ales sucurile Cappy de vișine și Cappy mix de fructe drept probe reale. Concentrația de glucoză în aceste probe a fost determinată de laboratorul HPLC din cadrul Universității Akdeniz, Antalya și a fost luată drept valoare de referință. Măsurătorile au fost efectuate în triplicat iar conținutul de glucoză detectat de biosenzori s-a comparat cu valoarea de referință. Procentul de recuperare este prezentat în Tabelul 11.4.

Tabelul 11.4. Detecția glucozei în sucuri de fructe cu biosenzorii microbieni.

Fruit juice	Glucose concentration (g/dL)	Determined glucose concentration (g/dL) (n=3)		Recovery (%) (n=3)	
		Microbial biosensor	PPy - microbial biosensor	Microbial biosensor	PPy - microbial biosensor
Sour cherry	4.35	4.56 ± 0.33	4.24 ± 0.22	104.82	97.47
Mix fruit	3.23	3.27 ± 0.3	3.29 ± 0.14	101.23	101.85

Ratele de recuperare pentru sucul de vișine sunt mai mari decât pentru cel de mix de fructe, aspect datorat conținutului mai mare de compuși interferenți. Mai mult decât atât, procentul de recuperare puțin mai scăzut al biosenzorului modificat cu Ppy este rezultatul minimizării acestei interferențe. Rate de recuperare similare au fost raportate pentru biosenzori pentru glucoză bazați pe enzimă pură: GOx [451,452] sau piranoz-oxidază [453]. Deoarece biosenzorii microbieni au tendința de a avea o specificitate de detecție mai scăzută decât cei enzimatici, rezultatele obținute în acest studiu indică o performanță adecvată a biosenzorilor datorită modificării cu Ppy.

11.2 Biosenzori enzimatici pentru catechol care utilizează polipirolul (Ppy) format în supernatantul culturii *Trametes pubescens*

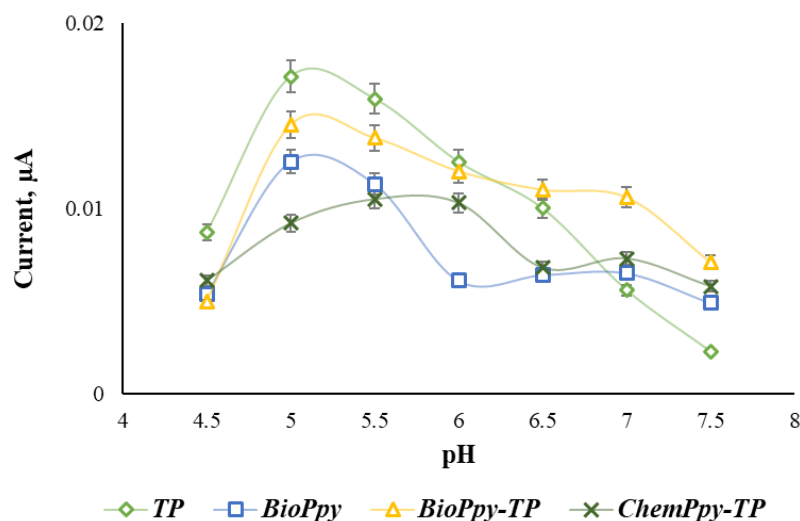
Încorporarea enzimei în matrici conductoare în timpul electrodepoziției poate avea ca rezultat pierderea și/sau denaturarea enzimei. Acest studiu introduce o alternativă. Deoarece formarea de Ppy a avut loc în culturile de macromicete (producătoare de PPOs) atât intra- cât și extracelular, Ppy format extracelular (în supernatant) reprezintă o alternativă ecologică adecvată pentru dezvoltarea de biosenzori enzimatici.

Supernatantul culturii *TP* a fost utilizat drept extract enzimatic crud pentru prepararea primului tip de biosenzor (*TP* biosenzor). După formarea de Ppy în supernatantul culturii *TP*, Ppy biosintetizat a fost utilizat pentru cel de-al doilea tip de biosenzor (BioPpy biosenzor). Pentru evaluarea conservării activității enzimaticе după formarea de Ppy în supernatantul culturii *TP*, un al treilea tip de biosenzor a fost dezvoltat, bazat pe Ppy biosintetizat, colectat anterior, amestecat (proporție 1:1) cu extract enzimatic *TP* (BioPpy-*TP* biosenzor) cu scopul de a observa dacă sensibilitatea sa este superioară biosenzorului bazat doar pe Ppy biosintetizat. În final, o alternativă chimică de sinteză a Ppy a fost aplicată (detaliată în Secțiunea II, subsecțiunea 5.3) rezultând în Ppy sintetizat chimic (ChemPpy). Acest ChemPpy a fost amestecat cu extract enzimatic *TP* (proporție 1:1), și astfel a fost dezvoltat al patrulea tip de biosenzor (ChemPpy-*TP*), care reprezintă un model comparativ pentru performanța electrochimică a Ppy biosintetizat în supernatantul culturii *TP* fie simplu fie în amestec cu extract enzimatic.



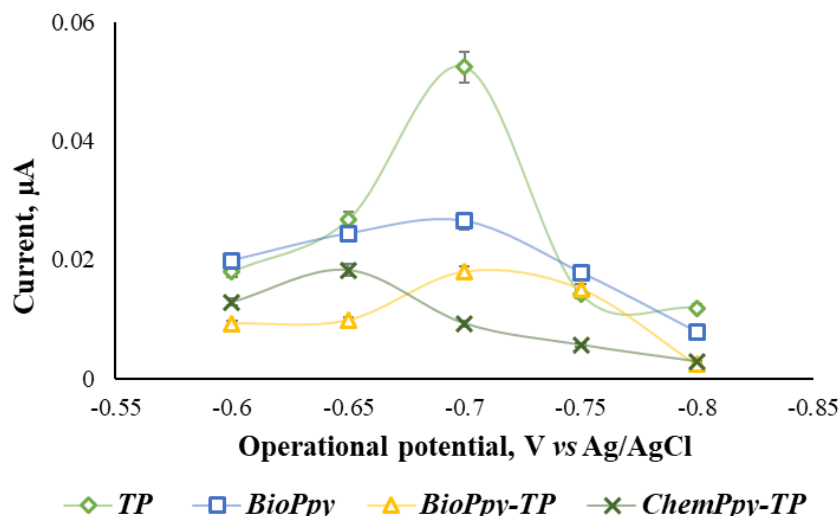
Figura 11.16. Conceptul de operare al biosenzorilor pentru catechol bazați pe extract enzimatic *TP* simplu sau modificat cu Ppy și immobilizat pe suprafața unui electrod de carbon vitros (GCE).

Pentru fiecare tip de biosenzor dezvoltat, s-au efectuat optimizările parametrilor operaționali: pH și potențial.



Valoarea optimă de pH pentru detecția catecholului a fost 5.0 pentru trei din cei patru biosenzori *TP*, BioPpy, BioPpy-*TP*). Cel de-al patrulea a avut răspuns optim la pH 5.5, probabil datorită unei ușoare modificări a parametrilor reacției enzimaticе sub efectul ChemPpy.

Figura 11.17. Valoarea optimă de pH pentru detecția catecholului cu biosenzorii bazați pe extract enzimatic *TP*; 0.1 M PBS, $V = -0.7/-0.65$ V vs Ag/AgCl; adiții de 0.1 mM catechol.



Acest aspect este confirmat și de optimizarea potențialului operațional, în cadrul căreia cele trei sisteme bazate pe extract enzimatic *TP* și *BioPpy* au avut răspuns optim la -0.7 V vs *Ag/AgCl* iar biosenzorul *ChemPpy-TP* a avut răspuns optim la -0.65 V vs *Ag/AgCl*.

Figura 11.18. Potențialul operațional optim pentru detecția catecholului cu biosenzorii bazați pe extract enzimatic *TP*; 0.1 M PBS, pH 5/5.5; adiții de 0.1 mM catechol.

Având în vedere valorile optime de pH pentru detecția catecholului utilizând biosenzorii bazați pe extract enzimatic *TP*, se pot concluziona următoarele: (i) valorile de pH în domeniul 5.0-5.5 sunt adecvate catalizei laccazice, astfel enzima biosintetizată prevalent este o laccază, după cum s-a anticipat din analiza fenoloxidazică a culturilor de macromicete (Secțiunea III, subsecțiunea 10.1.3); (ii) biosenzorii pentru catechol bazați pe laccază, raportați în literatura de specialitate, au demonstrat valori similare de pH operațional [454-456], astfel *BioPpy* nu a alterat condițiile reacției enzimatice; (iii) se poate observa un peak secundar în jurul valorii de pH = 7.0 care corespunde valorii optime de pH pentru cataliza tirozinazică (după cum s-a raportat în detecția catecholului bazată pe tirozinază [287, 445, 457]), din care se poate deduce că extractul enzimatic utilizat în acest studiu este un sistem multi-enzimatic care include atât laccază cât și tirozinază, desi predominanța laccazei poate fi confirmată.

Detecția catecholului a fost bazată pe consumul de oxigen pe parcursul bioconversiei de fenoli catalizată de PPOs. Răspunsul amperometric a fost examinat în condiții optime de pH și potențial după atingerea stării amperometrice de echilibru. Adițiile progressive de catechol au început la concentrația de 10 μM și fiecare adiție a dus la o creștere a curentului considerată proporțională cu concentrația de catechol adăugată. Astfel, curbele de calibrare (creșterea curentului vs concentrația de catechol) au fost determinate.

Curba de calibrare pentru biosenzorul *TP* este ilustrată în Figura 11.21 iar comparația între cele trei curbe de calibrare pentru biosenzorii modificați cu *Ppy* este dată în Figura 11.22.

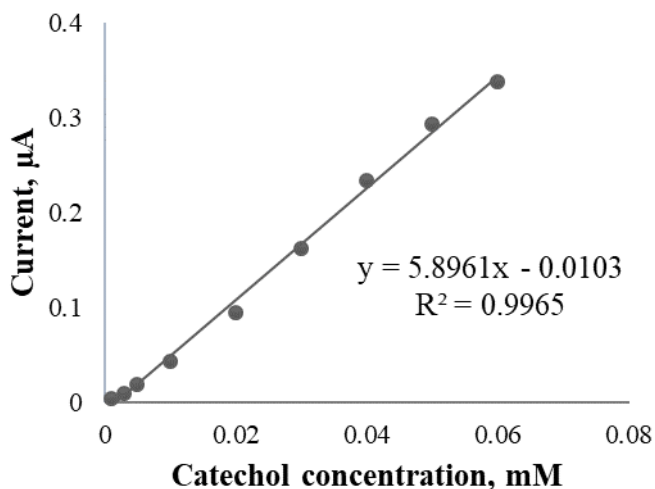


Figura 11.21. Curba de calibrare pentru catechol obținută cu biosenzorul *TP* (0.001-0.06 mM).

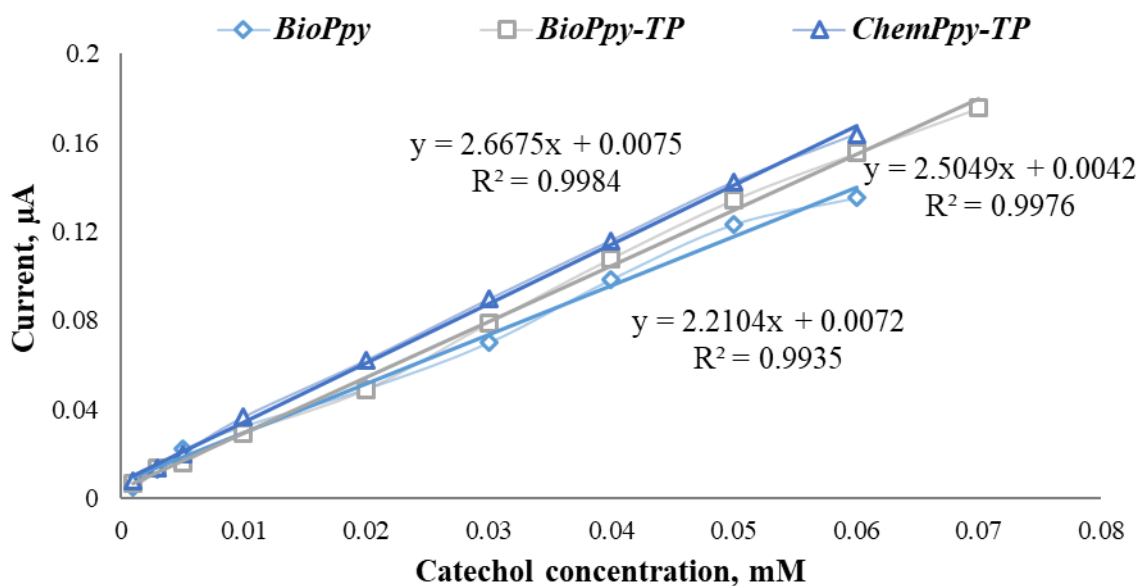


Figura 11.22. Curbele de calibrare pentru catechol obținute cu biosenzorul: BioPpy (0.001-0.06 mM); BioPpy-*TP* (0.001-0.07 mM); ChemPpy-*TP* (0.001-0.06 mM).

Liniaritatea în detecția cateholului a fost similară pentru toți biosenzorii dezvoltați. Totuși, sensibilitatea în detecție utilizând biosenzorul *TP* simplu a fost considerabil mai mare în comparație cu cei trei biosenzori modificați cu Ppy. Parametrii analitici ai biosenzorilor dezvoltați, derivați din curbele de calibrare, sunt prezentați în Tabelul 11.5.

Tabelul 11.5. Caracteristicile analitice ale biosenzorilor bazați pe extract enzimatic TP.

Type	Linear range, mM	Sensitivity*, $\mu\text{A}/\text{mMcm}^{-1}$	LOD, mM	I_{max} , μA	Km, mM
TP biosensor	0.001 – 0.06	83.39 \pm 1.96	0.0018	10.84	0.7
BioPpy biosensor	0.001 - 0.06	30.40 \pm 0.45	0.005	0.134	0.026
BioPpy-TP biosensor	0.001 – 0.07	34.61 \pm 1.28	0.0021	0.497	0.153
ChemPpy-TP biosensor	0.001- 0.06	37.45 \pm 0.48	0.0018	0.267	0.057

*Rezultatul analizelor în triplicat

Toți biosenzorii bazați pe extract enzimatic TP s-au dovedit eficienți în detecția sensibilă a catecholului. Toate domeniile liniare obținute au fost între 1-60/70 μM cu sensibilități între 83.39 $\mu\text{A}/\text{mMcm}^{-1}$ pentru biosenzorul TP simplu și 30.04 $\mu\text{A}/\text{mMcm}^{-1}$ pentru biosenzorul BioPpy. De asemenea, valori adecvate de LOD au fost obținute, în domeniul 1.8-5.0 μM . Cea mai mare valoare a constantei Km a fost 0.7 pentru biosenzorul TP simplu și este legată de valoarea mare a I_{max} , deoarece cele două sunt proporționale. Biosenzorii modificați cu Ppy demonstrează valori mai scăzute ale constantei Km, ceea ce demonstrează afinitatea crescută către analit dar și valoril mai scăzute de I_{max} . Este important de menționat că dezvoltarea unui biosenzor utilizând extract enzimatic crud este foarte eficientă și nu necesită etape adiționale de purificare enzimatică. Un alt aspect de luat în considerare este faptul că toți biosenzorii modificați cu Ppy au demonstrat caracteristici similare din care se poate concluziona: (i) similaritatea între biosenzorul BioPpy și BioPpy-TP demonstrează încorporarea enzimei în structura de Ppy produsă *in situ*, altfel biosenzorul BioPpy-TP ar fi avut o performanță superioară; (ii) procesul biocatalitic de obținere a Ppy este valid și comparabil cu o polimerizare chimică, deoarece ambii biosenzori BioPpy și ChemPpy au avut o performanță similară; (iii) Ppy are aceeași influență în sistemele de biosenzori indiferent de metoda de sinteză.

Toate cele patru tipuri de biosenzori au fost testate în detecția fenolică în probe reale, și anume vinuri de fructe (vin de mure, afine și rodie). Pentru obținerea unei valori de referință s-a utilizat metoda Folin-Ciocalteu drept metodă standard de determinare a conținutului fenolic în fiecare probă de vin (protocolul Folin-Ciocalteu este detaliat în Secțiunea II, subsecțiunea 8.3.3). Tabelul 11.7 ilustrează ratele de recuperare a fiecărui biosenzor pentru fiecare probă de vin.

Tabelul 11.7. Analiza conținutului fenolic în probe reale.

Wine sample	Recovery (%) (n=3)			
	TP biosensor	BioPpy biosensor	BioPpy- TP biosensor	ChemPpy- TP biosensor
Blackberry	98.66 \pm 0.46	97.20 \pm 0.55	101.28 \pm 0.25	101.71 \pm 0.30
Blueberry	101.97 \pm 0.87	112.34 \pm 0.93	109.4 \pm 0.33	102.85 \pm 0.49
Pomegranate	94.80 \pm 0.18	97.53 \pm 0.46	103.7 \pm 0.19	97.83 \pm 0.14

Roxana-Mihaela Apetrei - „ Studiul condițiilor biotehnologice de obținere a polipirolui, prin polimerizare *in situ*, cu microorganisme selecționate”

Ratele de recuperare sunt adecvate și similare pentru toate tipurile de biosenzori dezvoltati. Se observă că biosenzorul *TP* este cel mai eficient în detecția fenolilor în vinul de afine, care are cel mai scăzut conținut fenolic (aprox. 1299.18 mg/L) în timp ce biosenzorii BioPpy-*TP* și ChemPpy-*TP* sunt cei mai adecvați pentru detecția unui conținut mediu de fenoli, precum cel din proba de vin de mure (aprox. 2214.5 mg/L). Atunci când conținutul fenolic este ridicat, precum în proba de vin de rodie (aprox. 3110.2 mg/L), biosenzorii modificați cu Ppy sunt cei mai performanți, cu rată de recuperare puțin sub 100%. Aceste rezultate demonstrează că biosenzorul bazat pe extract enzimatic *TP* este foarte eficient în detecția de concentrații fenolice minime, iar biosenzorii modificați cu Ppy sunt mai potriviți pentru detecția unui conținut mediu de fenoli. Acest aspect este datorat sensibilității ridicate a extractului enzimatic la concentrații minime de substrat și a unei saturații enzimatică rapide atunci când concentrația de substrat crește.

În ansamblu, prepararea biosenzorilor bazați pe extract enzimatic din culturile de macromicete este o alternativă foarte bună pentru biosenzorii cu enzime pure (PPOs).

Concluzii

Dezvoltarea de biosenzori microbieni este bazată pe facilitatea de preparare și aspecte economice. În mod uzual, sensibilitatea și selectivitatea acestor tipuri de sisteme necesită îmbunătățiri. Modificarea cu polimeri conductori este avantajoasă deoarece performanța unui biosenzor este dependentă de contactul dintre elementul de bio-identificare și traductor și a fost raportată extensiv în literatura de specialitate. Avantajele acestui studiu sunt legate de biosinteza de Ppy în culturile de fungi, producătoare de GOx. Procesul constă într-o singură etapă biocatalitică care are ca rezultat acoperirea suprafeței celulelor cu Ppy, conferind abilitate pentru detecția glucozei.

O abordare secundară în analiza bio-electrochimică a Ppy biosintetizat a fost de a dezvolta biosenzori enzimatici cu extract enzimatic crud simplu și modificat cu Ppy. S-a considerat avantajos faptul că culturile de macromicete (*TV*, *TP*) au demonstrat abilitate de a produce Ppy fie în prezența sau absența biomasei datorită randamentului adecvat de PPOs atât intra- cât și extracelular. Astfel, s-au dezvoltat biosenzori foarte sensibili la detecția catecholului.

Studiile comparative raportate demonstrează avantajele producției de Ppy *in situ* în culturile de fungi, producătoare de oxidoreductaze. Desigur că biosenzorii dezvoltati în cadrul acestui studiu reprezintă doar concepte de bază cu rolul de model în stabilirea eficienței electrochimice a Ppy biosintetizat.

12. Concluzii generale, contribuții originale și perspective

Teza de doctorat intitulată „Studiul condițiilor biotehnologice de obținere a polipirolului, prin polimerizare *in situ*, cu microorganisme selecționate” a fost dedicată investigării producției de Ppy prin biocataliză efectuată de culturile de microorganisme *in vivo*. Datorită aspectelor inovative și a complexității cercetării, s-au luat în considerare câteva obiective majore, după cum urmează:

- (i) Selecția tulpinilor de microorganisme care au abilitatea de a induce bioproducția de Ppy în funcție de caracteristicilor lor biochimice;
- (ii) Analiza culturilor submerse care au demonstrate abilitatea de a iniția bioconversia Py din punct de vedere al biosintezei de proteine și enzime;
- (iii) Evaluarea procesului de oligomerizare a Py și caracterizarea Ppy format prin tehnici spectroelectrochimice;
- (iv) Investigarea potențialului bio-electrochimic al Ppy obținut prin analize amperometrice.

Concluziile generale vor fi prezentate în consecință:

- (i) Abilitatea de a induce oligomerizarea Py *in situ* în condiții de cultivare submersă a fost observată pentru unsprezece din douăzeci și cinci de tulpini de bacterii filamentoase (*Streptomyces* spp.), două din cinci tulpini de macromicete (*Trametes* spp.) și două din șase tulpini de micromicete (*Aspergillus niger*). Ppy a fost produs în formă coloidală sub formă de microparticule de Ppy, a căror dimensiune și frecvență este dependentă de cultura utilizată drept mediu de polimerizare.

Analiza spectroscopică în infraroșu a identificat compoziția particulelor de Ppy prin detecția legăturilor chimice. În afara benzilor de vibrație principale atribuite structurii de Ppy, benzile adiționale au indicat nivelul oxidativ scăzut al Ppy format precum și efectul grupării acetat asupra structurii polimerice datorită mediului apos de polimerizare.

Timpul cel mai eficient de oligomerizare precum și cele mai adecvate caracteristici ale Ppy format au fost obținute pentru Ppy produs în culturile de fungi (*Trametes versicolor*, *Trametes pubescens*, *A. niger* MIUG 34 și *A. niger* MIUG 35 strains), astfel studiul a fost axat pe aceste culturi.

- (ii) Randamentul cel mai ridicat de proteine a fost observat în culturile de macromicete (*Trametes versicolor*, *Trametes pubescens*) atât intra- cât și extracelular. Analizele de activitate enzimatică s-au axat pe biosinteza fenoxidazelor (PPOs) și a glucoxidazei (GOx) iar macromicetele s-au dovedit producătoare de PPOs în timp ce micromicetele (*A. niger* MIUG 34; *A. niger* MIUG 35) biosintetizează GOx. Randamentul de GOx a fost cel mai ridicat intracelular mai ales pentru tulpina *A. niger* MIUG 35.

- (iii) Evaluarea UV-Vis a oligomerizării Py a indicat o evoluție similară pentru *Trametes versicolor* and *Trametes pubescens*, cu o performanță adecvată fie în prezența sau în absența biomasei. Acesta este rezultatul randamentului enzimatic similar atât extra- cât și intracelular. Spectrele UV-Vis denotă formarea de lanțuri oligomerice de Py cu lungimi extensive însă cu încărcare electrică minimă. În culturile de micromicete, oligomerizarea a fost superioară din punct de vedere al caracteristicilor electrice ale produsului final, cu cea mai bună performanță în prezența biomasei. Două tendințe diferite au fost observate: oligomerizarea catalizată de *A. niger* MIUG 34 constă în formarea succesivă de forme oligomerice intermediare care ating lungimi extinse în timp iar procesul indus de *A. niger* MIUG 35 este axat pe formarea unui lanț conjugat singular care dezvoltă încărcare electrică. Din acest punct de vedere, produsul de bioconversie codat Ppy-MIUG 35 are cel mai bun potențial pentru aplicații bio-electrochimice. În scop comparativ, s-a realizat

sinteza chimică a Ppy cu H₂O₂ iar evoluția procesului a demonstrat similarități cu metoda biocatalitică propusă.

Investigațiile electrochimice (CV, OCV și pH) confirmă faptul că Ppy-MIUG 35 prezintă cele mai performante caracteristici electrochimice. Comportament redox alternant precum și caracter capacitiv adecvat au fost observate pentru Ppy format în fiecare cultură de fungi atunci când analizele au fost efectuate în PBS și în apă ultrapură. Evoluția OCV a confirmat starea de oxidare moderată a bioprodusilor codați Ppy-TV și Ppy-TP și starea de oxidare superioară a bioprodusilor codați Ppy-MIUG 34 și Ppy-MIUG 35. Evoluția valorilor de pH a fost deșcendentă în culturile de micromicete datorită producției de acid gluconic și H₂O₂, ceea ce a fost favorabil în bioconversia Py. pH-ul culturilor de macromicete a fost stabil în domeniul slab acid, însă mai ridicat decât este necesar pentru producția de Ppy.

(iv) Două tipuri principale de biosenzori au fost dezvoltate: biosenzori microbieni pentru glucoză cu biomasă de *A. niger* MIUG 34 sau *A. niger* MIUG 35, simplă și modificată cu Ppy și biosenzori enzimatici pentru catechol cu extract enzimatic crud din supernatantul culturii de *Trametes pubescens* simplu și modificat cu Ppy.

Biosenzorul Ppy - *A. niger* MIUG 35 a demonstrat sensibilitate ridicată într-un domeniu de concentrație de glucoză extins (0-300 mM) iar biosenzorul Ppy- *A. niger* MIUG 34 a demonstrat abilitatea de a detecta glucoza la concentrații minime. Domeniul liniar a fost limitat la 10-50 μM, însă sensibilitatea a devenit de șase ori mai mare, valoarea minimă de detecție LOD a atins 5.0 μM iar constanta Km a ajuns la o treime din valoarea inițială în urma modificării cu Ppy. În acest context, Ppy a avut rolul de a îmbunătăți permeabilitatea membranei celulare, intensificând contactul dintre biomoleculă și traductor într-un biosenzor. Detecția glucozei în sucuri de fructe a demonstrat rate de recuperare adecvate, chiar comparabile cu biosenzorii enzimatici.

Patru biosenzori utilizând supernatantul culturii de *Trametes pubescens* au fost dezvoltați bazați pe extract enzimatic crud fie simplu sau modificat cu Ppy produs chimic sau prin biocataliză. Domeniul liniar al biosenzorilor pentru catechol a fost limitat la 1-60/70 μM cu cea mai bună sensibilitate de 83.04 μA/mMcm⁻¹ pentru biosenzorul TP simplu. Biosenzorii modificați cu Ppy au avut sensibilitate scăzută dar valori adecvate de LOD și Km. Acest aspect a fost atribuit inhibării activității enzimatică după cum a fost raportat în literatura de specialitate în cazul biosintezei Ppy *in situ* cu enzime pure. Însă, Ppy sintetizat prin biocataliză a avut un randament comparabil cu cel sintetizat chimic, ceea ce demonstrează că conceptul propus este o alternativă validă. Analiza în probe reale de vin (de mure, affine și rodie) a avut rate de recuperare bune, comparabile cu biosenzorii bazați pe enzime pure.

În ansamblu, caracterul inovativ al studiului propus este dat de utilizarea culturilor celulare drept medii de polimerizare, ceea ce reprezintă o alternativă creativă utilizării de enzime pure, care necesită etape suplimentare de purificare enzimatică sau utilizării de microorganisme funcționalizate chimic. Având în vedere că sunt numeroase tipuri de microorganisme care produc enzimele care sunt utilizate în formă pură, studiul reprezintă o alternativă eficientă din punct de vedere economic și ecologic pentru biosinteza Ppy. În ceea ce privește procesul de oligomerizare, eficiența culturilor de fungi în bioconversia Py este dependentă de o serie de factori precum: (i) catalizatorul enzimatic biosintetizat de cultură; (ii) ruta de polimerizare derivată din mecanismul catalitic; (iii) pH-ul optim de creștere a microorganismelor. Procesul studiat este valid și comparabil cu datele din literatura de specialitate în domeniul bioproducției de Ppy. În ceea ce privește calitatea produsului final, aceasta este dependentă de puterea oxidativă a culturilor, care este scăzută, așa cum este cazul deseori în

Roxana-Mihaela Apetrei - „ Studiul condițiilor biotehnologice de obținere a polipirolui, prin polimerizare *in situ*, cu microorganisme selecționate”

metodele bio de sinteză a Ppy. Însă, adăugarea de molecule tip șablon și/sau mediatori redox în mediul de polimerizare poate ajuta în obținerea unui lanț polimeric ordonat și conductor, printr-o metodă biocatalitică. Potențialul său bio-aplicații a fost demonstrat prin dezvoltarea de biosenzori, ceea ce a reprezentat obiectivul final al acestei cercetări.

Acest tip de investigație nu a fost raportat până în prezent în literatura de specialitate, ceea ce evidențiază originalitatea și caracterul preliminar al studiului. În urma optimizării parametrilor procesului se pot obține rezultate superioare datorită diversității biochimice și a potențialului metabolic al microorganismelor. Complexitatea cercetării permite dezvoltarea unor perspective de studiu aprofundat. Spre exemplu, selecția microorganismelor capabile să inducă bioconversia Py poate fi extinsă iar biosinteza altor polimeri conductori, precum PANI poate fi analizată. În acest context, monitorizarea pH-ului pe parcursul cultivării este necesară deoarece sinteza de PANI necesită un mediu acid de polimerizare. Pentru aprofundarea analizei mecanismului de polimerizare, simulări de dinamică moleculară pot fi eficiente. În final, bio-aplicațiile rezultate pot fi diversificate de la biosenzori și celule de biocombustibil la membrane schimbătoare de ioni sau sisteme de livrare a medicamentelor. Polimerul poate fi obținut fie în prezența sau absența biomasei, astfel fie extract enzimatic crud sau biomasă modificată cu Ppy sunt disponibile pentru aplicații.

Diseminarea rezultatelor cercetării

Lista lucrărilor științifice publicate pe parcursul studiilor doctorale:

- **Web of Science**

1. **Roxana-Mihaela Apetrei**, Geta Carac, Gabriela Bahrim, Almira Ramanaviciene, Arunas Ramanavicius. ***Modification of Aspergillus niger by conducting polymer, Polypyrrole, and the evaluation of electrochemical properties of modified cells***, in: Bioelectrochemistry, Volume 121, 6 January 2018, Pages 46 –55 (Factor de Impact **3.346**) <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2018.01.001>
2. **R.-M. Apetrei**, G.-E Bahrim, G. Carac. ***Spectroelectrochemical characteristics of Polypyrrole synthesized by different methods***, in: Bulgarian Chemical Communications, Volume 49 Special Issue C (pp. 74 – 83) 2017 (Factor de Impact **0.238**) <http://www.bcc.bas.bg>
3. Arunas Stirke, **Roxana-Mihaela Apetrei**, Monika Kirsnyte, Lina Dedelaite, Vladimiras Bondarenka, Vitalija Jasulaitiene, Milda Pucetaite, Algis Selkis, Geta Carac, Gabriela Bahrim, Arunas Ramanavicius. ***Synthesis of polypyrrole microspheres by Streptomyces spp.***, in: Polymer, Volume 84, 10 February 2016, Pages 99-106 (Factor de Impact **3.684**) <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.12.029>

- **International Database**

1. **Roxana-Mihaela APETREI**, Geta CARAC, Gabriela-Elena BAHRIM. ***Bioproduction and relevance of conducting polymers: polypyrrole***, in: Innovative Romanian Food Biotechnology, Vol. 17, Issue of November, 2015 www.bioaliment.ugal.ro

Lista lucrărilor comunicate la manifestări științifice:

- **Internaționale**

1. **Roxana-Mihaela Apetrei**, Geta Cârâc, Gabriela Bahrima Pinar Camurlu. ***Catechol biosensor based on Trametes pubescens and polypyrrole***, 3rd World Congress on Material Science & Engineering, Spain, 2017
2. **Roxana-Mihaela Apetrei**, Geta Cârâc, Gabriela Bahrim, Pinar Camurlu. ***Glucose biosensor based on whole cells of Aspergillus niger MIUG 34 coated with polypyrrole***, EUROBIOTECH, Croatia, 2017
3. **Apetrei R.M.**, Gabriela Bahrim, Geta Carac. ***Testing of microorganism strains for biosynthesis of polypyrrole***, EUROBIOTECH, Latvia, 2016

- **Naționale**

1. **Roxana-Mihaela Apetrei**, Geta Cârâc, Gabriela Bahrima Pinar Camurlu. ***Microbial biosensor based on Aspergillus niger MIUG 34 for sensitive determination of glucose***, CSSD-UDJG, Galati, 2017

Roxana-Mihaela Apetrei - „ Studiul condițiilor biotehnologice de obținere a polipirolui, prin polimerizare *in situ*, cu microorganisme selecționate”

2. Roxana-Mihaela Apetrei, Geta Cârâc, Gabriela Bahrim, Arūnas Ramanavicius. ***Spectroelectrochemical characterization of pyrrole polymerization in situ with selected fungi strains***, International Conference of Physical Chemistry ROMPHYSICHEM, Galati, 2016
3. Roxana-Mihaela Apetrei, Geta Cârâc, Gabriela Bahrim. ***Screening of fungi strains for polypyrrole biosynthesis in situ***, CSSD-UDJG Galati, 2016
4. Apetrei R.M., Gabriela Bahrim, Geta Carac. ***An approach for obtaining polypyrrole microparticles using Streptomyces spp. strains***, CSSD-UDJG Galati, 2015