



ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREȘTI

060031 București, Splaiul Independenței nr. 296, C.P. 56-53, Tel. 021. 221.92.02, Fax 021. 221.90.71; e-mail: biologie@ibiol.ro

Se aprobă,

Director,

Dr. Dumitru T. Murariu

m.c. al Academiei Române

Raport științific și tehnic final în cadrul proiectului

**Biocatalizator cooperativ-dual pentru biorafinărie – oportunități și provocări pentru
conversia glicerolului rezidual la produși valoroși în industria polimerilor**

<http://www.ibiol.ro/proiecte/PNII/BioGlyCat/index.htm>

Parteneri implicați în proiect:

- Institutul de Biologie București al Academiei Române – coordonator
- Universitatea București – Facultatea de Chimie – partener 1
- S.C. Institutul de Cercetări Produse Auxiliare Organice S.A., Mediaș – partener 2

Sef Departament/Director proiect,

dr. Mădălin Enache

Activitatea consorțiului în cursul etapelor proiectului BioGlyCat s-a desfășurat în cadrul a patru etape, pe parcursul a 39 de luni cuprinzând 32 activități experimentale generice (16 cu implicarea și a CO, 17 cu implicarea și a P1, nouă cu implicarea și a P2) care au permis elaborarea și optimizarea funcționării unui sistem biocatalitic bazat pe biocatalizator dual, pentru convertirea glicerolului rezidual în glicerol carbonat (GliC) și glicidol (GliD). Rezultatele experimentale, cât și interpretarea acestora sunt detaliate în cele patru rapoarte aferente fiecărei etape a proiectului, disponibile pe pagina de internet a proiectului dar și diseminate prin lucrări, prezentări orale și prezentări sub formă de poster la diferite manifestări științifice din străinătate dar și din țară.

Obiectivele proiectului au fost îndeplinite integral iar diseminarea rezultatelor, a indicatorilor de realizare a proiectului și livrabilelor acestuia, obținute pe parcursul derulării lui, s-a realizat conform planului de realizare a proiectului prin elaborarea a opt articole științifice de specialitate publicate/acceptate în reviste ISI, șase publicate în reviste BDI, unul în alte tipuri de reviste și trei în volumul unor manifestări științifice. Membrii consorțiului au participat la conferințe științifice de specialitate unde au fost susținute 16 lucrări sub formă de prezentări orale și alte 16 lucrări sub formă de postere. Conferințele au fost organizate în Austria, Franța, Grecia, Germania, Italia, Olanda, Polonia, Republica Moldova, Rusia, Spania și România.

Etapa a I-a a proiectului, care s-a derulat în perioada iulie – decembrie 2014, a avut ca tematică biocatalizării – screening general. În cadrul acesteia s-a realizat screeningul tulpinilor de microorganisme din colecția Institutului de Biologie București al Academiei Române, producătoare de lipaze, esteraze, decarboxilaze precum și optimizarea condițiilor de biosinteză a acestora. De asemenea, a fost realizat un studiu privind interacția dintre microorganismele luate în studiu și glicerolul rezidual provenit din industria biodiesel. Tot în cadrul acestei etape a fost realizată pagina de internet a proiectului care a fost actualizată pe tot parcursul derulării acestuia prin grija coordonatorului. Ca și

rezultate ale acestei etape s-au obținut enzimele de interes, lipaza și decarboxilaza, s-a realizat pagina de internet a proiectului, a fost publicată o lucrare ISI în subiect comun cu al proiectului, au fost publicate două lucrări BDI în subiect comun cu al proiectului, o lucrare în volumul unei conferințe neindexate ISI și s-a participat la 4 conferințe științifice de specialitate.

Etapa a II-a a proiectului, care s-a derulat în perioada ianuarie – decembrie 2015, a avut ca tematică biocatalizatorii – sistemul biocatalitic. În cadrul acesteia s-a realizat purificarea enzimelor de interes (lipaza și decarboxilaza), caracterizarea acestora pe baza cineticii enzimatică și selectarea lor, s-a preparat biocatalizatorul cooperativ-dual, s-a construit și optimizat sistemul biocatalitic în flux. De asemenea, s-a obținut și testat în sistem glicerolul rezidual. Ca și rezultate ale acestei etape s-au obținut biocatalizatorul cooperativ-dual, sistemul biocatalitic în flux, s-a actualizat pagina de internet a proiectului, s-a elaborat o lucrare ISI în subiect comun cu al proiectului și s-a publicat o lucrare ISI și o lucrare în alte reviste, în subiect comun cu al proiectului. De asemenea, s-a participat la șapte conferințe științifice de specialitate.

Etapa a III-a a proiectului, care s-a derulat în perioada ianuarie – decembrie 2016, a avut ca tematică biocatalizatori – testarea în sistem – aplicația industrială – management, diseminare și exploatare rezultate – partea I. În cadrul acestei etape s-a continuat purificarea enzimelor de interes (lipaza și decarboxilaza), caracterizarea acestora pe baza cineticii enzimatică și selectarea acestora. Totodată a fost continuată și activitatea de preparare a catalizatorului cooperativ-dual precum și construcția și optimizarea sistemului biocatalitic a obținerii și testării glicerolului rezidual în sistemul biocatalitic. De asemenea, au fost organizate vizite de lucru și s-au pregătit materiale pentru publicare și diseminare (articole, prezentări orale, postere etc.). Ca și rezultate ale acestei etape s-a obținut un portofoliu de glicerol rezidual, o schemă de flux și bilanțul de materiale aferent, s-a proiectat și realizat o instalație pilot și s-a definitivat o tehnologie de sinteză pentru poliglicerol. În urma procesului biocatalitic au fost obținuți compușii de interes GlyC, GlyD și poligliceroli prin conversia biocatalitică a glicerolului rezidual. Au fost realizate raporturi ale meeting-urilor și raporturi științifice, au fost elaborate articole. De asemenea, s-au efectuat vizite de lucru și s-a actualizat pagina de internet a proiectului.

Pe de altă parte, au fost elaborate două lucrări ISI în subiect comun cu al proiectului, au fost publicate două lucrări ISI și patru lucrări BDI în subiect comun cu al proiectului, două lucrări în volumul unei conferințe (cu ISBN) și s-a participat la 10 conferințe științifice de specialitate cu patru prezentari orale și șase postere.

Etapa a IV-a a proiectului, care s-a derulat în perioada ianuarie – septembrie 2017, a avut ca tematică biocatalizatori – testarea în sistem – aplicația industrială – management, diseminare și exploatare rezultate – partea II. În cadrul acestei etape s-a finalizat purificarea enzimelor de interes (lipaza și decarboxilaza), caracterizarea acestora pe baza cineticii enzimatică și selectarea acestora. Totodată s-a finalizat activitatea de preparare a catalizatorului cooperativ-dual precum și construcția și optimizarea sistemului biocatalitic a obținerii și testării glicerolului rezidual în sistemul biocatalitic. Totodată a fost testată și instalația pilot proiectată și construită. De asemenea, au fost organizate vizite de lucru și s-au pregătit materiale pentru publicare și diseminare (articole, prezentări orale, postere etc.). Ca și rezultate ale acestei etape s-a finalizat purificarea enzimelor de interes, caracterizarea și selectarea acestora, s-a testat instalația pilot folosind sistemul biocatalitic studiat. De asemenea, s-a publicat o lucrare ISI, a fost acceptată o altă lucrare în revistă ISI, au fost susținute cinci prezentări orale la conferințe în Italia, Franța, Polonia, România și au fost prezentate patru postere la conferințe în Spania, Franța, Polonia.

Diseminarea rezultatelor (livrabilele/indicatorii de realizare a proiectului)

Lucrări ISI:

Simona Neagu, Silviu Preda, Crina Anastasescu, Maria Zaharescu, Mădălin Enache, Roxana Cojoc, 2014, *The functionalization of silica and titanate nanostructures with halotolerant proteases*, Rev. Roum. Chim., 59, 97-103.

Manole A., Banciu C., 2015, *Optimization of shoot multiplication in Ruscus aculeatus L. from long term cultures*. Rom. Biotechnol. Letters, 20: 10200-10204

Tudorache M., Gheorghe A., Negoii A., Enache M., Maria G.M., Pârvulescu V., 2016. *Bifunctional carbohydrate biopolymers entrapped lipase as catalyst for the two consecutive conversions of alpha-pinene to oxy-derivatives*. Carbohydrate Polymers, 152: 726-733

Mirela Enache, Ana Maria Toader, Madalin Enache, 2016, *Mitoxantrone-surfactant interactions; a physicochemical overview*, Molecules, 21, 1356.

M. Tudorache, A. Negoii, V.I. Parvulescu, *Enhancement of the valorization of renewable glycerol: The effects of the surfactant-enzyme interaction on the biocatalytic synthesis of glycerol carbonate*, Catalysis Today, 2017, 279, 71-76.

Simona Neagu, Roxana Cojoc, Madalina Tudorache, Ioana Gomoii, Madalin Enache, 2016, *The lipase activity from moderately halophilic and halotolerant microorganisms involved in bioconversion of waste glycerol from biodiesel industry*, Waste and Biomass Valorization, *acceptat*

Simona Neagu, Roxana Cojoc, Mirela Enache, Oana Catalina Mocioii, Aurica Precupas, Vlad Tudor Popa, Ioana Gomoii, Madalin Enache, 2017, *Biotransformation of Waste Glycerol from Biodiesel Industry in Carotenoids Compounds by Halophilic Microorganisms*, Waste and Biomass Valorization, *acceptat*

Mirela Enache, Ana Maria Toader, Victoria Neascu, Gabriela Ionita, Madalin Enache, 2017, *Spectroscopic investigation of the interaction of the anticancer drug mitoxantrone with sodium taurodeoxycholate (NaTDC) and sodium taurocholate (NaTC) bile salts*, Molecules, 22, 1079.

Lucrari BDI:

Mădălin Enache, Simona Neagu, Roxana Cojoc, 2014, *Extracellular hydrolases of halophilic microorganisms isolated from hypersaline environments (salt mine and salt lakes)*, Scientific Bulletin Series F "Biotechnologies", XVIII, 20 – 25.

Madalin Enache, Roxana Cojoc, Akinobu Echigo, Hiroaki Minegishi, Takashi Itoh, Masahiro Kamekura, 2014, *Taxonomy of a novel extremely halophilic archaeon belonging to the genus Haloarcula isolated from a low saline environment, Techirghiol Lake, Romania, Oltenia*. Studii și Comunicări. Stiințele Naturii, 30 (1), 192 – 197.

Neagu, S., Cojoc, R., Gomoiu, I., Enache, M., 2016. *The production of lipases and decarboxylases by halophilic bacteria able to grow in the presence of waste glycerol*, Oltenia. Studii și Comunicări. Științele Naturii, 32, 137 - 143

Neagu, S., Cojoc, R., Enache, M., *The effect of salinity and culture medium composition on the extracellular lipase activity of Marinococcus halophilus JCM 2472*, Proc. Rom. Acad, Series B, 19, 3.

Cristian Banciu, Anca Manole, Gabriel-Mihai Maria, 2016, *In vitro organogenesis of Amaranthus retroflexus L. with biotechnological applications in glycerol degradation*, Studia Universitatis Babeș – Bolyai, Biologia, LXI, 2, 55-62.

Cristian Banciu, Diana Cristian, 2015, *Cryoconservation of Pseudevernia furfuracea L. species and assessing the viability after thawing*, Oltenia. Studii și Comunicări. Științele Naturii, 31, 57 – 60.

Lucrari în alte reviste:

Simona Neagu, Roxana Cojoc, Madalin Enache, Ioana Gomoiu, George Ghemes, Andreea Gheorghe, Madalina Tudorache, 2015, *The growth of halophilic microorganisms in the presence of waste glycerol and its conversion in glycidol and glycerol carbonate*, Marisia – Studii și Materiale, Științele naturii, XXXV, 109 – 115.

Lucrări în volum:

Madalin Enache, 2014, *Influenta tariei ionice asupra amilazelor produse de catre microorganisme halofile archaeane izolate din lacuri saline si hipersaline din Romania*, Proceedings of the international conference “Genetics, Physiology and Plant Breeding”, V-th edition, 200 – 204.

Madalina Tudorache, 2016, *Procese biocatalitice in valorificarea biomasei – aportul enzimelor de tip lipaza si peroxidaza in producerea biomaterialelor*, In: M.Enache, R. Cojoc, S. Neagu, M. Constantin (eds.), A 56-a Sesiune anuală de Comunicări științifice – 85 de ani de

cercetări în domeniul Microbiologiei, Ed. Ars Docendi, pg. 38-40, ISBN 978-973-558-953-0

Madalin Enache, 2016, *Biocatalizator cooperativ-dual pentru biorafinare – oportunitati si provocari pentru convertirea glicerolului rezidual la produse valorosi in industria polimerilor (BIOGLYCAT)*, In: M.Enache, R. Cojoc, S. Neagu, M. Constantin (eds.), A 56-a Sesiune anuală de Comunicări științifice – 85 de ani de cercetări în domeniul Microbiologiei, Ed. Ars Docendi, pg. 72-75, ISBN 978-973-558-953-0

Prezentari orale conferinte:

Madălin Enache, Simona Neagu, Roxana Cojoc, *Extracellular hydrolases of halophilic microorganisms isolated from hypersaline environments (salt mine and salt lakes)*, June 5 – 7, **2014**, Bucharest, Romania, Agriculture for life, life for agriculture, USAMV Intl Conf.

Madalin Enache, Roxana Cojoc, Akinobu Echigo, Hiroaki Minegishi, Takashi Itoh, Masahiro Kamekura, *Taxonomy of a novel extremely halophilic archaeon belonging to the genus Haloarcula isolated from a low saline environment, Techirghiol Lake, Romania*, 11th to 13th of September **2014** – BIODIVEST 2014, 21th edition of The International Conference “The Museum and the Scientific Research” organized by The Department of Natural Sciences of The Museum of Oltenia Craiova, with the support of The County of Dolj Council, Romania

Gabriela Teodosiu, Simona Elena Neagu, Madalin Enache, *Microorganismele halofile – resurse de biocompusi cu aplicatii bionanotehnologice, “Valorificarea durabila a resurselor si mediul inconjurator”* Masa rotunda – Bucuresti – 16 octombrie **2014** – INCD-ICPMRR – CENTIREM

Madălin Enache, Roxana Cojoc, Simona Neagu, Ioana Gomoiu, George Ghemes, Andreea Gheorghe, Madalina Sandulescu, 2015, *Microorganismele halofile implicate in conversia glicerolului rezidual la produse utili*, conferinta internațională *Preocupări recente în cercetarea, conservarea și valorificarea patrimoniului cultural*, ediția a X-a, Muzeul Județean Mureș, 24-26 iunie 2015, Târgu-Mureș, Romania

Ancuța Trifoi, 2015, *Valorificarea glicerinei rezultate din industria biodieselului*, conferința “60 de ani de cercetare chimică la Mediaș, SC ICPAO SA Mediaș, 14 mai 2015

Mădălin Enache, 2015, *Proiectul BioGlyCat - cooperarea IBB - ICPAO SA Mediaș*, conferința "60 de ani de cercetare chimică la Mediaș, SC ICPAO SA Mediaș, 14 mai 2015

Enache, M., Neagu, S., Cojoc, R., *Halophilic Archaea from Romanian saline environments and their biotechnological potential*, 3rd International Conference on Microbial Biotechnology, Chișinău, Moldova, 12-13 oct. 2016 (plenary lecture)

Neagu, S., Cojoc, R., Gomoiu, I, Enache, M , *The production of lipases and decarboxylases by halophilic bacteria able to grow in the presence of waste glycerol*, The scientific international conference "The museum and scientific research" – the 23rd edition, Craiova, 8-10 septembrie 2016

Mirela Moldoveanu, Larisa Florescu, Simona Neagu, Ioana Lucaci, Roxana Cojoc, Ioan Ardelean și Mădălin Enache, *Date preliminare privind rețeaua trofică microbiană din lacul sărat Letea (Delta Dunării)*, A 56-a Sesiune Anuală de Comunicări Științifice a Institutului de Biologie București al Academiei Române, 9 decembrie, 2016, Academia Română, București

Madalina Tudorache *Procese biocatalitice in valorificarea biomasei – aportul enzimelor de tip lipaza si peroxidaza in producerea biomaterialelor*, A 56-a Sesiune Anuală de Comunicări Științifice a Institutului de Biologie București al Academiei Române, 9 decembrie, 2016, Academia Română, București

Madalin Enache, Roxana Cojoc, Simona Neagu si Ioana Gomoiu, *Halophilic microorganisms from mural paintings in old Romanian historical monument church*, 15th World Congress on Biotechnology and Biotech Industries Meet, Roma, Italia, 20 – 21 martie 2017.

Madalin Enache, Simona Neagu, Roxana Cojoc, Ioana Gomoiu, Delia Ionela Dobre, Ancuta Roxana Trifoi, *Extracellular Enzymes from Halophilic Bacteria with Potential in Agricultural Secondary Flow Recovery Products*, ICAFBS 2017: 19th International Conference on Agricultural, Food and Biological Sciences, Roma, Italia, 18 - 19 Septembrie, 2017.

M. Tudorache, A. Negoii, S. Neagu, I. Gomoiu, M. Enache, V.I. Parvulescu, *Enhancement on the biocatalytic synthesis of glycerol carbonate as green solvent of the future*, International Symposium in Green Chemistry, La Rochelle, Franta, mai 2017.

M. Tudorache, A. Negoii, V.I. Parvulescu, *Transformation of glycerol into glycerol carbonate/glycidol based on biocatalysis in non-conventional media*, 13th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries, Wroklaw, Polonia, iunie-mai 2017.

Mirela Moldoveanu, Roxana Cojoc, Simona Neagu, Larisa Florescu, Ioana Lucaci, Ioan Pacesila, Ioana Gomoiu, *Microorganismele prezente in instalatiile piezometrice ale barajului Dridu (raul Ialomita)*, Preocupari recente in cercetarea, conservarea si valorificarea patrimoniului cultural, editia XII, Targu Mures, Romania, 28 – 30 iunie 2017.

Postere conferințe:

Madalin Enache, *Influenta tarii ionice asupra amilazelor produse de catre microorganismele halofile archaeane izolate din lacuri saline si hipersaline din Romania*, The international conference “Genetics, Physiology and Plant Breeding”, V-th edition, Chisinau, Republic of Moldova, 23-24 October 2014

Simona Neagu, Andreea Gheorghe, Mădălina Săndulescu, Madalin Enache, 2015, *The potential of halophilic microorganisms to convert waste glycerol to valuable compounds: glycerol carbonate (GlyC) and glycidol (GlyD)*, 6th European Congress of Microbiologists, FEMS 2015 – Maastricht, Olanda, 7 – 11 iunie 2015

Madalina Tudorache*, George Ghemes, Andreea Gheorghe, Simona Neagu, Madalin Enache and Vasile Parvulescu, 2015, *Chemoenzymatic conversion of renewable glycerol to value-added products*, 12th Biotrans, Viena, Austria, 26 – 30 iulie 2015

M. Tudorache, G. Ghemes, A. Gheorghe, S. Coman, V.I. Parvulescu, 2015, *Biocatalysis in glycerol-based biorefinery for fine chemicals- Conversion of renewable glycerol into value-added products*, 12th European Congress on Catalysis - EuropaCat-XII, Kazan, Russian, 30 august - 4 septembrie 2015

Madalin Enache, Roxana Cojoc, Simona Neagu, Ioana Gomoiu, 2015, *Halophilic microorganisms – ability to growth on old paint church and to convert waste glycerol*, 9th

Balkan Congress of Microbiology, Microbiologia Balkanica 2015, Thessaloniki, Grecia, 22-24 octombrie 2015

Mădălin Enache, Simona Neagu, Roxana Cojoc, Ioana Gomoiu, Andreea Gheorghe, George Ghemes, Mădălina Săndulescu, 2015, *The enzymes of extremophilic halophiles involved in conversion of waste glycerol to valuable compounds: glycerol carbonate (GlyC) and glycidol (GlyD)*, BioMicroWorld2015 - VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, Barcelona, Spania, 28 – 30 octombrie 2015

Enache, M, Neagu, S., Cojoc, R., Gomoiu, I., Gheorghe, A., Ghemes, G., Săndulescu, M., Pârvulescu, V., *Biocatalytic conversion of waste glycerol to valuable compounds using halophilic microorganisms as the enzymes source*, Green & Sustainable Chemistry Conference, Berlin, Germany, 3 – 6 April 2016

Neagu, S., Cojoc, R., Gomoiu, I., Enache, M., *Bioconversion of waste glycerol to value added products by moderately halophilic microorganisms*, Modern Biotechnologies in Sustainable Development of the Danube Delta, Murighiol, Romania, 31 May – 2 June 2016.

S. Neagu, M. Olaru, V. Lazar, M. Enache, *The growth of halophilic microorganisms from Letea salt lake (inner Danube Delta) on media supplemented with waste glycerol* Modern Biotechnologies in Sustainable Development of the Danube Delta, Murighiol, Romania, 31 May – 2 June 2016.

Cristian Banciu, Anca Manole, Gabriel-Mihai Maria, *In vitro organogenesis of Amaranthus retroflexus L. with biotechnological applications in glycerol degradation*, Sesiune Jubiliara si Celebrativa – 40 de ani de culture de tesuturi si cellule vegetale in Romania, 19 martie 2016, Cluj Napoca

M. Tudorache, A. Negoii, C. Oprea, V.I. Parvulescu, Simona Neagu, Ioana Gomoiu, Madalin Enache, *Enhancements on the green synthesis of glycerol carbonate using cyclohexane as co-solvent*, Green Solvent Conference, Kiel, Germany, 16-19 October, 2016

M. Tudorache, A. Negoii, C. Oprea, S. Neagu. I. Gomoiu, M. enache, V. I. Parvulescu, *Enhacement on the biocatalytic synthesis of glycerol carbonate using cyclohexane as co-solvent*, NovoZyme, Groningen, Netherland, 11-14 October, 2016

Madalin Enache, Roxana Cojoc, Simona Neagu, Ioana Gomoiu, *Novel strain of *Garicola* genus isolated from frescoes of Hurezi Monastery, Romania*, 7th Congress of European Microbiologists, Valencia, Spania, 09 – 14 iulie 2017.

Ioana Gomoiu, Madalin Enache, Roxana Cojoc, Simona Neagu, Ioana Maria Cortea, Roxana Radvan, *Carotenoids producing bacteria: a cause of mural painting biodeterioration in some Romanian historical monasteries*, 7th Congress of European Microbiologists, Valencia, Spania, 09 – 14 iulie 2017.

M. Tudorache, A. Negoii, A. Gheorghe, M. Enache, G.-M. Maria, A. Viana, V.I. Parvulescu, *Green alternative for the valorization of the terpenoidic fraction of turpentine - biocatalytic conversion of α -pinene into value-added products*, International Symposium in Green Chemistry, La Rochelle, Franta, mai 2017.

M. Tudorache, A. Negoii, A. Gheorghe, M. Enache, G.-M. Maria, A. Viana, V.I. Parvulescu, *Valorization of α -pinene from turpentine - biocatalytic conversion of α -pinene into flavours and fragrances*, 13th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries, Wroklaw, Polonia, iunie-mai 2017.