

I 39.823

UNIVERSITATEA DUNĂREA DE JOS DIN GALAȚI
FACULTATEA DE ȘTIINȚA ȘI INGINERIA ALIMENTELOR

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT

OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA UNEI LIPAZE BACTERIENE
ACTIVE LA TEMPERATURI SCĂZUTE

Doctorand
Ing. Svetlana Laura LEONOV

Coordonator științific
Prof. dr. ing. Gabriela E. BAHRIM

Galăț
2011

7 39.823

ROMANIA
MINISTERUL EDUCAȚIEI, CERCETĂRII, TINERETULUI ȘI SPORTULUI
UNIVERSITATEA DUNĂREA DE JOS DIN GALAȚI

Strada Domnească nr. 47, cod poștal 800008
Galați, România
E-mail: rectorat@ugal.ro



Tel.: (+4) 0236-130.109; 0236-130.108; 336-130.104
Fax: (+4) 0236 - 461.353
www.ugal.ro

C7346/109-904

Către

Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați vă face cunoscut că în data de _____, ora _____, în _____, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată: "OBTINEREA ȘI CARACTERIZAREA UNEI LIPAZE BACTERIENE ACTIVE LA TEMPERATURI SCĂZUTE", elaborată de domnul/doamna ing. LEONOV SVETLANA-LAURA, în vederea conferirii titlului științific de doctor în Domeniul de doctorat - Inginerie industrială.

Comisia de doctorat are următoarea componență :

Președinte:

Prof.univ.dr.ing. Petru ALEXE
Decan - Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

Conducător de doctorat:

Prof.univ.dr.ing. Gabriela-Elena BAHRIU
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

Referent 1:

Cercetător senior dr. Carmen G. BOERIU
Food and Biobased Research Institute, Wageningen, Olanda

Referent 2:

Prof.univ.dr.ing. Francisc PETER
Universitatea POLITEHNICA Timișoara

Referent 3:

Prof.univ.dr.ing. Anca NICOLAU
Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați

Cu această ocazie vă transmitem rezumatul tezei de doctorat și vă invităm să participați la susținerea publică. În cazul în care doriți să faceți eventuale aprecieri sau observații asupra conținutului lucrării, vă rugăm să le transmiteți în scris pe adresa Universității, str. Domnească nr. 47, 800008 - Galați, Fax - 0236 / 461353.



SECRETAR DOCTORAT,

Ing. Luiza AXINTE

L. Axinte

CUPRINS

CUVÂNT ÎNAINTE

STUDIU DOCUMENTAR – Triacilglicerol acilhidrolazele de origine bacteriană; Lipazele active la temperaturi scăzute

1. Lipazele: enzime de interes economic	3
1.1 Noțiuni generale	1
1.2 Structura lipazelor și mecanismul de acțiune	6
1.3 Specificitatea lipazelor	12
2. Lipaze active la temperaturi scăzute	17
2.1 Particularități structurale ale lipazelor active la temperaturi scăzute	17
2.2 Surse de lipaze active la temperaturi scăzute	19
2.3 Condiții biotehnologice pentru obținerea lipazelor din surse microbiene ...	23
2.4 Strategii de purificare a lipazelor active la temperaturi scăzute	26
2.5 Strategii de îmbunătățire a proprietăților catalitice	29
3. Aplicații industriale ale lipazelor	35
3.1 Aplicații în medicină și industria farmaceutică	37
3.2 Sinteza grăsimilor structurate	38
3.3 Lipazele utilizate pentru obținerea produselor de uz casnic	39
3.4 Lipazele și protecția mediului	41
Referințe bibliografice	42

STUDIU EXPERIMENTAL

4. Izolarea și selecția producătorului de lipaze active la temperaturi scăzute	
4.1 Introducere	58
4.2 Materiale și metode	59
4.2.1 Izolarea producătorilor de lipaze	59
4.2.2 Determinarea vitezei de multiplicare	61

4.2.3	Identificarea tulpinilor de bacterii producătoare de enzime lipolitice	62
4.2.4	Obținerea extractului enzimatic brut intracelular	62
4.2.5	Determinarea activității lipolitice prin metoda titrimetrică	63
4.2.6	Determinarea activității enzimaticice prin metoda spectrofotometrică	64
4.2.7	Determinarea conținutului de proteine	65
4.2.8	Stabilizarea preparatului enzimatic lipolitic	66
4.3	Rezultate și discuții	67
4.3.1	Organismul producător: izolare, selecție, caracteristici	67
4.3.2	Determinarea creșterii celulare și determinarea activității lipolitice	72
4.3.3	Lipaza activă la temperaturi scăzute: dinamica de multiplicare și cuantificarea activității lipazelor	74
4.4	Concluzii parțiale.....	81
	Referințe bibliografice.....	82
5. Izolarea și purificarea lipazei sintetizată de tulpina selecționată		
<i>Pseudomonas fluorescens</i> MP11 (Pf-MP11)		
5.1	Introducere	86
5.2	Materiale și metode	88
5.2.1	Cromatografia de excludere moleculară	88
5.2.2	Electroforeza în gel de poliacril amidă	92
5.2.3	Evaluarea influenței pH-ului și a temperaturii asupra activității de hidroliză a lipazei Pf-MP11	93
5.2.4	Analiza influenței lungimii catenei de carbon asupra activității lipazice și cinetica reacțiilor de hidroliză a unor esteri ai <i>p</i> -nitrofenolului	94
5.3	Rezultate și discuții	96
5.3.1	Separarea lipazei prin cromatografie de excludere moleculară	96
5.3.2	Determinarea masei moleculare a enzimei LipPf-MP11	100
5.3.3	Evaluarea influenței pH-ului și a temperaturii asupra activității lipazei Pf-MP11	101
5.3.4	Evaluarea influenței lungimii catenei de carbon a acizilor grași asupra activității lipolitice și cinetica reacțiilor de hidroliză a unor esteri ai <i>p</i> -nitrofenolului	104
5.4	Concluzii parțiale.....	108

Referințe bibliografice	109
6. Comportamentul catalitic al lipazei în solvent organic	
6.1 Introducere	112
6.2 Materiale și metode	113
6.2.1 Efectul grupării alcoolice asupra activității lipazei Pf-MP11	113
6.2.2 Efectul lungimii catenei de carbon a acizilor grași asupra activității de esterificare a lipazei Pf-MP11	114
6.2.3 Specificitatea de poziție a lipazei Pf-MP11	115
6.3 Rezultate și discuții	115
6.3.1 Reacțiile de transesterificare a acetatului de vinil cu alcooli primari ...	115
6.3.2 Reacțiile de transesterificare a acetatului de vinil cu alcooli secundari	118
6.3.3 Influența lungimii catenei de carbon a acizilor grași asupra activității de esterificare a lipazei Pf-MP11	124
6.3.4 Regiospecificitatea lipazei Pf-MP11	126
6.4 Concluzii parțiale	127
Referințe bibliografice	128
7. Analiza genomică comparativă a genei <i>lip</i>Pf-MP11	
7.1 Introducere	132
7.2 Materiale și metode	133
7.2.1 Izolarea materialului genetic	133
7.2.2 Analiza filogenetică a lipazelor cunoscute și selecția primerilor	135
7.2.3 Amplificarea genei <i>lip</i> Pf-MP11 prin PCR clasic și <i>touchdown</i> PCR	136
7.2.4 Clonarea și secvențierea ampliconilor	138
7.2.5 Tehnica iPCR (reacția de polimerizare inversă)	141
7.2.6 Hibridizarea Southern	143
7.3 Rezultate și discuții	145
7.3.1 Amplificarea parțială a genei <i>lip</i> Pf-MP11	145
7.3.2 Determinarea secvenței lipazelor codificate în genomul tulpinii Pf-MP11 și analiza acestora	150

7.4 Concluzii parțiale	154
Referințe bibliografice	155
8. Concluzii finale	157
9. Contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu și perspective	160
10. Diseminarea rezultatelor cercetării	162

OBIECTIVELE ȘTIINȚIFICE ALE TEZEI DE DOCTORAT

Enzimele care hidrolizează lipidele și derivații acestora sunt denumite generic - lipaze.

Oamenii de știință au realizat performanța reproducerii proceselor naturale de sinteză și degradare *in vitro* cu scopul obținerii unor produse naturale, prin reacții specifice care decurg în condiții moderate de temperatură și pH, cu consum redus de energie și cu viteză sporită, protejând, în același timp, mediul înconjurător.

Datorită faptului că sunt capabile să catalizeze reacții pentru o gamă largă de compuși, lipazele au captat rapid atenția cercetătorilor și a marilor producători pentru utilizare în aplicații clasice și moderne, al căror număr este în creștere. Costurile scăzute, stabilitatea bună și activitatea ridicată sunt motivele pentru care lipazele active la temperaturi scăzute câștigă din ce în ce mai mult teren de 20 de ani încoace.

Din păcate, numărul lipazelor active la temperaturi scăzute și informațiile referitoare la caracteristicile acestora este prea mic pentru a reflecta potențialul extrem de mare al acestor remarcabili biocatalizatori.

Teza de doctorat *Obținerea și caracterizarea unei lipaze bacteriene active la temperaturi scăzute* aduce contribuții la dezvoltarea cunoașterii în domeniu prin obținerea și studiul unui preparat lipazic nou, ale cărui proprietăți sunt interesante atât în cercetarea fundamentală, dar are și numeroase valențe aplicative noi, legate în primul rând de costuri de producție și grad de bioconversie a substraturilor lipidice.

Studiile realizate pe parcursul stagiului doctoral au vizat următoarele obiective:

- ◆ Izolarea și selecția unei tulpini de bacterii psihrotrofe, activ producătoare de lipaze active la temperaturi scăzute.
- ◆ Obținerea și purificarea lipazei bacteriene.
- ◆ Caracterizarea lipazei bacteriene din punct de vedere al comportamentului catalitic și al proprietăților biochimice și corelarea acestora cu posibile aplicații industriale.
- ◆ Studiul genomic al tulpinii de bacterii producătoare de lipaze active la temperaturi scăzute, în vederea secvențierii genei codificatoare a lipazei studiate și aprecierea gradului de noutate a enzimei obținute.

Teza de doctorat a fost elaborată în perioada 2008 – 2011 în cadrul Universității Dunărea de Jos din Galați, Facultatea de Știința și Ingineria Alimentelor, Centrul integrat de cercetare și formare Platforma Bioaliment; Universitatea Wageningen, Olanda, Wageningen UR Food and Biobased Research; Universitatea Politehnica, Timișoara, Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului.

STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat are 163 pagini și este alcătuită din două părți: o parte de studiu documentar intitulat *Triacilglicerol acilhidrolazele de origine bacteriană; Lipazele active la temperaturi scăzute* și care conține trei capitole; și partea de studiu experimental desfășurată pe patru capitole. Lucrarea conține 45 figuri și grafice și 14 tabele.

I. STUDIU DOCUMENTAR

Studiul documentar este intitulat *Triacilglicerol acilhidrolazele de origine bacteriană; Lipazele active la temperaturi scăzute*. Această primă parte a tezei prezintă stadiul actual al cunoașterii în domeniul lipazelor, plasând accentul pe lipazele active la temperaturi scăzute. Studiul documentar structurat în trei capitole și prezintă, pornind de la prezentarea unor noțiuni generale asupra lipazelor, stuctura lipazelor, a adaptărilor la temperaturi scăzute ale hidrolazelor lipolitice sintetizate de microorganisme psihrotrofe și strategiilor de îmbunătățire a performanțelor acestor catalizatori concluzionând cu domeniile de utilizare și avantajele folosirii acestora în procesele industriale.

II. STUDIU EXPERIMENTAL

Studiul experimental cuprinde rezultatele investigațiilor realizate pe parcursul cercetării încadrate de programul doctoral. Această parte cuprinde patru capitole după cum urmează:

CAPITOLUL 4, *Izolarea și selecția producătorului de lipaze active la temperaturi scăzute*, prezintă strategia de izolare și selecție a tulpinilor de bacterii psihrotrofe, producătoare de lipaze active la temperaturi scăzute. Principalele strategii adoptate în această etapă de lucru au constat în selecția unui ecosistem caracterizat de temperaturi

scăzute în regim permanent, îmbogățirea culturilor psihrotrofe în laborator și izolarea producătorilor de lipaze prin utilizarea unor metode de selecție prin cultivare, în condiții selective, în plăci Petri pe mediu agarizat și în sistem submers. Tot în acest capitol este prezentat modul de identificare a tulpinilor selecționate, înalt producătoare de lipaze, în număr de trei, și influența condițiilor de cultivare în mediu lichid, în sistem discontinuu, asupra randamentului de sinteză a lipazelor.

CAPITOLUL 5, intitulat *Izolarea și purificarea lipazei Pf-MP11*, prezintă etapele de purificare a lipazei studiate. Preparatul parțial purificat a fost caracterizat din punct de vedere a stabilității și au fost determinate condițiile optime de activitate evidențiind importanța proprietăților identificate pentru diferite aplicații industriale.

CAPITOLUL 6, *Comportamentul catalitic al lipazei în solvent organic* descrie modul de determinare a selectivității lipazei față de diferite specii chimice ținând cont de caracteristici ale structurii acestora. Sunt prezentate metode de determinare a selectivității lipazei față de alcooli primari și secundari în reacții de transesterificare și efectul lungimii catenei de carbon a acizilor grași asupra activității de esterificare. Tot în acest capitol este prezentată specificitatea pozițională a enzimei în reacții asupra unui triacilglicerol.

CAPITOLUL 7, intitulat *Analiza genomică comparativă a genei lipPf-MP11* prezintă analiza genelor care codifică sinteza lipazelor în ADN-ul cromozomal al tulpinii selecționate studiate *Pseudomonas fluorescens* MP11. Analiza a inclus în primă fază și tulpina *Pseudomonas fluorescens* Pf-01, al cărei genom a fost complet secvențiat, și ulterior genele altor lipaze omoloage, toate extrase din baze de date genice. Este prezentat algoritmul de identificare și secvențiere a genelor *lipPf-MP11* și nivelul de noutate al acestora.

REZULTATE EXPERIMENTALE

4. Izolarea și selecția producătorului de lipaze active la temperaturi scăzute

Materiale și metode

Tulpinile de bacterii psihrotrofe au fost izolate din probe de sol prelevate din Munții Bucegi, mai exact Vârful Omu. Probele de sol au fost supuse îmbogățirii într-un mediu nutritiv, în regim submers timp de 15 zile. Culturile îmbogățite au fost folosite la

inocularea unui mediu agarizat suplimentat cu Tween 80, în plăci Petri. Coloniile de bacterii care s-au dezvoltat la 4 °C au fost supuse selecției calitative prin cultivarea pe mediu nutritiv agarizat suplimentat cu ulei de măsline și Rhodamina B. Formarea haloului de hidroliză, de culoare portocaliu fluorescent, din jurul coloniilor a servit drept criteriu de selecție a producătorilor de lipaze. Tulpinile de bacterii care au manifestat activitate lipolitică pronunțată au fost selecționate pentru evaluarea cantitativă a potențialului lipolitic.

Mediul steril a fost inoculat cu cultură starter și termostatat 72 h la 15 °C, la 100 rpm, în agitatoare orbitale cu termostat (LifeCare, China). Periodic, au fost prelevate probe de lichid cultural pentru a determina dinamica de multiplicare și activitatea lipazică extracelulară. Lichidul cultural fără biomasa celulară a fost considerat preparat lipolitic brut și a fost folosit pentru determinarea activității hidrolitice (enzime extracelulare).

Tulpinile supuse selecției calitative au fost analizate în vederea caracterizării taxonomice cu testele API 20NE (bioMérieux, Franța).

Măsurarea activității lipolitice s-a realizat prin metoda titrimetrică de dozare a acizilor grași eliberați în urma hidrolizei trigliceridelor din uleiul de măsline.

A fost de asemenea utilizată metoda spectrofotometrică, substratul folosit fiind esterul *p*-nitrofenil laurat (pNPL) conform metodei descrisă de Winkler și Stuckman (1979) cu unele modificări (Figura 4.1). După inițierea reacției, creșterea absorbției a fost urmărită continuu cu ajutorul sistemului de analiză TMSPC-8 al spectrofotometrului Shimadzu (Shimadzu Scientific Instruments, SUA), la o lungime de undă de 410 nm.

Activitatea proteolitică a fost determinată spectrofotometric prin metoda azocazeinei.

Conținutul de proteine din probele analizate a fost determinat prin metoda Bardford (Figura 4.2). Instrumentul de citire a absorbției probelor a fost un spectrofotometru pentru plăcuțe de microtitrare Safire (Tecan AG, Elveția).

Strategia de creștere a stabilității enzimei lipolitice a constat în separarea lipazei de factorul inhibitor. S-a realizat o precipitare cu sulfat de amoniu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck). Precipitarea proteinelor din preparatul enzimatic brut s-a realizat prin creșterea concentrației de sare cu 20 % (m/v), la 4 °C. Frațiunile proteice dializate au fost testate pentru activitate hidrolitică.

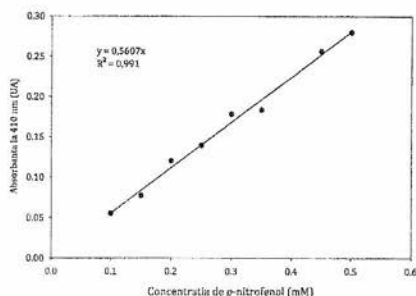


Figura 4.1 Curba etalon pentru *p*-nitrofenol determinată în intervalul de concentrație de 0,1 – 0,5 mM, la 20 °C, pH 7,2

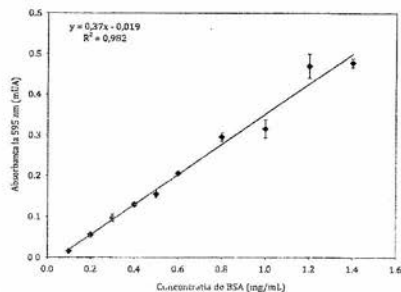


Figura 4.2 Curba etalon pentru determinarea conținutului de proteine prin metoda Bradford. Proteina standard folosită a fost albumina serică bovină în domeniul de concentrație de 0,1 – 1,4 mg/mL

Rezultate și discuții

Organismul producător: izolare, selecție, caracteristici

Vârful Omu este al unsprezecelea ca altitudine în România, cu înălțimea de 2505 m, clima caracteristică acestei zone fiind una de tip alpin. Temperatura medie anuală pe Vârful Omu se situează în intervalul 0 - 2 °C, iar maxima anuală nu depășește de obicei 20 °C.

Etapele de izolare și selecție s-au finalizat cu obținerea a 36 tulpini de bacterii cu activitate lipolitică. Utilizarea Rhodaminei B a permis identificarea a trei tulpini cu activitate lipazică pronunțată codificate M61, MP11 și MP3. Tulpinile selecționate au prezentat morfologia celulară specifică bacililor Gram-negativi, strict aerobi, cu dimensiunile celulelor de aproximativ 1,5 – 2,5 μm (Figura 4.3).

S-a remarcat în timpul cultivării producerea unui pigment galben-verzui de către cele trei tulpini selecționate, fluorescent în lumină UV (Figura 4.4) care corespunde descrierii sideroforilor produși de pseudomonade.

Testul APIZONE și o serie de caracteristici morfologice ale tulpinilor M61, MP11 și MP3 (Tabelul 4.1) au permis identificarea acestora ca aparținând speciei *Pseudomonas fluorescens*.

Tabelul 4.1. Caracteristici morfologice ale tulpinilor producătoare de lipaze izolate din probe de sol (Vf. Omu, Mții. Bucegi, România)

Tulpina	M61	MP11	MP3
<u>Caracteristici coloniale</u>			
- <i>conturul</i>	circular cu margini netede	circular cu margini netede	circular cu margini zimțate
- <i>relieful</i>	convex	convex	convex
- <i>suprafața</i>	lucioasă	lucioasă	lucioasă
<u>Morfologia celulară</u>			
- <i>forma</i>	bacil	bacil	bacil
- <i>dimeasiune (μm)</i>	1,5 - 2,5	1,8 - 2	1,5 - 2
- <i>aranjare celulară</i>	celule singulare	celule singulare	celule singulare
Pigmenți	siderofori	siderofori	siderofori
Colorarea Gram	negativă	negativă	negativă
Motilitate	+	+	+
Creștere la ≤ 5 °C	+	+	+
Creștere la 10 °C	++	++	++
Creștere la 20 °C	++	++	++
Creștere la 30 °C	+	-	-
Hidroliză Tween 80	+	+	+
NO ₃	-	-	-
TRP	-	-	-
GLU	-	-	-
ADH	+	-	-
URE	-	-	-
ESC	-	-	-
GEL	+	-	-
PNPG	-	-	-
GLU	+	+	+
ARA	+	+	+
MNE	+	+	+
MAN	+	+	+
NAG	+	+	+
MAL	-	-	-
GNT	+	+	+
GAP	+	+	+
ADI	-	-	-
MLT	+	+	+
CIT	+	+	+
PAC	+	-	-
OX	+	+	+

În sol, specia *P. fluorescens* face parte din populația microbiană care este de obicei asociată cu sistemele radiculare ale plantelor. Bacteria colonizează rădăcinile

plantelor sub formă de biofilm și întreține o relație de protocooperare cu acestea (Duijff et al. 1997).

Specia *P. fluorescens* este cunoscută ca fiind producător de lipaze (Kojima et al. 2003, Luo et al. 2006).

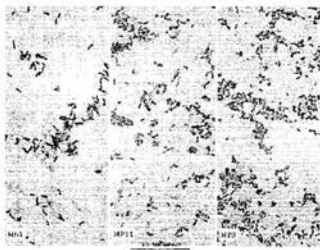


Figura 4.3 Aspectul microscopic al bacteriilor selecționate ca producători de lipaze. Imaginea este amplificată de 100×, iar scara este indicată în partea inferioară a figurii.



Figura 4.4 Aspectul cultural al coloniilor de bacterii studiate (stânga) și producerea de siderofori indicată de fluorescența mediului de cultură cu conținut limitat de fier în vecinătatea coloniilor (dreapta)

Determinarea creșterii celulare și determinarea activității lipolitice

Curbele de creștere și activitățile lipolitice determinate pentru cele trei tulpini studiate sunt prezentate în Figura 4.5.

Activitatea lipazelor a putut fi evidențiată în studiul de față după 24 h de la inoculare. Valorile maxime ale activităților de hidroliză ale lipazelor sintetizate de culturile de *P. fluorescens* dezvoltate în sistem submers s-au înregistrat la 36 h pentru tulpinile M61 și MP3, și la 48 h pentru tulpina MP11. După aceste intervale, profilurile de activitate lipolitică au prezentat o depreciere rapidă. Valoarea maximă a activității lipolitice (LU) determinate a fost de 441 LU/mL, în cazul tulpinii MP11, cea mai mică lipoliză fiind înregistrată în cazul tulpinii MP3 (72 LU/mL).

Studiul a continuat exclusiv cu tulpina *P. fluorescens* MP11 fiind net superioară din punct de vedere al activității lipazice.

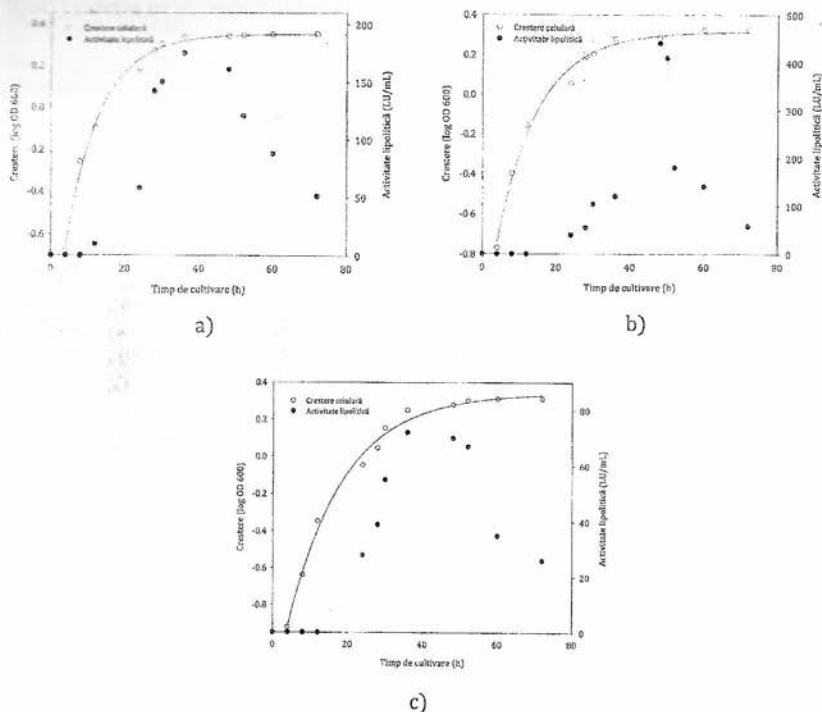


Figura 4.5 Curbele de creștere și valorile activităților lipolitice pentru culturile selecționate de *Pseudomonas fluorescens*, tulpinile M61 (a), MP11 (b) și MP3 (c)

Lipaza activă la temperaturi scăzute: dinamica de multiplicare și cuantificarea activității lipazelor

Cinetica de dezvoltare a tulpinii în funcție de temperatură este prezentată, pentru cele trei valori de temperatură în Figura 4.6. Activitatea lipolitică la temperatura optimă de dezvoltare (20 °C) nu a fost detectată. Sinteza lipazei s-a observat când cultivarea s-a desfășurat la 15 °C.

În cazul cultivării bacteriei la temperatura de 15 °C, activitatea lipazică în extractul cultural a fost detectată după 24 h de creștere, când cultura se afla în faza tardivă a fazei exponențiale de multiplicare. Profilul de activitate lipolitică a fost similar cu cel al cineticii de creștere microbiană, dar a înregistrat o reducere semnificativă după

46 h de cultivare. Reducerea activității lipolitice în lichidul cultural se datorează unei proteolize avansate (Fig 4.7). Sinteza enzimelor proteolitice o precede pe cea a lipazelor, cele două enzime extracelulare acționând în paralel, ducând la inactivarea preparatului lipolitic.

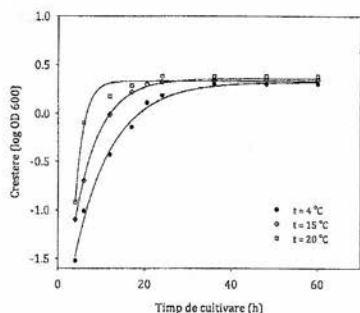


Figura 4.6 Cinetica de creștere a tulpinii *Pseudomonas fluorescens* MP11 în funcție de temperatura de cultivare: 4 °C (●), 15 °C (◊), 20 °C (◻)

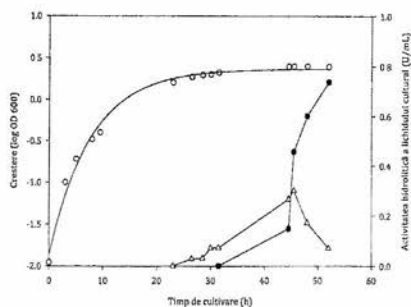


Figura 4.7 Viteza de creștere a culturii bacteriene (○) corelată cu biosinteza de lipaze (Δ) și proteaze (●)

P. fluorescens este bun producător de proteaze, sinteza acestor enzime fiind de multe ori asociată cu sinteza lipazelor în special în produsele alimentare, provocând alterarea prematură a acestora (Rajmohan et al. 2002).

Stabilitatea preparatului lipolitic a fost influențată de temperatura de păstrare (Figura 4.8). O temperatură de refrigerare a avut un efect pozitiv asupra stabilității preparatului enzimatic, încetinind inactivarea totală a preparatului lipolitic, care s-a înregistrat după 60 h. Extractul enzimativ brut menținut la temperatura camerei (20 °C) nu a prezentat activitate lipolitică după 36 h de păstrare. Preparatele lipolitice păstrate la - 20 °C au prezentat stabilitate bună în timp, cu excepția unei inactivări moderate cauzate, probabil, de o labilitate a enzimei la valoarea scăzută a temperaturii de păstrare.

Pentru a reduce cât mai mult inactivarea lipazelor, încă din timpul multiplicării celulare, s-a procedat la reducerea temperaturii de cultivare de la 15 °C la 4 °C, după ce cultura a intrat în faza staționară de creștere.

În cazul utilizării unor temperaturi de cultivare de 15 °C și 4 °C respectiv, cultura a intrat în faza staționară în jurul intervalului de cultivare de 24 h. O reducere a temperaturii de creștere nu ar fi afectat semnificativ dezvoltarea microorganismului

întrucât tulpina selecționată Pf-MP11 crește chiar și la temperaturi de 0 °C, iar producerea lipazei este, în mod clar, condiționată de un regim termic redus.

Fracționarea proteinelor din preparatul extracelular brut s-a realizat la saturații de sare de 20 %, 40 % și respectiv 60 %. Activitățile hidrolitice determinate reflectă o bună separare a lipazelor de enzimele proteolitice (Figura 4.9).

Precipitarea cu sulfat de amoniu a permis o bună separare a lipazelor care au precipitat la o saturație de 40 %, pe când proteazele s-au regăsit în fracțiunea proteică care a precipitat la o concentrație de 60 % (m/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

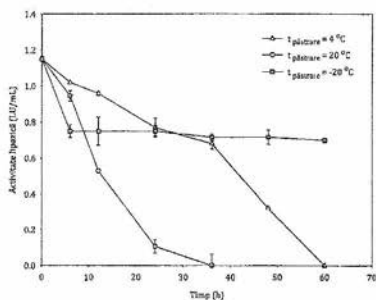


Figura 4.8 Influența acțiunii hidrolitice a proteazelor asupra stabilității lipazelor din preparatul enzimatic brut în funcție de timp și temperatura de păstrare

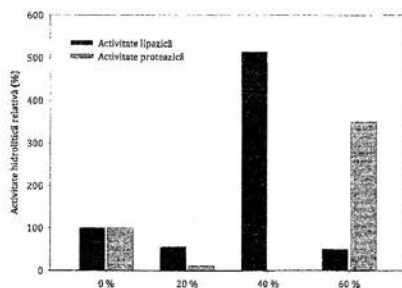


Figura 4.9 Fracționarea enzimelor din preparatul enzimatic brut prin precipitare cu sulfat de amoniu. Activitatea enzimatică din preparatul enzimatic brut a fost considerată ca fiind 100 % pentru fiecare tip de enzimă

S-a apreciat că după un timp de cultivare de 46 h, într-un regim de temperatură 15 °C/24 h + 4 °C/24 h, aproximativ 50 % din totalul de proteine sintetizate (0,4 mg/mL) de tulpina bacteriană selecționată se regăsesc în preparatul lipazic brut.

Concluzii parțiale

Din probele de sol colectate din Munții Bucegi, Vârful Omu, s-au izolat 36 de tulpini de bacterii psihrotrofe.

Utilizarea mediului agarizat Rhodamina B – ulei măsline a permis selecționarea rapidă a trei tulpini de bacterii cu potențial lipolitic ridicat.

Cele trei tulpini selecționate au fost caracterizate din punct de vedere morfologic și biochimic utilizând sistemul API 20NE și s-a stabilit că acestea aparțin speciei *Pseudomonas fluorescens*.

Pe baza curbelor de creștere și profiluri de activitate lipolitică trasate în urma cultivării bacteriilor selecționate în sistem submers, discontinuu, la 15 °C și 100 rpm, tulpina *P. fluorescens* MP11 (Pf-MP11) a fost selecționată ca producător de lipaze cu potențial ridicat de sinteză a acestor enzime.

Tulpina Pf-MP11 selecționată ca fiind producător de enzime lipolitice a fost cultivată în sistem submers pentru determinarea dinamicii de multiplicare corelată cu sinteza de lipaze și proteaze. În studiu s-a remarcat influența semnificativă pe care o au enzimele proteolitice din preparatul enzimatic brut asupra stabilității lipazelor extracelulare.

În vederea limitării proteolizei asupra lipazei produse de Pf-MP11, s-a studiat corelația între temperatura de creștere a culturii bacteriene și sinteza de lipaze, și s-a stabilit un regim optim de cultivare pentru Pf-MP11 timp de 24 ore la temperatura de 15 °C, până când, cultura intră în faza staționară, urmată de o coborâre a temperaturii la 4 °C până la 46 - 48 h cultivare. Această modificare nu a afectat viteza de creștere a culturii de Pf-MP11.

Proteinele solubile sintetizate și eliberate în lichidul cultural, a căror concentrație s-a situat, aproximativ, în jurul valorii de 0,4 mg/mL, au fost separate prin fracționare cu sulfat de amoniu. La o saturație de 40 % sare s-a realizat cea mai bună separare a enzimelor lipolitice de proteaze, a căror acțiune hidrolitică a avut un efect negativ major asupra stabilității preparatului enzimatic brut.

5. Izolarea și purificarea lipazei sintetizată de tulpina selecționată *Pseudomonas fluorescens* MP11 (Pf-MP11)

Materiale și metode

Pentru purificarea preparatului enzimatic s-a folosit coloana preasamblată Superdex 200 GL 10/300 (GE Healthcare), care permite separarea proteinelor cu mase moleculare între 10 - 600 kDa. Procesul cromatografic a fost controlat cu un sistem Akta Explorer dotat cu colector de fracțiuni (GE Healthcare, UK). Absorbanța a fost

monitorizată în sistem continuu la 280 nm iar fracțiunile eluate de 0,3 mL au fost colectate pentru analiză.

Coloana Superdex 200 GL a fost calibrată cu proteine standard (GE Healthcare) după cum urmează: catalază (232 kDa), aldolază (158 kDa), albumină serică bovină (BSA) (66 kDa), ovalbumină (45 kDa) și α -lactalbumină (14,4 kDa) (Figura 5.1). Volumul mort (V_0) a fost determinat cu Dextran Blue a cărui masă moleculară este de 10000 kDa. Pe baza ecuației drepte de regresie (Figura 5.2) s-a estimat masa moleculară a lipazei studiate în stare nativă.

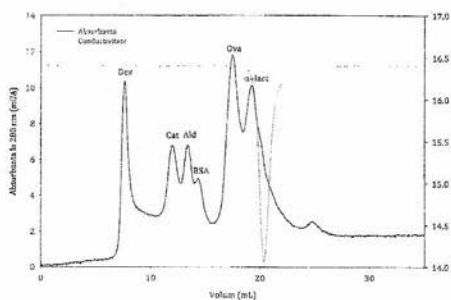


Figura 5.1 Cromatograma de excludere moleculară pentru etalonarea coloanei Superdex 200 GL. Figura indică absorbanta proteinelor utilizate ale căror semnale de detecție sunt indicate Dex - Dextran Blue, Cat - catalază, Ald - aldolază, BSA - albumină serică bovină, Ova - ovalbumină, α - lact- α -lactalbumină.

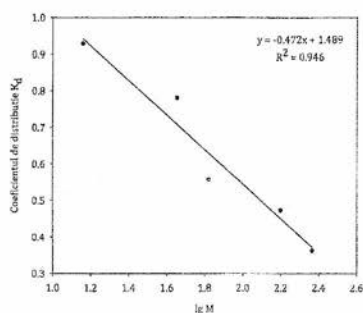


Figura 5.2 Dreapta de regresie a coeficientului de distribuție K_d realizată pentru coloana Superdex 200 GL și pentru un domeniu de masă moleculară de 14,4-234 kDa

Probele eluate în urma cromatografiei de excludere în gel au fost testate pentru activitate lipazică. În plus, pe parcursul etapelor de obținere a preparatului lipazic pur s-au colectat probe care au fost supuse electroforezei denaturante în gel de poliacril amidă cu minigeluri Novex® Bis-Tris (Invitrogen).

Influența pH-ului mediului de reacție asupra activității hidrolitice a LipPf-MP11 a fost evaluată pentru intervalul de pH 4,0 - 12,0 cu soluții tampon 50 mM, după cum urmează: tampon fosfat pentru pH 4,0 - 6,0; tampon Tris-HCl pentru pH 6,5 - 9,0 și tampon glicină - NaOH pentru pH 9,5 - 12,0. Soluțiile au fost aditivitate cu 0,11 % (m/v)

gumă arabică și 0,23 % (m/v) deoxicolat de sodiu, pentru stabilizarea amestecului de reacție.

Influența temperaturii asupra activității lipazice, pentru reacții de hidroliză, a fost determinată în intervalul de temperatură 0 – 60 °C. În studiu a fost inclusă, în scop comparativ, o lipază comercială sintetizată de o tulpină mezofilă de *Pseudomonas fluorescens* (Sigma).

S-a studiat efectul lungimii catenei de carbon asupra activității de hidroliză a lipazei Pf-MP11 asupra unor esteri etilici (C4:0, C8:0, C18:1) și vinilici (C4:0, C10:0, C12:0, C18:0). Activitatea lipazică a fost determinată prin metoda pH-stat ajutorul pH-metrului Metrohm (Metrohm AG, Elveția). În studiu au mai fost folosiți și esteri nitrofenolici ai acizilor grași saturați, în care gruparea acil a fost acidul tetraanoic (C4:0), acidul octanoic (C8:0), acidul decanoic (C10:0), acidul dodecanoic (C12:0), acidul tetradecanoic (C14:0), acidul hexadecanoic (C16:0) și acidul octadecanoic (C18:0).

Afinitatea enzimei la substrat în funcție de lungimea catenei de carbon a grupării acil a fost apreciată cu ajutorul parametrilor cinetici Michaelis-Menten.

Rezultate și discuții

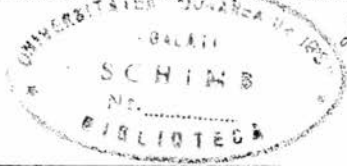
Separarea lipazei prin cromatografie de excludere moleculară

Pentru identificarea lipazei din extractul cultural, un volum de 200 μ L a fost supus separării pe coloana de excludere moleculară. Profilul de eluție a speciilor proteice din extractul cultural a fost comparat cu profilul de activitate a fracțiunilor colectate (Figura 5.3).

Activitatea lipolitică s-a regăsit într-un interval mare de eluție, ceea ce denotă o purificare ineficientă întrucât fracțiunile colectate corespund unor proteine cu mase moleculare între 55 – 250 kDa.

Existența a două *peak*-uri de activitate în cromatograma de excludere moleculară ar putea fi explicat prin formularea a două ipoteze și anume, tulpina Pf-MP11 sintetizează două lipaze extracelulare, sau lipaza sintetizată prezintă o tendință de aglomerare, generând o formă polimerică capabilă să își păstreze activitatea catalitică.

Majoritatea tulpinilor de *P. fluorescens* studiate, până acum, codifică o singură lipază. Totuși, existența unei tulpini de *P. fluorescens* capabile să sintetizeze două lipaze extracelulare a fost raportată anterior (Dieckelmann et al.:1998). În prezent nu se



cunosc lipaze cu masa moleculară ≥ 200 kDa, iar clasificări ale enzimelor lipolitice menționează lipaze cu mase moleculare de până la 65 kDa (Arpigny și Jaeger 1999).

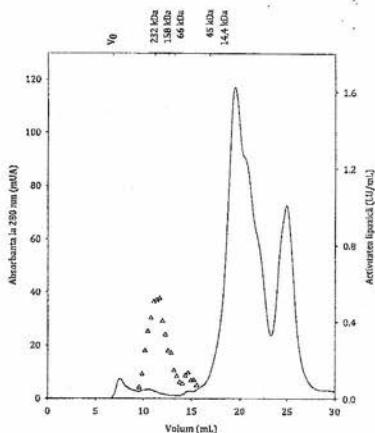


Figura 5.3 Cromatograma de fracționare a preparatului lipazic brut prin excludere în gel. În imagine sunt ilustrate absorbanta (—) măsurată la 280 nm și activitatea lipolitică (Δ) a fracțiunilor colectate. În partea superioară a graficului sunt indicate volumele de eluție corespunzătoare diferitelor mase moleculare și volumul mort (V_0)

O concentrație de 40 % (m/v) sulfat de amoniu a permis separarea lipazelor din lichidul cultural. Preparatul lipazic parțial purificat a fost supus de asemenea cromatografiei de excludere moleculară pe coloana Superdex 200 GL. Analiza fracțiunilor cu activitate lipolitică a scos la iveală faptul că lipaza a eluat în mare parte în volumul mort. Activitate lipolitică a fost de asemenea detectată și în fracțiunile eluate ulterior primului *peak* (Figura 5.4).

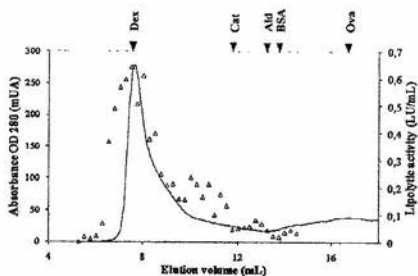


Figura 5.4 Cromatograma de fracționare a preparatului lipazic parțial purificat prin excludere în gel. Imaginea ilustrează absorbanta (—) măsurată la 280 nm și activitatea lipolitică (Δ) a fracțiunilor colectate. În partea superioară a graficului sunt indicate volumele de eluție pentru diferite mase moleculare și volumul mort (V_0)

Analiza cromatografică a lipazei parțial purificate a întărit teoria tendinței de aglomerare a lipazei, cu formarea agregatelor proteice cu masă moleculară mare. Aglomerarea proteinelor în timpul precipitării nu este un fenomen neobișnuit și a fost semnalat, rareori însă, și pentru proteine cu caracter hidrofob cum sunt și lipazele (Liou et al. 1998). La concentrații proteice foarte mari, interacțiunile hidrofobe intermoleculare ale lipazelor sunt favorizate și se produce aglomerarea acestora.

Purificarea lipazei s-a realizat printr-un procedeu care a constat în două etape de separare. Gradul de purificare al lipazei Pf-MP11 (Tabelul 5.2) a atins o valoare de aproximativ 4,4, iar activitatea lipolitică a scăzut în timpul formării agregatelor ca urmare a denaturării enzimaticice.

Tabelul 5.2 Purificarea lipazei sintetizată de tulpina *Pseudomonas fluorescens* MP11

Etapa	Conținut total de proteine ^a (mg)	Activitate totală ^b (LU)	Activitate specifică ^c (LU/mg)	Grad de purificare
Lichid cultural	152,0	460,0	3,0	1,0
Precipitare cu sulfat de amoniu 40% (m/v)	56,7	445,0	7,8	2,6
Cromatografie de excludere moleculară	0,4	4,8	13,3	4,4

^a Conținutul total de proteine a fost determinat prin metoda Bradford. Volumul inițial de lichid cultural a fost de 450 mL.

^b Activitatea totală a fost determinată prin metoda spectrofotometrică de monitorizare a hidrolizei *p*-nitrofenil lauratului. Unitățile de activitate lipazică au fost exprimate ca μmoli de *p*-nitrofenol eliberați pe minut.

^c Activitatea specifică a fost exprimată în μmoli de *p*-nitrofenol eliberați pe minut per mg proteine totale.

Determinarea masei moleculare a lipazei LipPf-MP11

Probe de preparat enzimatic din diferite etape ale procesului de purificare au fost analizate prin SDS-PAGE pentru determinarea purității și a masei moleculare a lipazei (Figura 5.5).

Întrucât, în timpul cromatografiei de excludere moleculară, lipaza a fost în cea mai mare parte eluată în volumul mort, s-a considerat că rezultatul electroforezei în gel de poliacril amidă a confirmat agregarea macromoleculară a proteinei.

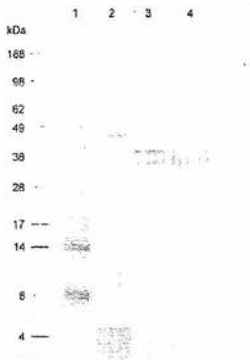


Figura 5.5 Analiza SDS-PAGE a enzimei LipPf-MP11 în timpul purificării. Linia 1, amestecul proteic standard; Linia 2, lichidul cultural lipsit de biomasă celulară a tulpinii *P. fluorescens* MP11; Linia 3, fracțiunile lipolitice active obținute după precipitarea cu sulfat de amoniu; Linia 4, fracțiunea lipazică cea mai activă, obținută după separarea prin cromatografie de excludere moleculară

Supernatantul cultural a constat într-un amestec de proteine, dintre care cea mai abundentă a avut o masă moleculară de 49 kDa. După precipitarea cu sulfat de amoniu această proteină a fost complet îndepărtată din preparat, iar ponderea majoritară a aparținut, de data aceasta, unor proteine cu masele moleculare de aproximativ 37 kDa și respectiv 40 kDa. Ultima etapă de purificare, și anume cromatografia de excludere moleculară, s-a finalizat cu obținerea unui preparat lipazic pur, care a apărut în gelul de electroforeză ca o bandă proteică sigulară de aproximativ 37 kDa.

Determinarea masei moleculare a lipazei native nu a fost posibilă din cauza tendinței de aglomerare a moleculelor lipazice, fenomen favorizat, în special, în timpul precipitării cu sulfat de amoniu.

Lipazele au fost clasificate în opt familii, în funcție de secvențele aminoacizilor lor și de unele caracteristici biologice fundamentale (Arpigny și Jaeger 1999). Lipazele din *P. fluorescens* sunt incluse în subfamiliile I.1, I.2 și I.3 și sunt denumite *lipaze autentice*. O *lipază autentică* este definită ca fiind o carboxil-esterază care catalizează hidroliza și sinteza acilglicerolilor cu catenă lungă, trioleilglicerolul fiind substratul standard. Masele lor moleculare se află între 30 – 32 kDa pentru cele din prima subfamilie, în jurul valorii de 33 kDa pentru a doua subfamilie și sunt ceva mai mari, între 50 kDa și 65 kDa, în cazul celei de-a treia subfamilie.

Lipaza Pf-MP11 are o masă moleculară diferită față de cele menționate anterior și nu a putut fi încadrată din acest punct de vedere în una dintre subfamiliile cunoscute. Enzima LipPf-MP11 ar putea fi o lipază nouă care ar necesita o clasificare diferită față de

cele cunoscute. Elucidarea secvenței aminoacizilor ar furniza informații cu privire la masa moleculară reală a lipazei, și ar ajuta la clasificarea acesteia.

Evaluarea influenței pH-ului și a temperaturii asupra activității lipazei Pf-MP11

S-a observat că pH-ul are o influență semnificativă asupra activității hidrolitice a lipazei. Enzima a fost activă în special la pH mai mare de 6,5 și a manifestat un maxim de activitate la pH 8,5, lipaza Pf-MP11 fiind astfel o lipază alcalină (Figura 5.6). Lipazele sintetizate de *P. fluorescens* sunt în general active la pH alcalin (Kojima et al. 1994), o caracteristică care le face adecvate uzului în formulele detergenților.

A fost studiat efectul temperaturii asupra vitezei de hidroliză a *p*-nitrofenil lauratului cu preparatul lipolitic Pf-MP11 în intervalul de temperatură 0 – 70 °C. În experiment a fost inclusă și o lipază comercială din *P. fluorescens* (Figura 5.7).

Între cele două enzime testate există o diferență majoră din punct de vedere al profilul termic de activitate lipolitică. Lipaza Pf-MP11 a avut activitate maximă la temperatura de 40 °C, a păstrat 50 % din activitatea sa maximă la 20 °C și mai mult de 15 % la temperatura de 0 °C. La temperaturi mai mari decât temperatura optimă, activitatea lipazei Pf-MP11 a scăzut drastic până la inactivarea completă la 60 °C. În contrast cu aceste date, lipaza comercială a avut o activitate optimă la temperatura de 60 °C dar a reținut mai puțin de 20 % din activitatea maximă la 20 °C, în timp ce la 0 °C nu a manifestat activitate hidrolitică relevantă. Activitatea reziduală mare la temperaturi scăzute face ca enzima LipPf-MP11 să poată fi numită enzimă activă la temperaturi scăzute.

S-a arătat, în lucrările publicate până acum, că lipazele acționează optim într-un interval mare de temperatură, multe dintre ele având temperatura optimă de activitate între 35 – 45 °C (Kim et al. 2010, Rashid et al. 2001).

Termostabilitatea enzimei a fost determinată prin menținerea lipazei la diferite temperaturi și s-a determinat activitatea reziduală la 40 °C. După o oră, enzima a păstrat 100 %, 100 % și respectiv 10 % din activitatea sa inițială și 100 %, 80 % și 0 % după 24 h de termostatare la 20 °C, 40 °C și 60 °C respectiv. Preparatul lipolitic obținut după precipitarea cu sulfat de amoniu a fost păstrat la temperatura de 4 °C, lipaza fiind stabilă chiar și după 12 luni.

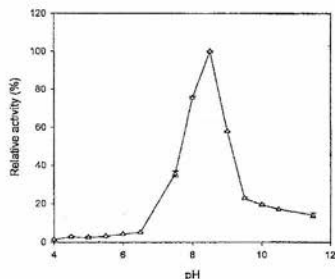


Figura 5.6 Efectul pH-ului asupra activității lipazei Pf-MP11. Activitatea optimă a lipazei la pH 8,5 a fost considerată ca 100 %

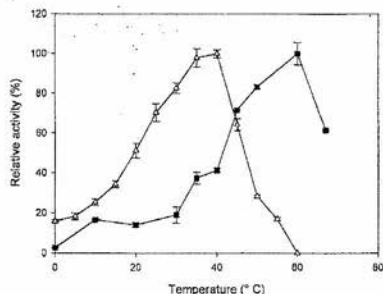


Figura 5.7 Efectul temperaturii asupra activității lipazice a Pf-MP11 (Δ) și a lipazei comerciale din *Pseudomonas fluorescens* (■). Pentru fiecare enzimă activitatea maximă a fost considerată ca 100 %

Evaluarea influenței lungimii catenei de carbon a acizilor grași asupra activității lipolitice și cinetica reacțiilor de hidroliză a unor esteri ai *p*-nitrofenolului

S-a determinat influența lungimii catenei de carbon a restului acil asupra activității hidrolitice a enzimei LipPf-MP11. Tiposelectivitatea oferă un avantaj enzimei în aplicații precum modificarea grăsimilor, mai exact hidroliza esterilor în vederea obținerii unor acizi grași, sau a unor gliceride parțial hidrolizate, îmbogățirea unor amestecuri oleice cu acizi grași mononesaturați și polinesaturați.

O serie de esteri au fost testați iar rezultate sunt prezentate în Figura 5.8.

Activitatea lipazei Pf-MP11 a fost influențată de mărimea grupării acil, aceasta prezentând o valoare maximă pentru esterul vinilic al acidului decanoic.

Întrucât datele prezentate nu au fost suficiente în aprecierea influenței pe care o are lungimea radicalului acil asupra activității lipazice, a fost testată o serie de esteri ai *p*-nitrofenolului. În experiment a fost considerată relația enzimă-substrat, variind concentrația celui din urmă (Figura 5.9).

Enzimele lipolitice, în general sunt selective față de acizii grași cu catenă lungă și derivații acestora. Există însă date referitoare la lipaze sintetizate de tulpini de *Pseudomonas* spp. și *P. fluorescens* selective față de esteri ai acizilor grași cu catenă scurtă (Utsugi et al. 2009).

Obținerea și caracterizarea unei lipaze bacteriene active la temperaturi scăzute

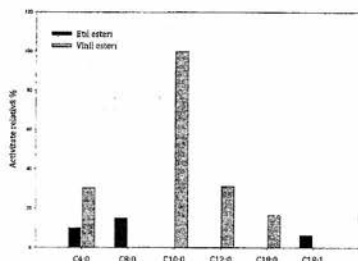


Figura 5.8 Influența lungimii catenei de carbon a grupării acil asupra activității hidrolitice a lipazei Pf-MP11. Activitatea optimă față de vinil decanoat a fost considerată ca 100 %

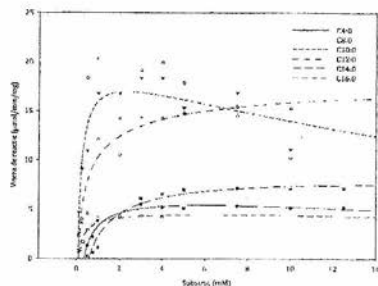


Figura 5.9 Cinetica reacțiilor de hidroliză a preparatului lipazic Pf-MP11 pentru esterii *p*-nitrofenolului. Figura ilustrează relația dintre viteza de reacție și concentrația esterilor acizilor grași saturați

În cazul a două dintre reacțiile studiate, s-a înregistrat inhibiție prin exces de substrat. Vitezele de reacție au început să scadă pentru reacțiile de hidroliză ale *p*-nitrofenil caprilatului și *p*-nitrofenil caproatului la concentrații ale substratului superioare valorilor de 2 mM și 4 mM respectiv.

Inhibiția prin exces de substrat este un fenomen a cărui influență este bine indicată de curba modelului cinetic Michaelis-Menten ajustată datelor obținute experimental (Parkin 2003). Parametrii cinetici ai reacțiilor prezentate au fost aproximați cu ajutorul programului SigmaPlot (Systat Software Inc.) (Tabel 5.3).

Tabelul 5.3 Evaluarea selectivității lipazei Pf-MP11 față de lungimea catenei de carbon a radicalului acil în reacția de hidroliză a unor esteri ai *p*-nitrofenolului

Gruparea acil a esterului pNP	Substrat (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	K_m (mM)	Observații
acid butiric	0,5 – 12,5	5,76	0,9	
acid caprilic	0,1 – 10,0	20,1	0,197	Inhibiție prin exces de substrat
acid caproic	0,1 – 10,0	17,7	0,199	Inhibiție prin exces de substrat
acid lauric	0,5 – 10,0	16,9	0,23	
acid miristic	0,5 – 12,5	4,6	0,95	
acid palmitic	0,1 – 5,0	4,41	0,65	

În ultimul timp, lipazele sunt folosite în reacții *in situ*, fiind incluse direct în alimente, sub formă de aditivi. Activitatea catalitică a acestor enzime determină formarea unor compuși cu efect benefic asupra texturii, aromei și calității, în general, a produsului finit.

Selectivitatea lipazelor față de acizii grași cu catenă medie poate fi utilizată în sisteme mono sau bi-enzimatice pentru îmbogățirea uleiurilor în gliceride ale acizilor DHA și EPA (Shimada et al. 1995), pentru îmbunătățirea aromei brânzeturilor (Hernández et al. 2005) și producerea de monoacilgliceroli, în vederea obținerii unor compuși cu proprietăți emulsionante sau chiar de conservare (Doležalová et al. 2010).

Principalele fracțiuni din uleiurile de cocos și palmier sunt trigliceride ale acizilor caprilic și caproic. O lipază selectivă față de C8:0 și C10:0 ar reprezenta un catalizator apreciat în procesele care implică modificarea grăsimilor vegetale, anterior menționate, în aplicații precum obținerea de acizi grași liberi, și a produselor de tip captrin¹ (Tenore și Galante 2005).

Aplicații ale lipazelor, care implică obținerea produselor mai sus menționate, ar beneficia de pe urma unei lipaze cu selectivitate hidrolitică față de esteri ai acizilor caprilic și caproic.

Concluzii parțiale

S-a obținut un preparat lipolitic parțial purificat prin precipitarea cu sulfat de amoniu cu stabilitate bună în timp, chiar și după 12 luni.

Separarea prin cromatografie de excludere moleculară a permis purificarea lipazei Pf-MP11 la un grad de purificare de 4,4.

În timpul precipitării lipaza a manifestat o tendință de aglomerare confirmată de cromatografia de filtrare în gel și electroforeza SDS-PAGE. Această proprietate reprezintă o particularitate a lipazei Pf-MP11 care o diferențiază de majoritatea lipazelor descrise în literatura de specialitate și ar putea constitui, poate, un avantaj în proceduri de imobilizare și creșterea stabilității enzimei.

Masa moleculară a lipazei Pf-MP11 a fost apreciată prin electroforeză denaturantă în gel de poliacril amidă ca fiind de aproximativ 37 kDa.

¹ Denumirea trigliceridelor randomizate cu conținut ridicat de acid caprilic (C8:0) și caproic (C10:0)

Lipaza Pf-MP11 este o lipază activă în intervalul de temperatură 0 – 55 °C cu o temperatură optimă de acțiune la 40 °C, în condiții alcaline.

Preparatul lipolitic Pf-MP11 prezintă în reacțiile de hidroliză specificitate aparentă față de esterii acizilor grași saturați cu catenă de lungime medie (C8:0, C10:0).

Caracteristicile lipazei, cunoscute până în acest moment al studiului, indică faptul că preparatul lipolitic Pf-MP11 ar putea fi folosit în procesele de modificare ale grăsimilor din alimente, cu scopul obținerii unui efect emulsifiant mai bun în aluaturi sau îmbunătățirii aromei brânzeturilor și cremelor.

Stabilitatea și activitatea lipazei Pf-MP11 la temperaturi scăzute o face adecvată utilizării în procese cu consum redus de energie în vederea diminuării costurilor de producție crescându-le astfel eficiența economică.

6. Comportamentul catalitic al lipazei în solvent organic

Materiale și metode

Determinarea specificității lipazei față de alcoolii primari sau secundari s-a realizat prin reacția de transesterificare a acestora cu acetatul de vinil. Preparatul enzimatic a fost în prealabil liofilizat pentru îndepărtarea apei, absența acesteia fiind o condiție esențială pentru reacțiile vizate. În vederea înlăturării, pe cât posibil, a erorilor, probele au fost cântarite.

Amestecurile de reacție au fost analizate prin gaz cromatografie.

În experiment a fost folosită, pentru comparație, și lipaza comercială Amano AK (Amano). Alcoolii primari utilizați pentru determinarea specificității celor două lipaze au fost: 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 1-heptanol, 1-octanol.

Alcoolii secundari folosiți în experiment au fost aleși din seria C4 – C9, iar calibrarea metodei s-a realizat cu esterii acestora.

Determinarea conținutului de apă din sistemul reactiv a fost realizată prin titrare Karl Fischer, la timpul zero, înainte de adăugarea acetatului de vinil în reacție.

Influența lungimii catenei de carbon a acizilor grași asupra activității catalitice a enzimei LipPf-MP11 a fost studiată pentru reacția de esterificare a pentanolului cu acizii grași din seria C4:0 – C18:0. În plus, au fost folosiți și acidul oleic (C18:1), acidul ricinoleic (C18:1-OH) și acidul linoleic (C18:2). Metoda a fost etalonată cu 1-pentanol.

Specificitatea de poziție a lipazei Pf-MP11 pentru legăturile esterice ale trigliceridelor a fost determinată cu substraturile standard: trioleină, 1,3-dioleină, 1-oleil-*rac*-monoglicerol și acid oleic. Trioleina și 1,3-dioleina au fost folosite ca substraturi de hidroliză pentru lipaza Pf-MP11. Producții de reacție au fost separați prin cromatografie în strat subțire (TLC) folosind plăci de silica gel pe suport de aluminiu Silica Gel 60 (Merk).

Rezultate și discuții

Reacțiile de transesterificare a acetatului de vinil cu alcoolii primari

În ciuda diferențelor mici între rezultatele obținute pentru reacția de transesterificare a acetatului de vinil cu alcoolii primari s-a putut aprecia activitatea lipazei Pf-MP11 în funcție de gruparea alcoolică (Figura 6.1). Lipaza a manifestat o afinitate catalitică maximă pentru 1-pentanol.

Utilizarea unei cantități mai mare de enzimă la același amestec de reacție a condus la creșterea semnificativă a randamentului de cataliză în primele 4 h de reacție, după care a urmat o scădere bruscă a cantității de produs de transesterificare până la 24 h de reacție (Figura 6.2). Diminuarea randamentului de produs în primele ore de reacție este cauzată de hidroliza compusului nou format.

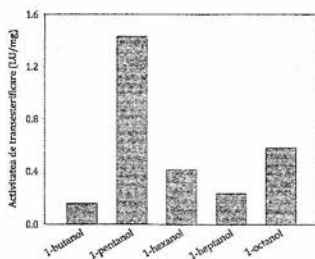


Figura 6.1 Influența lungimii catenei de carbon a alcoolilor primari asupra activității de transesterificare a lipazei Pf-MP11 în reacția acetatului de vinil cu o serie de alcoolii primari

Pentru explicarea acestui fenomen pot fi luate în considerare două situații și anume: (1) conținut de apă ridicat în preparatul enzimatic, comparativ cu valorile mici impuse de tipul reacției de transesterificare, sau (2) posibilitatea existenței unor urme de acizi grași în preparatul enzimatic folosit, fapt care, ar fi determinat inițierea,

catalizei enzimatică a reacției de esterificare a alcoolului cu acizii grași *contaminanți*, în paralel cu reacția de transesterificare. În urma esterificării are loc formarea apei ca subprodus de reacție, apă a cărei prezență și acumulare sistematică în mediul de reacție determină lipaza să catalizeze hidroliza esterului format în timpul reacției principale, și anume, reacția de transesterificare a alcoolilor primari cu acetatul de vinil.

Prin titrarea Karl Fischer conținutul apei din amestecul de reacție a fost apreciat ca fiind de aproximativ 0,2 % (m/v). Utilizarea sitelor moleculare a scăzut remarcabil activitatea lipazei prin diminuarea conținutului de apă. Reacțiile de interesterificare catalizate de lipaze decurg în prezența apei în sistem în raport de 0,04 – 11,0 % (m/v), cele mai multe însă decurg optim la o valoare a conținutului de apă mai mică de 1 % (Malcata 1992).

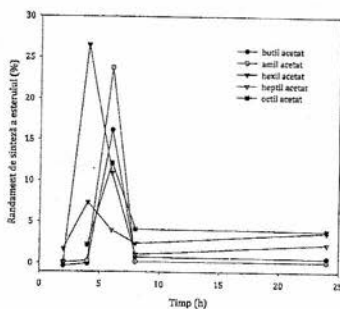


Figura 6.2 Evoluția randamentului în esteri acetici sintetizați în reacția de transesterificare a acetatului de vinil cu alcooli primari sub acțiunea catalitică a lipazei Pf-MP11

Ulterior, analiza TLC a preparatului enzimatic, a confirmat prezența acizilor grași în preparatul lipazic Pf-MP11. Acest lucru întărește teoria existenței a două reacții secundare, catalizate în paralel cu reacția primară de transesterificare a acetatului de vinil cu alcoolii primari.

Reacțiile de transesterificare a acetatului de vinil cu alcooli secundari

Determinarea activității catalitice a lipazelor asupra alcoolilor secundari a avut ca prim obiectiv studiul selectivității stoechiometrice. Stereoselectivitatea este importantă pentru biosinteza unor intermediari enantiomerici în procesul de obținere a

unor substanțe cu utilizare, în special, în industria produselor farmaceutice (Cai et al. 2006) și în agrochimie (Ye et al. 2010).

Utilizarea în paralel a unei lipaze comerciale din *P. fluorescens* (Amano AK), a permis compararea profilului catalitic al celor două enzime pentru acest tip de reacție. Lipaza Amano AK a fost intens studiată, astfel că, în prezent este bine cunoscut caracterul *R*-stereoselectiv al acesteia (Machado et al. 2011).

Comparativ cu activitatea de transesterificare a acetatului de vinil cu alcoolii primari, activitatea catalitică a lipazei în transesterificarea alcoolilor secundari prezintă o viteză redusă ($\leq 50\%$) cauzată de preferința enzimei pentru structurile mai puțin ramificate. Lipaza Pf-MP11 a manifestat în reacțiile de transesterificare a alcoolilor secundari activitate ridicată pentru 2-pentanol (Figura 6.3). Comparativ cu aceasta, lipaza AK a acționat selectiv asupra alcoolilor 2-butanol, 2-pentanol și 2-nonanol. Selectivitatea cea mai mare a manifestat-o față de 2-butanol (Figura 6.4).

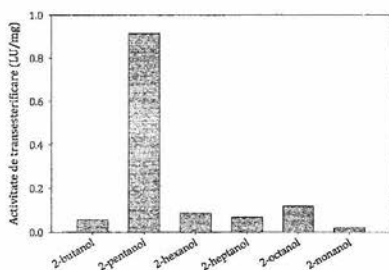


Figura 6.3 Influența lungimii catenei de carbon a compusului alcoolic asupra activității lipazei Pf-MP11 în reacția de transesterificare a acetatului de vinil cu alcoolii secundari

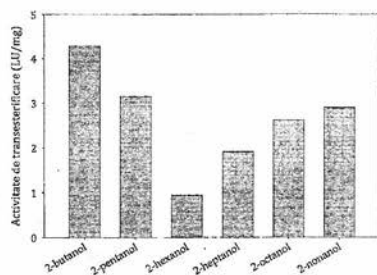


Figura 6.4 Influența lungimii catenei de carbon a compusului alcoolic asupra activității lipazei Amano AK în reacția de transesterificare a acetatului de vinil cu alcoolii secundari

Lipaza AK catalizează reacția de transesterificare a acetatului de vinil cu alcoolii secundari favorizând sinteza formei (*R*) a noului ester (Figura 6.5).

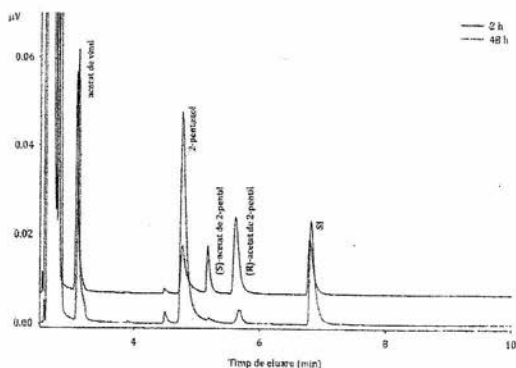


Figura 6.5 Gas cromatogramele reacțiilor de transesterificare a acetatului de vinil cu 2-pentanol catalizate de lipaza Amano AK după 2 h și respectiv 48 h. În imagine sunt indicate denumirile speciilor chimice separate corespunzătoare fiecărui *peak*

Lipaza Pf-MP11 a prezentat selectivitate *R* pentru alcoolii secundari dar a fost stereospecifică în reacția de transesterificare a acetatului de vinil cu 2-pentanol (Figura 6.6), cu 2-hexanol (Figura 6.7) și cu 2-heptanol (Figura 6.8).

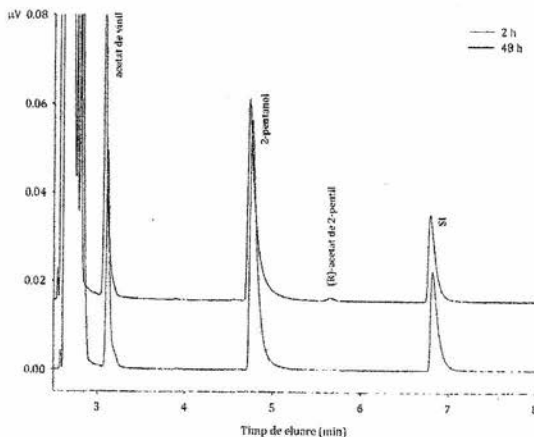


Figura 6.6 Gaz cromatogramele reacțiilor de transesterificare a acetatului de vinil cu 2-pentanol catalizate de lipaza Pf-MP11 după 2 și respectiv 48 h. În imagine sunt indicate denumirile speciilor chimice separate corespunzătoare fiecărui *peak*

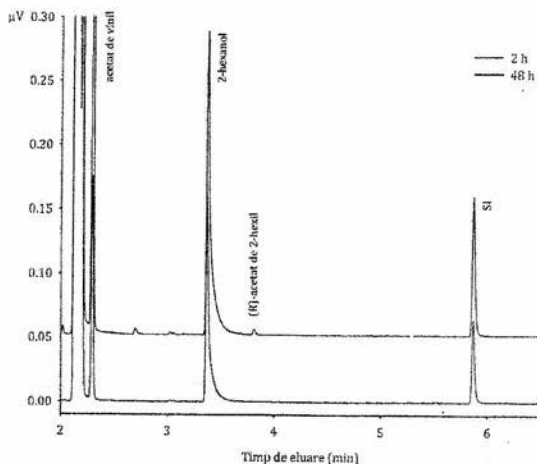


Figura 6.7 Gaz cromatogramele reacțiilor de transesterificare a acetatului de vinil cu 2-hexanol catalizate de lipaza Pf-MP11 după 2 și respectiv 48 h. În imagine sunt indicate denumirile speciilor chimice separate corespunzătoare fiecărui *peak*

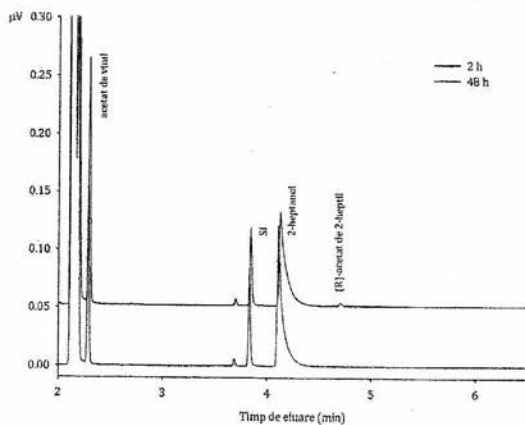


Figura 6.8 Gaz cromatogramele reacțiilor de transesterificare a acetatului de vinil cu 2-heptanol catalizate de lipaza Pf-MP11 după 2 și respectiv 48 h. În imagine sunt indicate denumirile speciilor chimice separate corespunzătoare fiecărui *peak*

Se remarcă în cromatograme absența enantiomerului (*S*) și se poate afirma că, cel puțin pentru condițiile de reacție folosite în studiul de față, lipaza Pf-MP11 prezintă specificitate față de enantiomerii (*R*) ai acetatului de pentil, acetatului de hexil și

acetatului de heptil, pentru care excesul enantiomeric (ee) a fost de 99 % pe tot parcursul duratei reacției, la un grad de conversie al substratului echivalent cu producerea ambilor enantiomeri (*S*) și (*R*) în cazul celorlalte reacții de transesterificare.

Ca și în cazul reacțiilor de transesterificare cu alcoolii primari, transesterificarea alcoolii secundari a fost însoțită de reacții secundare remarcate prin hidroliza esterului nou format.

În general, specificitatea absolută a unei enzime este un deziderat pentru aplicațiile industriale, implementarea proceselor care folosesc acest tip de biocatalizatori prezintă avantaje semnificative în ceea ce privește raportul randament de sinteză – costuri de producție. Se evită, în acest fel, obținerea subproduselor de reacție și, cel mai important, sunt eliminate din schema de producție procedeele de separare neavantajoase din punct de vedere economic.

Trebuie însă reținut, că de multe ori, specificitatea unei enzime poate fi controlată sau influențată de condițiile de reacție, de substratul utilizat sau de prezența altor compuși cu capacitate de amplificare sau de inhibiție a activității enzimatic vizate. Modificând parametrii anterior menționați se poate îmbunătăți randamentul de produs.

Influența lungimii catenei de carbon a acizilor grași asupra activității de esterificare a lipazei Pf-MP11

Alegerea alcoolului și a solventului folosiți în această reacție reprezintă rezultatul unor studii efectuate anterior și ale căror rezultate sunt parțial prezentate mai sus. Importanța acestui experiment se regăsește în eventualele aplicații care ar putea rezulta din utilizarea unei lipaze cu specificitate față de un anumit acid gras sau față de derivații acestuia.

Enzima a manifestat o preferință față de acizii grași cu catenă medie, mai exact față de acizii decanoic, dodecanoic și tetradecanoic (Figura 6.9).

Gradul de nesaturare al unui acid gras diminuează gradul de ramificare a catenei de carbon a acidului gras, acesta putând accesa mai ușor cavitatea situsului catalitic al enzimei. În acest mod pare să fi fost influențată și activitatea lipazei Pf-MP11, care a catalizat preferențial reacțiile de esterificare ale acidului oleic, ricinoleic și acidului linoleic față de acidul gras saturat cu 18 atomi de carbon.

Caracteristicile catalitice determinate pentru lipaza Pf-MP11, cum ar fi preferința lipazei față de acizii grași cu catenă medie și lungă indică faptul că lipaza

poate fi folosită în producerea de esteri de aromă (acizii decanoic și dodecanoic au importanță comercială ridicată pentru obținerea esterilor cu arome de citrice, pin, violete și ceară) și/sau producerea de grăsimi structurate (esterii ai glicerolului cu acizii dodecanoic și tetradecanoic sunt principalii constituenți în untul de cacao și echivalenții acestuia) (Fitch-Haumann 1984).

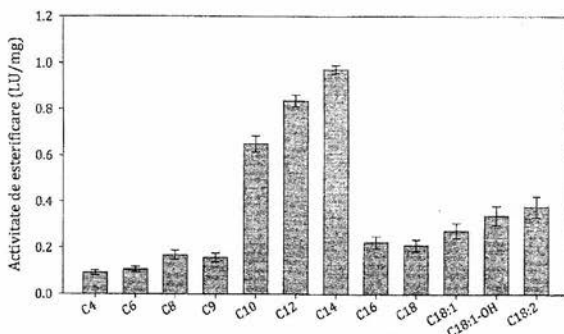


Figura 6.9 Influența lungimii catenei de carbon a acizilor grași, și a gradului de saturare al acestora, asupra activității lipazei Pf-MP11

Regiospecificitatea lipazei Pf-MP11

Lipaza Pf-MP11 nu a prezentat regiospecificitate, ea fiind capabilă să acționeze asupra oricărei legături esterice a trioleinei. Astfel, această enzimă a hidrolizat trioleina eliberând monoacilgliceroli, diacilgliceroli și acizi grași. Enzima a hidrolizat legăturile esterice ale dioleinei în pozițiile *sn-1* și *sn-3* și a catalizat esterificarea dioleinei în poziția *sn-2* (Figura 6.10).

Aceste caracteristici catalitice ale lipazei pot fi utilizate pentru controlul producerii compușilor intermediari în hidroliza trigliceridelor sau în sinteza esterilor acizilor grași.

Lipazele sintetizate de *P. fluorescens* sunt fie nespecifice, fie acționează preferențial față de pozițiile *sn-1,3* ale unei trigliceride. Cu toate acestea, Matori și colaboratorii (1991) au remarcat în studiile lor faptul că regiospecificitatea lipazică poate fi modificată în funcție de condițiile de reacție.

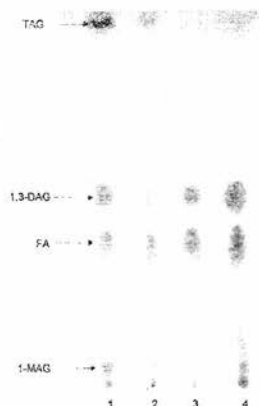


Figura 6.10 Analiza prin TLC a rezultatului reacțiilor catalizate de lipaza Pf-MP11 în vederea determinării regiospecificității. Linia 1, amestecul de lipide standard; Linia 2, hidroliza trioleinei; Linia 3, hidroliza 1,3 - dioleinei; Linia 4, esterificarea digliceridei 1,3 - dioleină cu acid oleic. TAG - gliceril trioleat; 1,3 - DAG - 1,3-dioleina; FA - acid oleic; 1 - MAG - 1-oleoil-monoleat.

Concluzii parțiale

Rezultatele reacțiilor de esterificare și transesterificare catalizate de preparatul enzimatic parțial purificat obținut cu tulpina selecționată *P. fluorescens* MP11 în vederea caracterizării specificității catalitice a enzimei au evidențiat preferința enzimei față de alcoolii primari în detrimentul celor secundari, aceasta fiind selectivă față de 1-propanol.

Lipaza Pf-MP11 nu a prezentat specificitate pozițională, acționând asupra tuturor legăturilor esterice ale trioleinei.

Enzima a manifestat selectivitate în reacțiile de esterificare a 1-pentanolului cu acizii grași saturați și a esterificat preferențial acizii cu catenă medie cu un maxim de activitate în cazul acidului tetradecanoic.

Preparatul lipolitic Pf-MP11, obținut în condițiile acestui studiu, conține urme de acizi grași, prezența acestor contaminanți afectând reacția de transesterificare, prin declanșarea unor reacții secundare, a căror efect major a fost hidroliza produsului primar al reacției.

Conținutul de apă din amestecul de reacție a avut un efect important asupra funcționalității lipazei Pf-MP11 în condițiile de reacție utilizate.

7. Analiza genomică comparativă a genei *lipPf-MP11*

Materiale și metode

Ca material de lucru s-a folosit ADN-ul genomic izolat din *P. fluorescens* MP11. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) a fost folosit ca organism de propagare a pCRII (Invitrogen) folosit ca vector de clonare. Secvențierea a fost realizată de firma BaseClear (Olanda).

Oligonucleotidele primer au fost create pe baza zonelor de omologie a secvențelor genelor responsabile de sinteza lipazelor (*lip*) sintetizate de tulpini de *P. fluorescens*. Pentru analiză, secvențele genelor omoloage au fost descărcate în format FASTA din baza de date UniProtKB și comparate prin metoda Clustal W folosind programul Lasergene - DNASTar (DNASTAR, Inc. SUA). Secvențele oligonucleotidelor primer folosite în studiu sunt prezentate în Tabelul 7.1.

Tabelul 7.1 Oligonucleotidele primer utilizate în studiu

Denumirea primerului	Secvență ^a (5' → 3')
LipFW1	ATGGGTRTMTTYGACTATAAAAAACCTC
LipRV1	GGCAAAGGCAACGACAGCATCCGCGAC
Lip-FW1-S	CACAACCTGGATAACGGCTTTGC
Lip-RV1-S	CCCCTGTTGTGCGGGATCGTGTC
Lip-FW1-L	CGGTACGGCGGAATCCAAGGCG
Lip-RV1-L	GGGTGTTGTTGCCCGAGCCGCC
AHK-FW	CAGTTTCAACGATCACTACGCCTC
AHK-RV	CGACGGCAACGACCTGATCCAG
GHPU-FW	CGGTATCAGCACAAACGGCTTCG
GHPU-RV	CCGGGGAACCTTCTACGGCGAG
Lip-64FW	CACATGGGTGTGTACGACTACAAAACCTC
Lip-64RV	GTGCGYAYGRRRATCGTGATCGCC
Lip-58FW	CACCATGGGRCTGTTMGATTACAAAAATG
Lip-58RV	CCTGTCGGCTTCAAGTTTCAAGTTTCGCCCG

^a Codurile nucleotidelor: R: A sau G; M: A sau C; Y: C sau T

Prima reacție de polimerizare în lanț (PCR) a permis amplificarea unui fragment din secvența țintă. Programul PCR utilizat în această etapă este prezentat în Tabelul 7.2.

Tabelul 7.2 Etapele și parametrii reacției de polimerizare

Etapa	Număr cicluri	Temperatura, °C	Durata
Denaturare inițială	1	94	4 min
Denaturare		94	30 s
Elongare	30	52	30 s
Atașarea primerilor la ADN-ul matriță			
Elongarea propriu-zisă		72	45 s
Elongare finală	1	72	10 min

Pentru obținerea regiunilor adiacente necunoscute ale zonei amplificate din gena codificatoare a lipazei Pf-MP11, s-a utilizat tehnica PCR invers (iPCR). Astfel, pentru fiecare capăt al secvenței cunoscute (gena de interes), s-a selectat câte un set de primeri, pentru reacția de PCR folosindu-se un primer antisens de la un capăt și primerul sens de la capătul opus al fragmentului de ADN dublu catenar secvențiat, elongarea având loc de la acest fragment spre exterior (Figura 7.4).

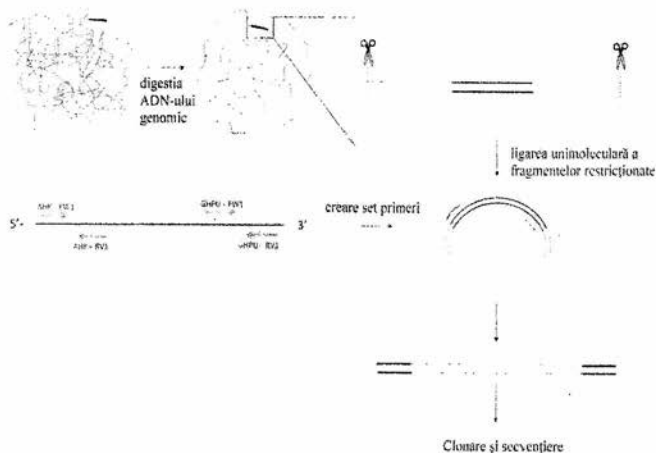


Figura 7.4 Reprezentarea schematizată a metodei de polimerizare inversă (iPCR). Figura a fost adaptată la studiul lipazei Pf-MP11 și ilustrează clivarea ADN-ului genomic, izolat din tulpina selecționată, cu endonucleaze de restricție, modul de selecție al primerilor utilizați în iPCR și felul în care este elongat fragmentul de interes circularizat cu obținerea finală a secvențelor de ADN necunoscute

Obținerea și caracterizarea unei lipaze bacteriene active la temperaturi scăzute

Enzimele folosite au fost *EcoRI*, *BamHI*, *BglII* și *XbaI* alese aleatoriu, dar care nu clivau în interiorul primului amplicon obținut.

Programul PCR folosit la reacția de polimerizare inversă este prezentat în Tabelul 7.3.

Prezența fragmentului de interes în produsul de PCR nou obținut a fost verificată cu metoda de hibridizare Southern *blotting* (Southern 1975).

Tabelul 7.3 Etapele și parametrii reacției de polimerizare inversă

Etapa	Număr cicluri	Temperatura (°C)	Durata
Denaturare inițială	1	94	45 s
Amplificarea inițială	10	Denaturare	15 s
		Atașarea primerilor la ADN-ul matrită	30 s
		Amplificarea propriu-zisă	4 min
Elongarea ampliconilor	20	Denaturare	15 s
		Atașarea primerilor la ADN-ul matrită	30 s
		Elongare	4 min +5 s/ciclu
Elonare finală	1	72	10 min

Rezultate și discuții

Amplificarea parțială a genei *lipPf-MP11*

Prin alinierea unor gene codificatoare de lipaze, ale căror secvențe sunt cunoscute (Figura 7.5) s-a realizat clasificarea acestora în patru grupuri pe baza maselor lor moleculare: 64 kDa, 50 kDa, 35 kDa și 33 kDa.

Secvențele celor patru grupuri alinate au prezentat omologie ridicată. S-au remarcat însă diferențe semnificative în cazul lipazelor cu masele moleculare de 35 kDa și 65 kDa. Pentru acestea au fost create câte un set de primeri degenerați.

Primul amplicon obținut a avut lungimea de aproximativ 1100 pb (Figura 7.6). Ampliconii obținuți în studiu au fost ligați la vectorul pCRII, clonat în celule de *E. coli* TOP10 și secvențiat. Secvența obținută a fost utilizată pentru selectarea a două seturi de

primeri pentru reacția inversă a polimerazei. Reacția de polimerizare inversă a condus la obținerea unui fragment cu lungimea de aproximativ 1500 pb.

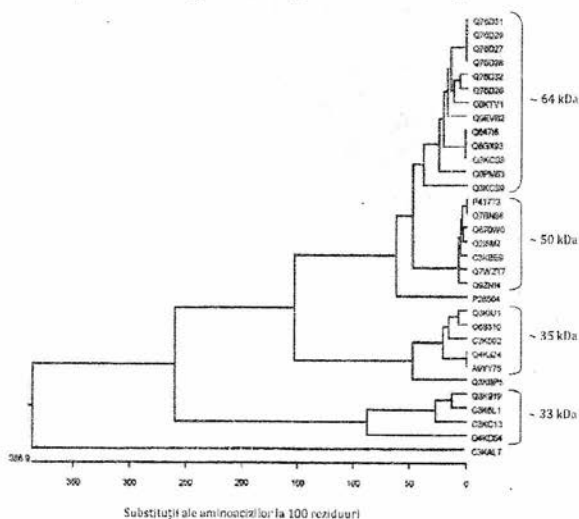


Figura 7.5 Analiza filogenetică pentru secvențele lipazelor produse de *Pseudomonas fluorescens*. Aliniamentul secvențelor s-a realizat prin metoda Clustal W folosind programul Lasergene DNASTar. Secvențele au fost preluate din baza de date UniProt. În dreapta figurii sunt indicate grupările de lipaze și masele moleculare corespunzătoare fiecărui grup.

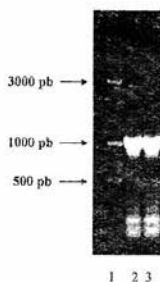


Figura 7.6 Electroforeza în gel de agaroză a ampliconilor rezultați cu primerii Lip-FW1-S și Lip RV1. Linia 1, amestecul ADN standard *ladder* GeneRuler; Liniile 2 și 3, produsul de PCR (1100 pb).

Ampliconul cu lungimea de 1,5 kpb a fost verificat prin metoda de hibridizare Southern, iar semnalul chemiluminiscent a confirmat prezența în fragmentul nou-format a secvenței inițiale (Figura 7.7).

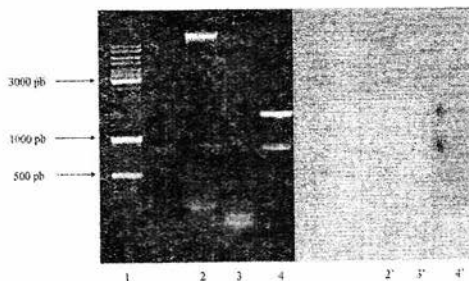


Figura 7.7 Analiza hibridizării Southern pentru ampliconul rezultat în urma reacției de polimerizare inversă a fragmentelor de ADN genomic, extras din tulpina sălbatică *Pseudomonas fluorescens* MP11. Figura ilustrează electroforeza în gel de agaroză a probelor utilizate în test (stânga) și rezultatul hibridizării (dreapta): Linia 1, amestecul ADN standard *ladder* GeneRuler; Liniile 2,2', ADN-ul genomic bacterian din Pf-MP11; Liniile 3,3', ADN-ul genomic bacterian din Pf-MP11 după clivarea acestuia cu endonucleazele de restricție; Liniile 4,4', ampliconul rezultat în urma reacției de polimerizare inversă cu primerii AHK-FW și GHPU-RV². Proba de hibridizare utilizată a fost fragmentul Lip-FW1→Lip-RV1-S (~1100 pb)

Fragmentele au fost comparate prin aliniere. Cei doi ampliconi au prezentat o suprapunere de numai 348 baze azotate în harta genică a alinierii fragmentelor secvenționate, care a totalizat 2388 baze. În urma analizei comparative de tip *Blast*, cei doi ampliconi au prezentat cel mai înalt grad de omologie cu sevența nucleotidică a genomului bacteriei *Pseudomonas fluorescens* Pf-01 (Silby et al. 2009) (Figura 7.8).

În harta genică a Pf-01 se remarcă prezența a două gene lipazice alăturate, de 1702 pb și 1867 pb respectiv. Aceste secvențe împreună cu zonele adiacente au fost descărcate de pe UniProt KB și aliniat pentru comparație cu fragmentele *lip*Pf-MP11 secvențiate. Rezultatul a indicat că ampliconii Pf-MP11 sunt fragmente din două regiuni subsecvente în genomul bacterian Pf-MP11, care codifică sinteza a două lipaze.

² Fragmentul cu lungimea de aproximativ 800 pb este un subprodus al fragmentului AHK-FW→GHPU rezultat în urma electroforezei în gel de agaroză

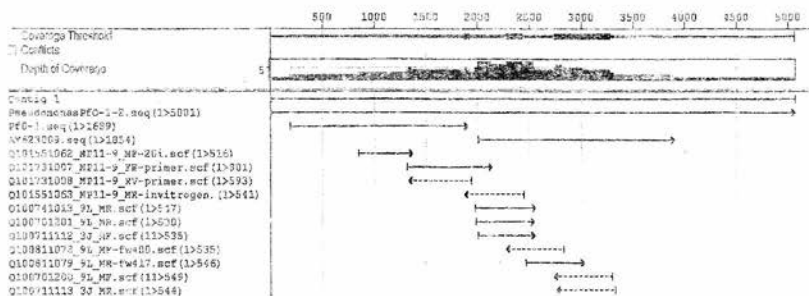


Figura 7.8 Compararea secvențelor ampliconilor Pf-MP11 cu secvența genomică a tulpinii PF-01. Aceasta din urmă cuprinde secvențele celor două lipaze ale căror mase moleculare corespund valorilor 58 kDa (PF-01) și 64 kDa (AY623009)

Determinarea secvențelor lipazelor codificate în genomul tulpinii Pf-MP11 și analiza acestora

Pentru cele două secvențe, care codifică parțial genele lipazelor Pf-MP11, s-a realizat o nouă analiză filogenetică. Rezultatul acesteia a confirmat apartenența lipazelor Pf-MP11 la grupuri de gene codificatoare ale unor lipaze cu masele moleculare de 58 kDa și 64 kDa respectiv (Figura 7.9).

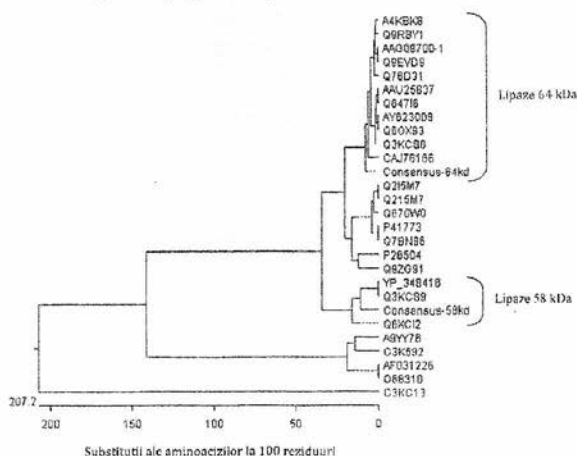


Figura 7.9 Analiza filogenetică pentru secvențele de nucleotide ale genelor codificatoare ale lipazelor. Aliniamentul secvențelor s-a realizat prin metoda Clustal W, folosind programul Lasergene DNASTar. Secvențele au fost preluate din baza de date UniProt KB. În dreapta figurii sunt indicate masele moleculare corespunzătoare grupurilor de apartenență ale lipazelor Pf-MP11 (Consensus-64 kd/58 kd)

Ulterior acestei analize filogenetice, pe baza omologiei secvențelor aliniată, a fost creat un nou set de primeri degenerați corespunzători genelor codificatoare ale lipazelor de 58 kDa și 64 kDa. Amplificarea fragmentului țintă a fost realizată prin utilizarea tehnicii *touchdown* PCR.

Fragmentul obținut cu primerii Lip-58FW și Lip-58RV cu o lungime de aproximativ 1800 pb (Figura 7.10) a fost clonat și secvențiat.

Secvența genică corespunzătoare lipazei de 64 kDa nu a putut fi amplificată cu ajutorul primerilor special creați. Gena *lip*Pf-MP11-64 a fost ulterior secvenționată de către BaseClear, direct din ADN-ul genomic al tulpinii Pf-MP11 utilizând metoda Sanger (Sanger et al. 1977). Acestora li s-au pus la dispoziție tulpina de tip sălbatic *Pseudomonas fluorescens* MP11 și o oligonucleotidă primer pentru amplificare. Fragmentele secvențiate au fost aliniată și analizate. Pentru fiecare contiguu s-au găsit cadre de citire (prezența codonilor START și STOP) care au indicat secvențierea completă a genelor lipazice. Ulterior s-au realizat alinieri de tip *Blast* pentru obținerea celor două aliniamente comparative ale lipazelor LipPf-MP11-58 și LipPf-MP11-64 (Figurile 7.11 și 7.12).

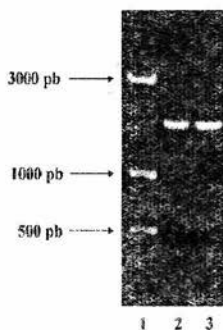


Figura 7.10 Electroforeza în gel de agaroză a ampliconilor rezultați cu primerii degenerați Lip-58FW/RV. Linia 1, amestecul ADN standard *ladder* GeneRuler; Liniiile 2 și 3, produsul de PCR (1750 pb)

Cele două lipaze codificate de tulpina *P. fluorescens* MP11 sunt proteine ale căror structuri primare sunt formate din 561 și 610 reziduuri de aminoacizi. Masele moleculare calculate ale celor două lipaze sunt 59 kDa și 64,5 kDa respectiv, caracteristică care le-a permis încadrarea în subfamilia I.3 a lipazelor.

Obținerea și caracterizarea unei lipaze bacteriene active la temperaturi scăzute

1	SGLLDRENQSGSEASPTTYDUEIRFDDMAVYVYDQAEFVTDQATVYQATALGSGDQVQVQDQSE	21	Q6KCI1
2	NRLFLITAA---ADNRKRYGQAIAAGGKFAKQVPTQDAIPQDQKQKQKQATALGSLQKQKQVQKQ	27	B1PF33
1	IKLLDLEKLNQGGASQVATVSDATVQ	60	Q58 kDa
1	MGVLRKPKKLAGKQVQ	58	B1PF33
	:		
81	EFQKELGHTQVQ	110	Q6KCI1
81	FPEKNGEYQVQ	117	B1PF33
81	FNSEKELGHTQVQ	118	Q58 kDa
80	FEFQKQVQ	118	B1PF33
	:		
101	KQVYAKKADITLILNVAALATVQ	160	Q6KCI1
118	ATQVAKKADITLILNVAALATVQ	177	B1PF33
120	AKVYAKKADITLILNVAALATVQ	178	Q58 kDa
120	KAVYAKKADITLILNVAALATVQ	179	B1PF33
	*:**		
181	NVVAQASQVQ	240	Q6KCI1
178	NVVEQASQVQ	237	B1PF33
178	NVVAQASQVQ	237	Q58 kDa
178	NVVAQASQVQ	238	B1PF33
	*:**~*		
241	HYKSTFQVQ	310	Q6KCI1
238	NVVAQASQVQ	297	B1PF33
238	HYKSTFQVQ	297	Q58 kDa
238	HYKSTFQVQ	310	B1PF33
	::*:*~*		
301	GTVVQ	360	Q6KCI1
298	GTVVQ	357	B1PF33
298	GTVVQ	358	Q58 kDa
298	GTVVQ	359	B1PF33
	::*:*~*		
361	FQGNVQ	418	Q6KCI1
358	FQGNVQ	415	B1PF33
357	FQGNVQ	418	Q58 kDa
358	FQGNVQ	418	B1PF33
	::*:*~*		
419	YQVQ	478	Q6KCI1
418	YQVQ	475	B1PF33
418	YQVQ	478	Q58 kDa
418	YQVQ	478	B1PF33
	::*:*~*		
479	AGVQ	538	Q6KCI1
476	AGVQ	534	B1PF33
476	AGVQ	534	Q58 kDa
478	AGVQ	538	B1PF33
	::*:*~*		
519	IVKIKQVQ	568	Q6KCI1
518	IVKIKQVQ	562	Q6KCI1
518	IVKIKQVQ	561	Q58 kDa
518	IVKIKQVQ	568	B1PF33
	::*:*~*		

Figura 7.11 Aliniamentul comparativ al secvenței de aminoacizi a lipazei cu masa moleculară aproximată ca fiind de 58 kDa sintetizată de *P. fluorescens* MP11 cu alte lipaze produse de tulpini de *P. fluorescens*. Secvențele complete ale aminoacizilor lipazelor din *P. fluorescens* MP11 (Q58 kDa), o bacterie necultivată (Q6XC13), *P. fluorescens* PF-01 (Q3KCS9), *Pseudomonas* sp. lip35 (B1PF33) au fost alinate adăugându-se spații acolo unde a fost nevoie pentru obține gradul maxim de identitate. Aminoacizii identici, în anumite poziții ale secvențelor analizate, sunt marcate cu asterix. Numerele (stânga) se referă la pozițiile aminoacizilor

Obținerea și caracterizarea unei lipaze bacteriene active la temperaturi scăzute

1	MSVYAMQKGGTACSKALKSDPAAKIDDFDSENNRLLDTEAVQCHGKGGVITLALVYVTEIDGG	60	Q6GX93
1	MSVYVYVDFVDFDFAKSDQKIDFSAQAIFKCYGKHRLNDFDFAVGYGHDGSHFDFATLITALLGG	60	Q3KCR8
1	MCVYVYVDFVDFDFAKSDQKIDFSAQAIFKCYGKHRLNDFDFAVGYGHDGSHFDFATLITALLGG	60	Q3EVU8
1	MSVYVYVDFVDFDFAKSDQKIDFSAQAIFKCYGKHRLNDFDFAVGYGHDGSHFDFATLITALLGG	60	Q2MFB3
1	MSVYVYVDFVDFDFAKSDQKIDFSAQAIFKCYGKHRLNDFDFAVGYGHDGSHFDFATLITALLGG	60	Q64kb
61	TEEQDQVDFGLVHFFRERKALDLYEKKAQADPITLAQDGVEDMTDARGGTFEGKAKNTDSD	120	Q6GX93
61	TEEQDQVDFGLVHFFRERKALDLYEKKAQADPITLAQDGVEDMTDARGGTFEGKAKNTDSD	120	Q3KCR8
61	TEEQDQVDFGLVHFFRERKALDLYEKKAQADPITLAQDGVEDMTDARGGTFEGKAKNTDSD	120	Q3EVU8
61	TEEQDQVDFGLVHFFRERKALDLYEKKAQADPITLAQDGVEDMTDARGGTFEGKAKNTDSD	120	Q2MFB3
61	TEEQDQVDFGLVHFFRERKALDLYEKKAQADPITLAQDGVEDMTDARGGTFEGKAKNTDSD	120	Q64kb
121	VEFLGKIDGSDGHTLFLKFAKSGRERKIDGGLGKLDVNDLIDRAFGVDFRRIYVGEAF	180	Q6GX93
121	VEFLGKIDGSDGHTLFLKFAKSGRERKIDGGLGKLDVNDLIDRAFGVDFRRIYVGEAF	180	Q3KCR8
121	VEFLGKIDGSDGHTLFLKFAKSGRERKIDGGLGKLDVNDLIDRAFGVDFRRIYVGEAF	180	Q3EVU8
121	VEFLGKIDGSDGHTLFLKFAKSGRERKIDGGLGKLDVNDLIDRAFGVDFRRIYVGEAF	180	Q2MFB3
121	VEFLGKIDGSDGHTLFLKFAKSGRERKIDGGLGKLDVNDLIDRAFGVDFRRIYVGEAF	180	Q64kb
191	GRNDVAVAFKANGLSRKLVDYFSRSTDFGAVNDRDSTSRHSIFPODSNIIAVAVDF	240	Q6GX93
181	GRNDVAVAFKANGLSRKLVDYFSRSTDFGAVNDRDSTSRHSIFPODSNIIAVAVDF	240	Q3KCR8
181	GRNDVAVAFKANGLSRKLVDYFSRSTDFGAVNDRDSTSRHSIFPODSNIIAVAVDF	240	Q3EVU8
181	GRNDVAVAFKANGLSRKLVDYFSRSTDFGAVNDRDSTSRHSIFPODSNIIAVAVDF	240	Q2MFB3
179	GRNDVAVAFKANGLSRKLVDYFSRSTDFGAVNDRDSTSRHSIFPODSNIIAVAVDF	238	Q64kb
241	QSEIYVLYVDFENLDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	300	Q6GX93
241	QSEIYVLYVDFENLDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	300	Q3KCR8
241	QSEIYVLYVDFENLDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	300	Q3EVU8
241	QSEIYVLYVDFENLDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	300	Q2MFB3
239	QSEIYVLYVDFENLDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	297	Q64kb
301	PESEVYVDFVDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	360	Q6GX93
301	PESEVYVDFVDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	360	Q3KCR8
301	PESEVYVDFVDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	360	Q3EVU8
301	PESEVYVDFVDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	360	Q2MFB3
298	PESEVYVDFVDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	358	Q64kb
361	NAETIKGTFEITGSDNHLFQKSGRMMVDFRACDQTERDGFENILGGSGNHLVLESDT	420	Q6GX93
361	NAETIKGTFEITGSDNHLFQKSGRMMVDFRACDQTERDGFENILGGSGNHLVLESDT	420	Q3KCR8
361	NAETIKGTFEITGSDNHLFQKSGRMMVDFRACDQTERDGFENILGGSGNHLVLESDT	420	Q3EVU8
361	NAETIKGTFEITGSDNHLFQKSGRMMVDFRACDQTERDGFENILGGSGNHLVLESDT	420	Q2MFB3
357	NAETIKGTFEITGSDNHLFQKSGRMMVDFRACDQTERDGFENILGGSGNHLVLESDT	418	Q64kb
421	SWKQDFVDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	480	Q6GX93
421	SWKQDFVDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	480	Q3KCR8
421	SWKQDFVDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	480	Q3EVU8
421	SWKQDFVDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	480	Q2MFB3
416	SWKQDFVDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	476	Q64kb
481	SNVDFVDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	540	Q6GX93
481	SNVDFVDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	540	Q3KCR8
481	SNVDFVDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	540	Q3EVU8
481	SNVDFVDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	540	Q2MFB3
478	SNVDFVDFVFAKSDSTFGASLGVHAKPKESQDQKIVSENNKASARINVL	538	Q64kb
541	GADTSEKSGAKKSGRMMVDFRACDQTERDGFENILGGSGNHLVLESDT	600	Q6GX93
541	GADTSEKSGAKKSGRMMVDFRACDQTERDGFENILGGSGNHLVLESDT	600	Q3KCR8
541	GADTSEKSGAKKSGRMMVDFRACDQTERDGFENILGGSGNHLVLESDT	600	Q3EVU8
541	GADTSEKSGAKKSGRMMVDFRACDQTERDGFENILGGSGNHLVLESDT	600	Q2MFB3
538	GADTSEKSGAKKSGRMMVDFRACDQTERDGFENILGGSGNHLVLESDT	598	Q64kb
61	EVVVAENSESSADEVFA	617	Q6GX93
61	EVVVAENSESSADEVFA	617	Q3KCR8
61	EVVVAENSESSADEVFA	617	Q3EVU8
61	EVVVAENSESSADEVFA	617	Q2MFB3
61	EVVVAENSESSADEVFA	617	Q64kb

Figura 7.12 Aliniamentul comparativ al secvenței de aminoacizi a lipazei de 64 kDa sintetizată de *P. fluorescens* MP11 cu alte lipaze sintetizate de tulpini de *Pseudomonas* spp. Secvențele complete ale aminoacizilor lipazelor din *P. fluorescens* MP11 (Q64 kDa), *Pseudomonas* sp. 7323 (Q2KTB 3), *Pseudomonas* sp. UB48 (Q9EVD 8), *P. fluorescens* Pf-01 (Q3KCS 8), *P. fluorescens* B52 (Q6GX 9 3) au fost aliate adăugându-se spații acolo unde a fost nevoie pentru obține gradul maxim de identitate. Aminoacizii identici, în anumite poziții ale secvențelor analizate, sunt marcate cu asterix. Numerele (stânga) se referă la pozițiile aminoacizilor

Secvența nucleotidică a genei care codifică sinteza lipazei cu masa moleculară de 64 kDa prezintă la capătul 3' o omologie foarte mică cu secvențele considerate în analiza filogenetică, în funcție de care au fost aleși primerii pentru reacția PCR, explicându-se în acest fel imposibilitatea de amplificare a genei *lipPf-MP11-64* cu oligonucleotidele primer selecționate, și anume Lip-64FW/RV.

Concluzii parțiale

Procedeele de izolare și amplificare a genei lipazei Pf-MP11 din genomul tulpinii producătoare au permis identificarea a două gene codificatoare de lipaze, adiacente.

Cele două gene au fost amplificate, clonate și secvențiate, iar secvențele nucleotidice rezultate au corespuns unor cadre de citire deschise de 1683 pb și 1830 pb, corespunzătoare unor lipaze cu masele moleculare de aproximativ 59 kDa și respectiv 64,5 kDa.

Aliniamentul de tip *Blast* a prezentat o omologie a lipazelor Pf-MP11 de maxim 88 % cu secvențe din bazele de date existente și diferențe semnificative, ceea ce denotă probabilitatea ca lipazele Pf-MP11 să fie lipaze noi, care să nu mai fi fost studiate și caracterizate.

CONCLUZII FINALE

Studiile incluse în teza de doctorat intitulată *Obținerea și caracterizarea unei lipaze bacteriene active la temperaturi scăzute* contribuie la o mai bună cunoaștere a unor particularități ale enzimelor din categoria acilhidrolazelor legate de izolarea și selecția bacteriilor activ producătoare de lipaze, condițiile de producere și purificare. Aceste elemente ajută la înțelegerea comportamentului catalitic și a structurii acestor enzime prin expunerea rezultatelor obținute în urma efectuării cercetărilor asupra unei noi lipaze active la temperaturi scăzute, cercetări care evidențiază elemente originale cu impact în cercetarea fundamentală și aplicativă a lipazelor, și în general a hidrolazelor obținute din surse psihrotrofe.

Pe baza concluziilor parțiale prezentate la finalul fiecărui capitol din cadrul studiului experimental, este reliefată sumativ o serie de concluzii generale, după cum urmează:

- ◆ Din probe de sol prelevate din zone montane autohtone, caracterizate de un climat alpin (Mții. Bucegi, România) au fost izolate și selecționate 36 tulpini de bacterii psihrotrofe, dintre care trei tulpini codificate MP11, MP3 și M61 s-au dovedit a fi activ producătoare de enzime lipolitice. Cele trei tulpini selecționate au fost caracterizate din punct de vedere morfologic și biochimic și clasificate în genul *Pseudomonas*.
- ◆ Tulpina selecționată *Pseudomonas fluorescens* MP11 (Pf-MP11), cu cel mai ridicat potențial de sinteză a enzimelor lipolitice active la temperaturi scăzute, este o bacterie psihrotrofă izolată din sol prelevat de pe Vârful Omu (~2500 m), Munții Bucegi, România.
- ◆ Producerea enzimelor lipolitice cu tulpina Pf-MP11 în sistem submers este condiționată de temperatura de cultivare, sinteza acestora fiind favorizată la temperaturi de cultivare mai mici decât temperatura optimă de creștere a tulpinii producătoare (20 °C), și a fost inhibată de producerea simultană a proteazelor, a căror acțiune a influențat negativ stabilitatea și funcționalitatea lipazelor în extractele enzimatiche brute.
- ◆ Lipazele au fost separate din extractul cultural prin precipitare cu sulfat de amoniu și purificate prin cromatografie de excludere moleculară, obținându-se un grad de purificare de 4,4. În timpul precipitării, enzimele lipolitice au manifestat o tendință de aglomerare formând agregate proteice cu mase moleculare variate cu valori de sute de kDa. În ciuda unei ușoare inactivări cauzate de aglomerarea lipazelor, preparatul lipolitic a prezentat stabilitate ridicată la temperatura de 4 °C timp de până la 12 luni.
- ◆ Preparatul lipolitic Pf-MP11 este activ la temperaturi cuprinse între 0 – 55 °C, la pH alcalin și prezintă activitate maximă la temperatura de 40 °C și pH 8,5.
- ◆ Lipaza catalizează preferențial reacții ale alcoolilor primari față de alcoolii secundari, iar viteza maximă de reacție s-a înregistrat în reacțiile de transesterificare a pentanolului.
- ◆ Preparatul lipolitic Pf-MP11 nu prezintă regioselectivitate, dar manifestă o tendință stereospecifică față de enantiomerii *R* ai unor esteri acetici. Enzima și-a schimbat selectivitatea față de lungimea catenei de carbon a acizilor grași în funcție de mediul de reacție. Aceasta a catalizat preferențial esterii acizilor

decanoic, dodecanoic și tetradecanoic în *n*-hexan și esterii acizilor ocanoic, decanoic și dodecanoic în soluție apoasă.

- ◆ Studiile de secvențiere a genei codificatoare a lipazei studiate au evidențiat existența, în genomul tulpinii *Pseudomonas fluorescens* MP11, a două gene succesive ale căror secvențe nucleotidice transpuse în aminocizi corespund unor lipaze cu masele moleculare de 59 kDa și respectiv 64,5 kDa. Analiza comparativă a secvențelor celor două enzime a sugerat faptul că enzimele LipPf-MP11 sunt lipaze noi, care au fost prima dată studiate în cadrul acestei lucrări.

În final, se apreciază că teza de doctorat contribuie la o mai bună înțelegere a acestui tip de enzime prin identificarea a două lipaze bacteriene noi, dintre care cel puțin una este activă la temperaturi scăzute, și al căror studiu preliminar a evidențiat potențialul pe care îl pot avea cele două enzime în industrie. Din acest motiv, este imperativă aprofundarea cunoașterii celor două enzime, atât la nivel molecular, în relațiile substrat-mecanism de acțiune și condiții de reacție-selectivitate catalitică, cât și la nivel aplicativ în vederea exploatării comportamentului catalitic în sisteme de reacție complexe pentru obținerea unor beneficii tehnologice și economice.

CONTRIBUȚII LA DEZVOLTAREA CUNOȘTERII ÎN DOMENIU ȘI PERSPECTIVE

Teza de doctorat intitulată *Obținerea și caracterizarea unei lipaze bacteriene active la temperaturi scăzute* reprezintă un studiu de biotehnologie care urmează cursul clasic pe care îl presupune obținerea și caracterizarea unei noi enzime active la temperaturi scăzute, având ca sursă de izolare soluri din biotopul alpin autohton respectiv Vf. Omu și aduce elemente de noutate pentru dezvoltarea cunoașterii în toate domeniile pe care le abordează, prin particularitățile catalitice ale enzimei studiate și aplicațiile practice în care aceasta ar putea fi folosită.

Contribuțiile originale ale tezei de doctorat pot fi sintetizate după cum urmează:

- ◆ S-au avut în vedere studiul microorganismelor psihrofile ca agenți producători de enzime, o abordare modernă în acord cu cercetările realizate în acest domeniu, la nivel internațional, corelat cu numărul modest de studii, ale căror tatonări în România au fost recent realizate.
- ◆ Trei tulpini de bacterii identificate ca aparținând speciei *Pseudomonas fluorescens* au fost izolate din soluri prelevate din zona Munților Carpați din arealul românesc, au fost selecționate ca tulpini psihrotrofe producătoare de enzime active la temperaturi scăzute. Se atrage astfel atenția asupra potențialului ridicat al biotopurilor de pe teritoriul României, ca surse de izolare a microorganismelor adaptate la frig.
- ◆ A fost studiat un preparat lipolitic activ la temperaturi scăzute din perspectiva obținerii și caracterizării proprietăților catalitice, studiul reliefând tendința de aglomerare a lipazelor în anumite condiții de purificare. Formarea agregatelor proteice cu mase moleculare foarte mari reprezintă un subiect de noutate în studiul lipazelor, la nivel internațional, fiind prezentate un număr foarte mic de descoperiri în acest sens.
- ◆ Studiul genomic al tulpinii selecționate *P. fluorescens* MP11 (Pf-MP11) a permis identificarea și secvențierea a două gene codificatoare de lipaze, situate adiacent în ADN-ul genomic. Secvențele celor două enzime nu sunt cunoscute ceea ce denotă că enzimele codificate în genomul tulpinii Pf-MP11 sunt noi, și nu au mai fost studiate la nivel internațional. În plus, lipazele care au prezentat omologie ridicată cu lipazele Pf-MP11 nu au fost caracterizate din punct de vedere catalitic, oferind celor anterior menționate avantajul întâietății.

Ținând cont de cele mai sus prezentate, se recomandă ca strategii viitoare:

- ◆ Continuarea studiilor de caracterizare a tulpinii Pf-MP11 în vederea stabilirii potențialului de sinteză a altor enzime cu interes economic deosebit.
- ◆ Optimizarea metodei de obținere a preparatului lipolitic Pf-MP11 cu un grad de purificare ridicată în vederea eliminării complete a substanțelor de contaminare și utilizarea acestuia în procese de simulare a aplicațiilor industriale;
- ◆ Clonarea și exprimarea celor două gene *lip*Pf-MP11 în vederea caracterizării lipazelor codificate de acestea și atribuirea uneia dintre cele două, proprietățile

Obținerea și caracterizarea unei lipaze bacteriene active la temperaturi scăzute

termo-catalitice și tipo- sau stereospecifice ale preparatului lipolitic Pf-MP11 studiat;

DISEMINAREA REZULTATELOR CERCETĂRII

Rezultatele cercetărilor desfășurate în cadrul tezei de doctorat au fost prezentate pentru diseminare în două articole (unul publicat și unul în curs de publicare) și două comunicări la manifestări științifice reprezentative pentru domeniul abordat, după cum urmează:

A. Publicație în revistă cotate ISI:

Svetlana Laura Leonov, Lambertus van den Broek, Jan Springer, Francis Péter, Gabriela Bahrim, Carmen Boeriu, 2011, Identification of a cold-active lipase from soil isolate *Pseudomonas fluorescens* MP11, în recenzie la *Biotechnology Letters*

B. Publicație în revistă indexată în baze de date internaționale:

Svetlana Laura Leonov, 2010, Screening for novel cold-active lipases from wild type bacteria isolates, *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 6 (3) 12-17

C. Comunicări științifice semnificative susținute la conferințe din țară și străinătate:

S.L. Leonov, L.A.M. van den Broek, J. Springer, G. Bahrim, C.G. Boeriu. The characterization of a novel cold-active lipase from a soil isolate identified as *Pseudomonas fluorescens*, 2010, International Conference on Chemistry and Chemical Engineering, Timisoara, România

S.L. Leonov, L.A.M. van den Broek, J. Springer, G. Bahrim, C.G. Boeriu, 2010, Purification and characterization of an extracellular cold-active lipase from a soil isolate identified as *Pseudomonas fluorescens*, Netherlands Biotechnology Congress-13, Ede, Olanda

O parte a rezultatelor obținute în cadrul acestor cercetări nu au fost publicate datorită necesității aprofundării studiilor, în special a celor de biologie moleculară. De îndată ce acestea vor fi finalizate, rezultatele vor fi publicate, rezultând cel puțin o lucrare într-o revistă cotate ISI.

Referințe bibliografice

- Arpigny JL, Jaeger KE (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* 343: 177-183
- Cai X-Q, Chen Z-C, Wang N, Lin X-F (2006) A Facile Method for Preparation of Polymerizable, Optically Active Ketoprofen Prodrug by Irreversible Lipase-catalysed Resolution. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 723-727.
- Dieckelmann M, Johnson LA, Beacham IR (1998) The diversity of lipases from psychrotrophic strains of *Pseudomonas*: a novel lipase from a highly lipolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. *J Appl Microbiol* 85: 527-536
- Doležalová M, Janiš R, Svobodová H, Kašpárková V, Humpolíček P, Krejčí J (2010) Antimicrobial properties of 1-monoacylglycerols prepared from undecanoic (C11:0) and undecenoic (C11:1) acid. *Eur J Lipid Sci Tech* 112: 1106-1114
- Duijff BJ, Gianinazzi Pearson V, Lemanceau P (1997) Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytol* 135: 325-334.
- Fitch-Haumann B (1984) Confectionery fats-for special uses. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 61: 468-470.
- Hernández I, de Renobales M, Virto M, Pérez-Elortondo FJ, Barron LJR, Flanagan C, Albisu M (2005) Assessment of industrial lipases for flavour development in commercial Idiazabal (ewe's raw milk) cheese. *Enzyme Microb Tech* 36: 870-879
- Kim HR, Kim IH, Hou CT, Kwon KI, Shin BS (2010) Production of a novel cold-active lipase from *Pichia lynferdii* Y-7723. *J Agric Food Chem* 58: 1322-1326
- Kojima Y, Kobayashi M, Shimizu S (2003) A novel lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380: Gene cloning, overproduction, renaturation-activation, two-step purification, and characterization. *J Biosci Bioeng* 96: 242-249
- Kojima Y, Yokoe M, Mase T (1994) Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 58: 1564-1568
- Liou Y-C, Marangoni AG, Yada RY (1998) Aggregation behavior of *Candida rugosa* lipase. *Food Res Int* 31: 243-248
- Luo Y, Zheng YT, Jiang ZB, Ma YS, Wei DX (2006) A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification. *Appl Microbiol Biot* 73: 349-355.
- Machado ACO, da Silva AAT, Borges CP, Simas ABC, Freire DMG (2011) Kinetic resolution of (*R,S*)-1,2-isopropylidene glycerol (solketal) ester derivatives by lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 69: 42-46.
- Malcata FX (1992) Starting D-optimal designs for batch kinetics studies of enzyme-catalyzed reactions in the presence of enzyme deactivation. *Biometrics* 48: 929-938.
- Matori M, Asahara T, Ota Y (1991) Reaction conditions influencing positional specificity index (PSI) of microbial lipases. *J Ferment Bioeng* 72: 413-415.

- Parkin, KL (2003) Putting Kinetic Principles into Practice. Enzyme Kinetics, John Wiley & Sons, Inc, pp 174 – 192
- Rajmohan S, Dodd CE, Waites WM (2002) Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. J Appl Microbiol 93: 205-213.
- Rashid N, Shimada Y, Ezaki S, Atomi H, Imanaka T (2001) Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp strain KB700A. App and Environ Microbiol 67: 4064-4069
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences 74: 5463-5467.
- Shimada Y, Maruyama K, Nakamura M, Nakayama S, Sugihara A, Tominaga Y (1995) Selective hydrolysis of polyunsaturated fatty acid-containing oil with *Geotrichum candidum* lipase. J Am Oil Chem Soc 72: 1577-1581
- Silby M, et al (2009) Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. Genome Biology 10: R51.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology 98: 503-517.
- Tenore R, Galante JH (2005) Medium-Chain Triglycerides. Handbook of Functional Lipids, CRC Press, pp 177 – 183
- Utsugi A, Kanda A, Hara S (2009) Lipase Specificity in the Transacylation of Triacylglycerin. J Oleo Sci 58: 123-132
- Winkler UK, Stuckmann M (1979) Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. J Bacteriol 138: 663-670.
- Ye J, Zhao M, Liu J, Liu W (2010) Enantioselectivity in environmental risk assessment of modern chiral pesticides. Environmental Pollution 158: 2371-2383.

