

Proiectul **Imbogatirea continutului de silimarina al uleiului de armurariu presat la rece prin valorificarea deseurilor vegetale - SYMPLUS**

Contract: 356PED/2020

Codul proiectului: PN-III-P2-2.1-PED-2019-2461

Raport stiintific Etapa 2/2021

Obiectiv 2: Fractionarea acizilor grasi din ulei de armurariu si obtinerea silibinei din srotul de armurariu, obtinerea si caracterizarea enzimei in solutie si imobilizate, si dezvoltarea procesului de transesterificare cu utilizarea lipazei adaptata la temperaturi scazute

2.1. Obtinerea fractiilor de acizi grasi din ulei de armurariu

Obtinerea fractiilor componente ale uleiului de armurariu s-a realizat utilizand metoda HPLC-DAD/RID pe baza cromatogramei probei de ulei (Figura 1).

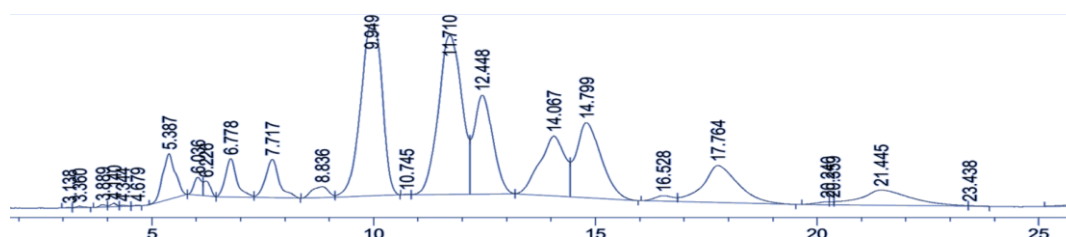


Figura 1. Cromatograma HPLC a uleiului de armurariu

Separarea cromatografica a componentelor probei s-a efectuat intr-un sistem caracterizat de urmatoorii parametri experimentali: coloana Poroshell 120 EC-C18, faza mobile ACN:acetone = 41:59 (v/v), 25 μ L volum de injectare, 1 mL/min viteza fluxului prin sistem. Elutia componentelor probei din coloana cromatografica a fost initial urmarita pentru o perioada de 30 min. Identificarea fractiilor obtinute s-a realizat in baza informatiilor provenite din date de literature. Astfel, cromatograma obtinuta a fost divizata in functie de timpul de retentie in trei zone corespunzatoare urmatoarelor fractii: trigliceride pentru 10-25 min, digliceride pentru 7-10 min si monogliceride impreuna cu acizi grasi pentru 5-7 min. fiecare fractie a fost colectata separat. A fost calculata ponderea fiecărei fractii in proba initiala – aprox. 80 % trigliceride. S-au identificat resturile de acizi grasi prezenti in proba in functie de timpii de retentie corespunzatori. Astfel, proba de ulei de armurariu analizata contine urmatoorii acizi grasi: acid oleic, acid linoleic, acid stearic si acid palmitic in proportie de 4:12:1:1.

2.2 Clonarea, expresia si purificarea lipazei microbiene active la temperaturi scazute

2.2.1 Testare tulpini bacteriene psihrofile si psihrotolerante din gheata din pestera Scarisoara

În urma analizei biochimice API ZYM a tulpinilor bacteriene psihrofile izolate din peștera Scărișoara s-a evidențiat un număr limitat de specii care pot hidroliza substratul lipidic specific C14 (Paun VI, Lavin P, Chifiriuc MC, Purcarea C (2021) Sci Rep. 11, 514). Activitatea lipolitică a tulpinilor active (7) a fost testată pentru hidroliza uleiurilor vegetale (ulei de masline, ulei de sămburi de struguri si ulei de armurariu) la 15°C si 25°C pe mediu de cultura Muller-Hinton solid îmbogățit cu ulei natural în concentrație de 1% și rodamină B 0,001% drept indicator de fluorescență. În urma incubării timp de 3 si 7 zile s-a evidențiat hidroliza uleiului de armurariu după 7 zile în cazul tulpinilor *Psychrobacter* sp., *Microbacterium* si *Brevundimonas* cultivate atât la 15°C si la 25°C în cazul *Pseudoarthrobacter* sp. (Tabelul 1).

Tabel 1. Activitate lipolitică a bacteriilor izolate din gheata

	ulei măsline				ulei sămburi de struguri				ulei armurariu			
	15°C		25°C		15°C		25°C		15°C		25°C	
Nume tulpină	3zile	7zile	3zile	7zile	3zile	7zile	3zile	7zile	3zile	7zile	3zile	7zile
<i>Psychrobacter</i> sp. (martor)		+	+	+		+		+		+		
<i>Microbacterium</i> sp.		+		+		+		+		+		
<i>Pseudoarthrobacter</i> sp.								+				+
<i>Bacillus</i> sp.												
<i>Brevundimonas</i> sp.		+		+		+		+		+		
<i>Pseudomonas</i> sp.		+										
<i>Arthrobacter</i> sp.		+										

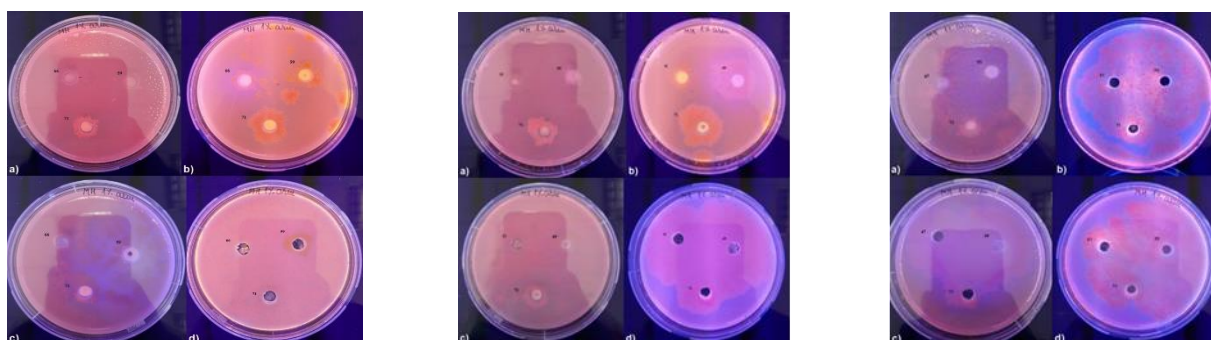


Figura 2. Activitatea lipolitică asupra uleiului de armurariu a tulpinilor (A) *Pseudoarthrobacter* sp. (66), *Microbacterium* sp. (59), *Psychrobacter* sp. (71); (B) *Brevundimonas* sp. (11), *Bacillus* sp. (49), *Psychrobacter* sp. (71); (C) *Arthrobacter* sp. (47), *Pseudomonas* sp. (55), *Psychrobacter* sp. (71); a) 15°C, 3 zile de incubare, b) 15°C, 7 zile de incubare, c) 25°C, 3 zile de incubare, d) 25°C, 7 zile de incubare

2.2.2 Clonarea, expresia si purificarea lipazei recombinante PSL2 din tulpina bacteriana Psychrobacter sp. SC65A.3

Pe baza rezultatelor activitatii lipazice asupra uleiului de armurariu ale tulpinilor bacteriene din gheata de peștera din Scarisoara si al determinarii secventei genomice a tulpinii *Psychrobacter* sp. SC65A.3 s-a identificat gena *lip2* care codifica enzima potentiala **PSL2**. Secventa nucleotidica a genei *lip2* (1449 bp) a fost clonata in vectorul de expresie pHAT2 utilizand situsurile de restrictie *NcoI/BamHI*

Secventa nucleotidica lip2

```
ttttCCATGGCTAACTCAACAGTACTATCAGTCAACACCTTACTCAATAAAGCGGTGAAGACCCTAAATCTTATGTCATTTGGACAAGATA  
AGAACCCCAAAAGCACTGATATCAATTTATCAGATGAAATAATAGATATAGAAGAGAGTGCTTTGCAAGATAGTCGCGAGGATAAAGG  
CTTATCTATTAAGAAAAGATACTTGAGCACCATCTGATGACCAACTATCAACCGCATCTACTGCACTATGCCATAAAAAGCTTTGGCTGC  
TTACCTACGCCGATTCTTGAGAGTTTGATAAAGTGTTTAGATGGACCTACTTCAAAGCAATATTTGCATGTTGATGCCCATCTGCGCTTAA  
TACTTGCGGTCAATAGCAAGCTAAAAACGCCTTTGCAGCTGATAGAGATGCTGAGCTGCGTAAACGCCTTTGCAACAGATGCGGTGCGT  
ATGCAAGCACCAAAAGTATGGCAGCAAGCTTCTGACAACCTGCTTAGCAATTTGAAACAGTTTCATAAAAAAGGCGATAGCGCTATCAG  
TTGGCAAGATAGAACGATTACCAATGCCGACGACGGTGATATGACCATTGCTGCTATCAAATGAGACCTCTGACAATGGTTTTGGCTT  
TAAAAAAGAGCAAACAGTAATCCTGATGAGACCGTGCTATTGTTTTTCATGGTGGTGGATTTGTATTGGTGACCTTAATACCCATCAT  
GAATTTTGTATGCCATTTGTGAGCAAACGGGCTGGCCGGTCATTAGTGTTGATTATCGCTTAGCACCTGAACACCCTGCCCTGCTGCC  
GTAAGAGACTGTATCAGTGCCTATGCTTGTTAGCTGAACATTGTGAAGAATTTGGTGCTTTACCATCACGCATTGTATTAGCAGGTGAT  
AGCGCAGGTGGTGGATTATCTACTTTGATGGCTCAGCAAATCATCACGCCAAATAAAGAGGCTTGGTTGGATCTAGGTGATGAAGGTCA  
AAAGACCTTTGATATATTACAAGGTTTACCACATCCTATGGCAGATGCCCTTATATCCTGTGACCGATATTGAGACCGATTATCCAAGC  
TGGGAGTTATATGGTGAAGGTCTATTACTCGACCATGCTGATGTTGCCATTTTATGATGCCGCTTGTGTTAGAAAATAGTCCGTTACCGCGC  
CAGCATATCCTGACCTCACCGATGCTTGGGGACAATCGACAGGTTTGCCAAGTTATGTCGTTGCAGCAGAATTAGATGTCTTACGTGAT  
GAAGCGTTTGCTTATGCCAATCAGCTAAAGAGTTTTGGTATAGCCGTACAAACCCATACGGTACTTGGCGCACCGCATGGATTTATTCAC  
TTTATGAGCGTTTCATCAAAGATTAGGGCAAGAACTCAGCATATCATCACAGGGTTTGCTAATTTGTGCGTGAAATCATAAAAAACAAG  
GGCGCTATTGAGCGCTTAAAggatcctttt
```

Secventa de amino acizi PSL2

```
MSNSTVLSVNTLLNKAVKTLNLMSFGQDKNPKSTDINLSDEIIDIEESALQDSREDKGLSIEKILEHHLMTNYQPHL  
LHYAIKSFGCLPTPIELSLIKCLDGPTSKQYLHVDAHLRLILAVNSKLKTPQLIEMSELKRKFATDAVAMQAPKVW  
QQASDNLLSNLKQFHKKGDSAISWQDRITITNADDGDMTIRCYQNETSDNGFGFKKEQTSNPDETULLFFHGGGFCI  
GDLNTHHEFCHAICEQTGWPVISVDYRLAPEHPAPAAVRDCISAYAWLAEHCEEFALPSRIVLAGDSAGGGLSTL  
MAQQIITPNKEAWLDLGDGEGQKTFDILQGLPHMAQMPLYPVTDIETDYPSEWLYGEGLLLDHADVAIFDAACLEN  
SPLPRQHILTSPMLGDNRQVCPSYVVAELDVLRLDEAFAYANQLKSFGIAVQTHTVLGAPHGFIHFMSVHQRLGQE  
TQHITGFANFVREIIKTRALLSA
```

Pe baza structurii primare, valorile calculate ale masei moleculare si punctului isoelectric ale proteinei recombinante **PSL2** (483 amino acizi) sunt MW = 53626.97 si respectiv pI = 5.33.

Plasmidul rezultat in urma clonarii in pHAT 2 (pPSL2) a fost analizat prin electroforeza in gel de agaroză 1% in urma digestiei *BamHI* pentru verificarea integritatii constructului. Insertul a fost secventializat (ATG Biosynthetics, Germania) pentru confirmarea secventei nucleotidice origine.

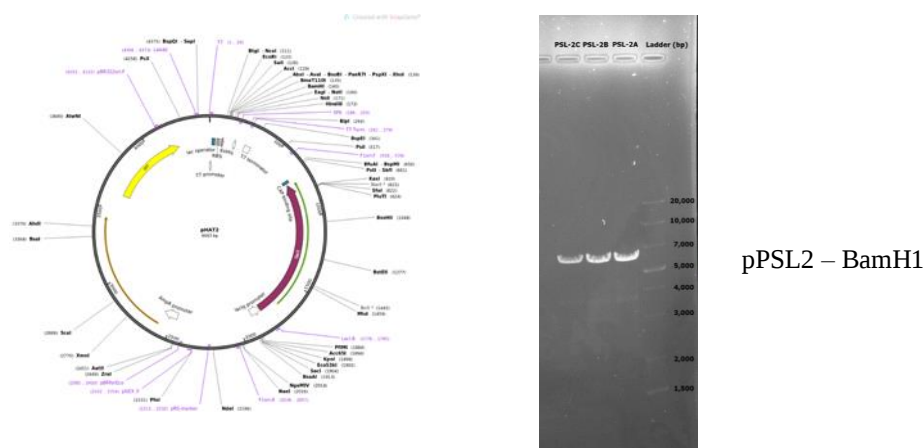


Figura 3. Clona pPSL2 in vectorul de expresie pHAT2

ADNul plasmidial al clonei pPSL2 a fost extras și purificat din celulele de *E. coli* DH5α transformate utilizând kitul DNA Miniprep (ThermoFisher). Expresia genei *lip2* în tulpina *E. coli* BL21 (DE3) a fost obținută prin inducție în prezența 1 mM IPTG la 15°C și 25°C timp de 16 ore. Fracțiunile proteice solubile rezultate prin lizarea celulelor utilizând un ultrasonicator Bandelin Sonoplus (5x 30 s) și centrifugare la 16,000 x g timp de 30 min. au fost analizate prin electroforeza denaturantă SDS-PAGE. Enzima recombinantă PSL2 obținută sub formă solubilă a fost purificată prin cromatografie de afinitate (Figura 4).

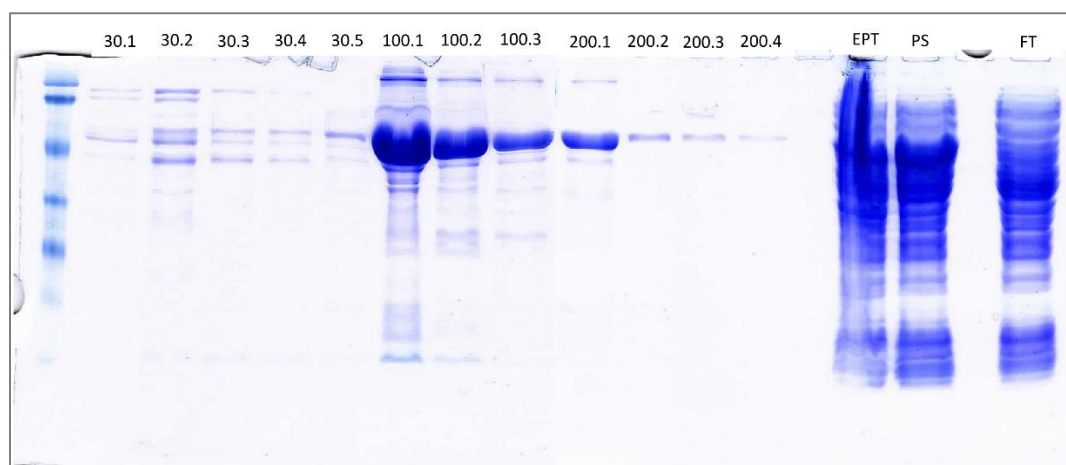


Figura 4. SDS-PAGE al fracțiilor de purificare a lipazei recombinante PSL2. Eluția s-a realizat în prezența concentrațiilor de imidazol 30 mM-200mM; FT – flowthrough; PS - proteină solubilă; EPT – extract proteic

2.3. Caracterizarea functionala a enzimei recombinante in solutie

Lipaza exprimata si separata anterior a fost caracterizata in cadrul acestei etape de lucru. In primul rand a fost determinate concentratia proteica a solutiei de lipaza. Astfel, solutia de lipaza a fost analizata spectrophotometric (280 nm) pentru a se determina concentratia proteica in baza metodei BSA (Figura 5). Valoarea absorbantei pentru solutia fractiei proteice a fost utilizata in baza ecuatiei curbei BSA pentru a calcula concentratia proteica rezultand valori ale concentratiei PLS2 purificate in intervalul 4.5 ± 0.5 mg/mL.

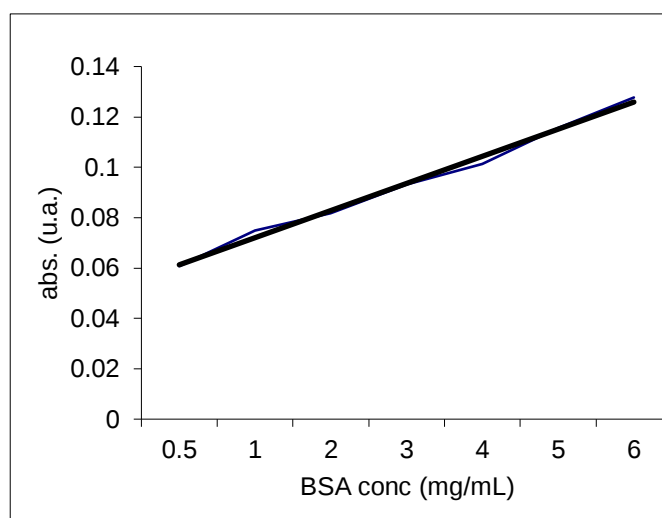


Figura 5. Curba de calibrare BSA pentru determinarea concentratiei de proteina

Activitatea enzimatica a PLS2 s-a determinat colorimetric utilizand p-nitrofenil butirat (p-NPB) drept substrat prin metoda utilizata in etapa anterioara, de evaluare a activitatii lipolitice a extractului proteic al tulpinii psihrofile *Psychrobacter sp.* SC65A.3 (Gheorghita GI, Paun VI, Neagu S, Maria GM, Enache M, Purcarea C, Parvulescu VI, Tudorache M (2021). *Catalysts*, 11(11):1390).

Amestecul de reactie continand 2.5 mM p-NPB dizolvat in etanol, 1:4 v/v solutie enzimatica si 32.5 mM Tris-HCl pH 7.5 a fost incubat 30 min la 25 °C/ 37 °C. Stoparea reactiei s-a efectuat prin incubare cu 20 mM NaCO₃ timp de 10 min. Absorbanta produsului de reactie a fost masurata la lungimea de unda de 347 nm. Calculul activitatii s-a realizat pe baza unei curbe de calibrare pentru p-nitrofenol in intervalul de concentratii 0.1-0.5 mM (Figura 6). Activitatea enzimatica a fost exprimata in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ enzima (1 U=1 $\mu\text{mol}/\text{min}$).

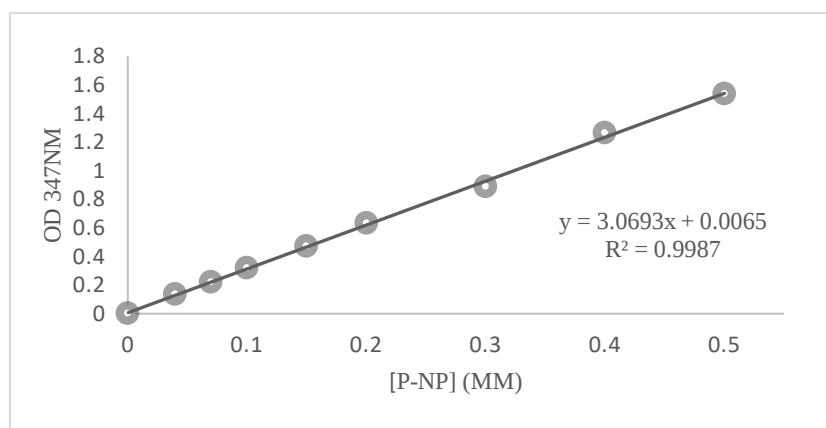


Figura 6. Curba de calibrare pentru p-nitrofenol in intervalul de concentratie 0-0.5 mM

Activitatea enzimatica a enzimei PSL2 purificate determinata la 25 °C si 37 °C a fost de 39 U/mg si respectiv 55 U/mg.

In vederea stabilirii raportului optim enzima : substrat si a timpului de incubare pentru starea de echilibru a reactiei, activitatea lipazica a fost masurata in prezenta diferitelor concentratii de substrat (25 μM, 75 μM, 100 μM, 125 μM) la o concentratie constanta de enzima (Figura 7).

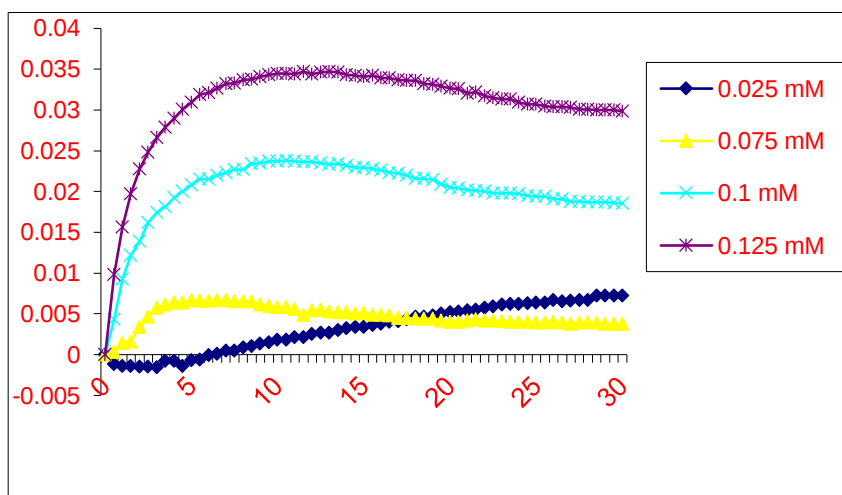


Figura 7. Cinetica procesului enzimatic pentru lipaza PSL2 purificata

In aceste conditii, semnalul analitic a crescut proportional cu cresterea concentratiei de substrat, procesul enzimatic avand loc cu o viteza mare de reactie pentru primele 5 min, in general, apoi atingandu-se echilibrul chimic in urmatoarele maxim 20 minute.

Stabilitatea activitatii enzimatice a lipazei purificate PLS2a fost determinata in urma congelarii la -45 °C in prezenta 20% glicerol. In aceste conditii, activitatea lipazica s-a mentinut constanta pentru o perioada de 7 zile.

Termostabilitatea PSL2

Stabilitatea enzimei purificate la diferite temperature s-a determinat prin incubarea PSL2 la diferite temperature timp de 20 min si masurarea activitatii lipazice la 37°C. Rezultatele (Tabel 2) indica o crestere de 1.3-1.4 ori a activitatii in urma incubarii la temperaturi cuprinse intre 15°C si 25°C. Enzima isi pastreaza activitatea lipolitica la temperaturi mai mari de 40C, cu scadere la temperaturi superioare in intervalul 40-90°C. Este de remarcat stabilitatea ridicata a acestei lipase cold-active la temperaturi ridicate prezentand o activitate lipazica rezilienta de 75% in urma stresului termic la 60°C si de 56% la 90°C (Tabel 2).

Tabel 2. Influenta temperaturii asupra stabilitatii lipazei PLS2

Temperatura (°C)	Activitate enzimatica (U/mg proteina)
fara stres termic	16
15	21
25	23
40	17
60	12
90	9

2.4. Obținerea si caracterizarea preparatelor enzimatice imobilizate pe particule magnetice

Imobilizarea lipazei s-a realizat pe suprafata unui suport solid pe principiul general al imobilizarii covalente. Ca suport au fost utilizate particule magnetice sau bile de rasina. In ambele cazuri suprafata suportului a fost functionalizata cu grupari functionale care sa permita atasarea covalenta a enzimei prin formare de baza Schiff. Pentru particulele magnetice Si-MAG-carboxyl, Si-MAG-amine si Fmp-carboxyl s-a utilizat protocolul EDC in care gruparea -COOH de pe suprafata suportului/enzimei a fost activata in vederea cuplarii cu grupare -NH₂ corespunzator in structura enzimei/ suprafata suport. 0.25 M EDC in MES, 1 mL suspensie

particule magnetic, 6.6 mg/mL lipaza au constituit componentele amestecului pentru realizarea imobilizarii. Amestecul a fost supus agitarii la temperatura camerei pentru 2 ore. In urma centrifugarii au fost separate biocompozitele de tip lipaza imobilizata pe suport. Acestea au fost spalate in mod repetat cu solutie tampon PBS si pastrate in acest tampon la 4°C.

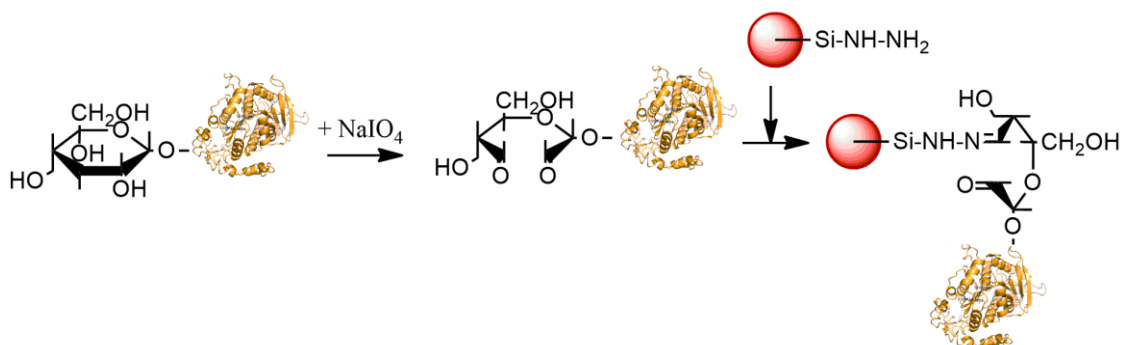


Figura 8. Imobilizarea lipazei pe support de tip particulamagnetica prin metoda EDC

In cazul utilizarii drept support a particulelor magnetice de tip Si-MAG-Hydrazine, metoda imobilizarii a fost NaIO_4 . Intr-un volum de 500 μL proteina au fost adaugate 5 mg NaIO_4 , **metacrilica**. amestecul obtinut fiind pastrat pentru incubare la temperatura camerei timp de 3 ore. Apoi, 1 mL suspensie support a fost adaugat peste acest amestec si incubat pentru 6 ore la temperatura camerei. In final, o solutie 0.1% BSA si 0.05% NaN_3 in PBS (pH7) a fost folosita pentru spalarea si stocarea biocompozitelor separate in urma centrifugarii din amestecul incubat (Figura 9).

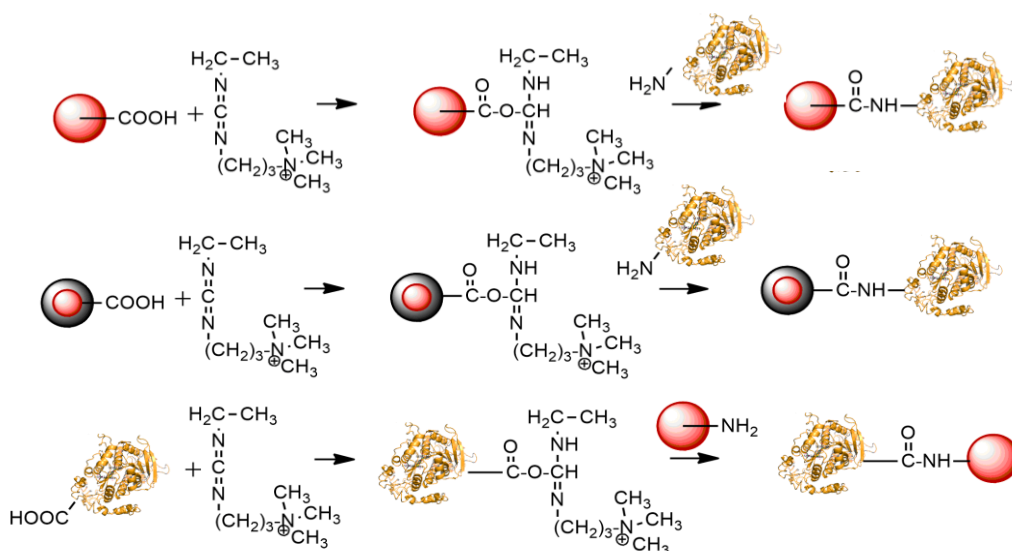


Figura 9. Metoda NaIO_4 pentru imobilizarea lipazei pe particule magnetice

Imobilizarea lipazei pe suport de rasina metacrilica (amino-C2-metacrilat) s-a realizat dupa urmatoarea reteta: masa de 0.1 g suport a fost adaugata la o solutie 0.1% aldehida glutarica (GA) si 1mg/mL lipaza in mediu MES (pH4.7). Suspensia obtinuta a fost incubata timp de 2 ore. In final, centrifugarea amestecului a permis separarea biocompozitelor rezultate. Acestea au fost spalate si pastrate cîn solutie PBS (pH7.4).

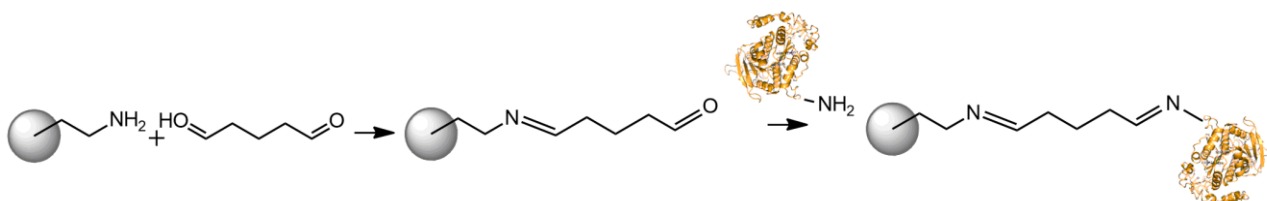


Figura 10. Metoda GA pentru imobilizarea lipazei pe suport de rasina

Biocompozitele rezultate in urma imobilizarii au fost caracterizate atat din punct de vedere structural, cat si compositional, punand in evidenta activitatea enzimatica a lipazei atasate pe suport (Tabel 3). Procentului de enzima imobilizat raportat la intreaga enzima supusa imobilizarii si activitatea reziduala reprezentand activitatea catalitica a lipazei imobilizate fata de cea a enzimei libere (Tabel 3)

Tabel 3. Caracterizarea lipazei imobilizate

Bio-compozit	Support	Metoda imobilizarii	Activitate reziduala (%)	Lipaza imobilizata (%)
S1	Si-MAG-COOH	EDC	82	99
S2	Fmp-MAG-COOH	EDC	128	99
S3	Si-MAG-NH2	EDC	80	93
S4	Si-MAG-NH-NH2	NaIO4	82	96
S5	MTC-NH2	GA	105	90

Valorile obtinute indica eficienta crescuta a procesului de imobilizare independent de tipul suportului (90-99%) cu conservarea activitatii enzimatice variind intre 80-128%. Se observa o activare aparenta a lipazei in cazul S2 si S5, un fenomen comun acestei clase de enzime.

Biocompozitele rezultate au fost analizate prin tehnica FTIR DRIFT (Figura 11). Benzile specific suportului se gasesc separate la numere de unda 570-650 cm^{-1} pentru S1-S4 indicand prezenta Fe-O si la 1730 cm^{-1} , 3300 cm^{-1} si 3500 cm^{-1} pentru S5 indicand vibratii specific C=O din carboxil, si respective grupare aminica a polimerului metacrilat. Prezenta benzilor de vibratie in zona 1550-1700 cm^{-1} pentru biocompozita si absenta acestora in cazul suportului indica prezenta lipazei, specific zona Amida I si II pentru legaturile de tip peptidic. Aceasta observatie are caracter general pentru biocompozitele S1-S5.

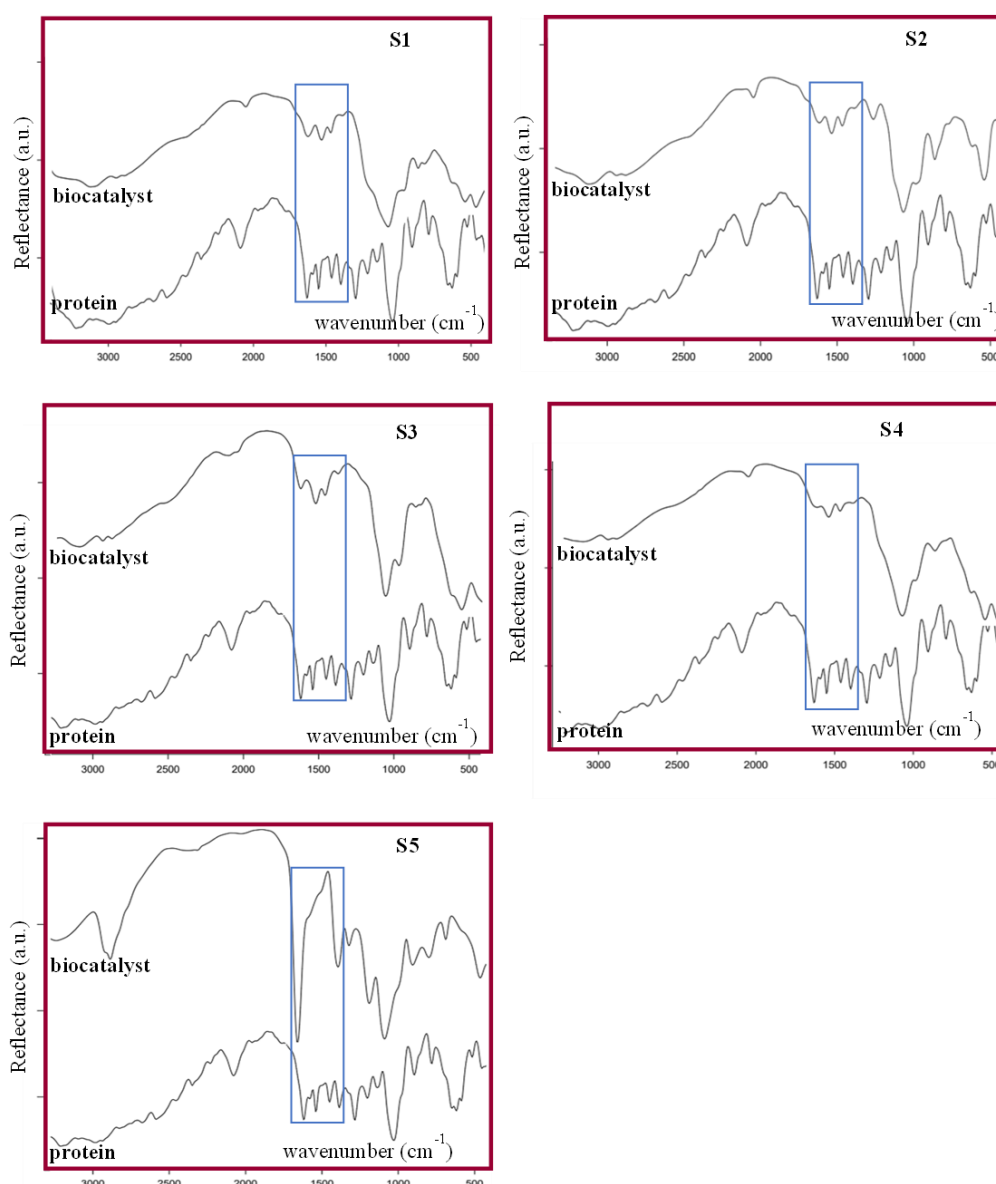


Figura 11. Spectrele FTIR pentru biocompozitele S1-S5 comparativ cu lipaza in solutie

Analiza texturala realizata pentru biocompozitele S1-S5 s-a realizat prin utilizarea tehnicii SEM (Figura 12). Diferentele vizibile remarcate pentru biocompozite in raport cu suportul liber pun in evidenta prezenta lipazei pe suprafata suportului si implicit demonstreaza succesul procesului de imobilizare a lipazei. In cazul particular al particulelor de rasina, diferentele sunt marcante. Astfel, pentru suportul liber de enzima se observa o suprafata neteda, in timp ce dupa imobilizare, morfologia suprafetei este total diferita.

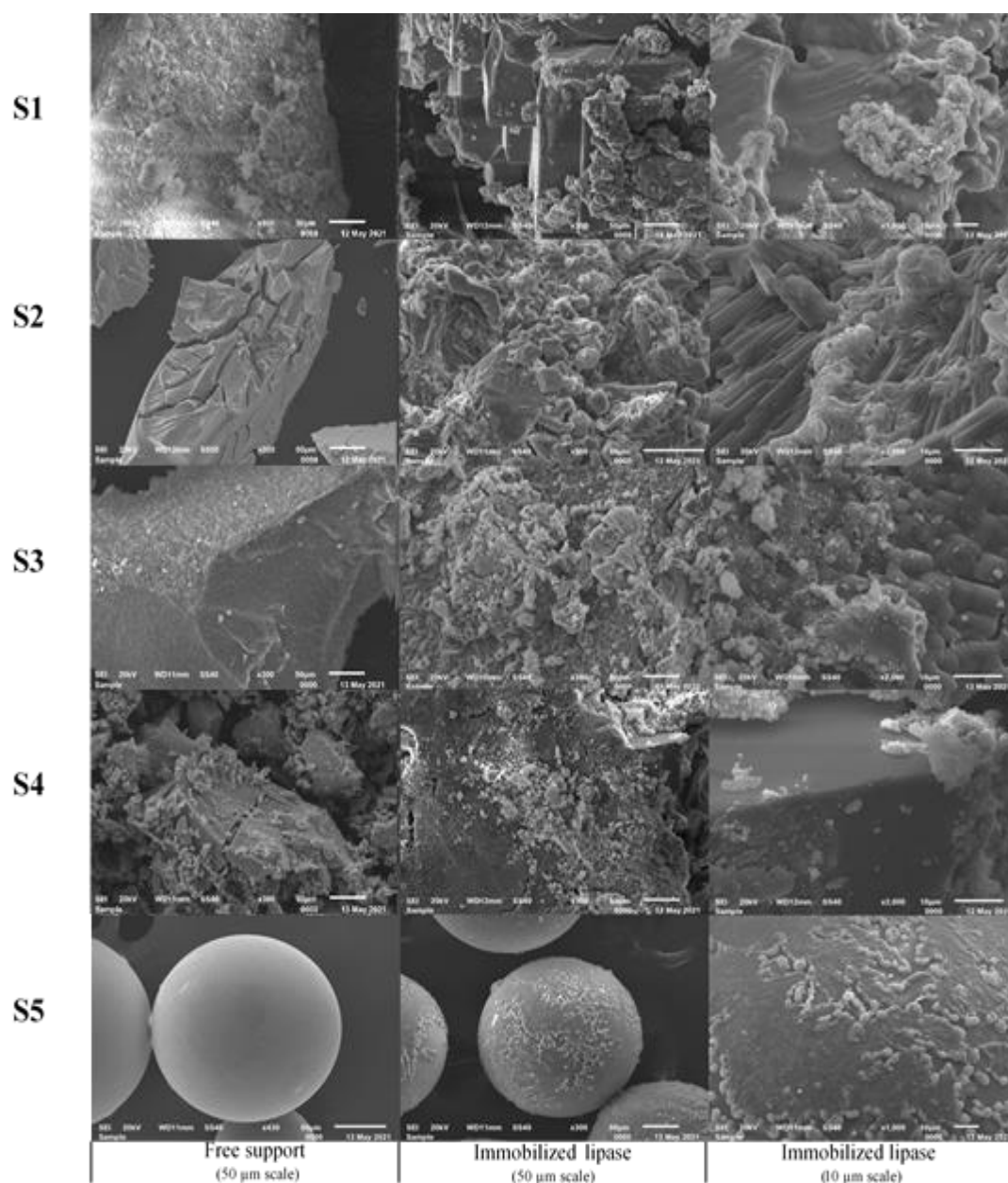


Figura 12. Imagini SEM ale biocompozitelor S1-S5 pentru magnitudini diferite, in raport cu suportul liber de enzima

Parametrii cinetici ai enzimei libere si imobilizate in biocompozitele S1-S5 masurati la 25°C si 37°C (Tabel 4) indica variatii reduse intre cele doua temperaturi, in acord cu activitatea unei enzime de tip cold-activ si prezenta unei activitate lipazice la temperatura scazuta (25°C) in cazul tuturor biocompozitelor. In plus, constanta cinetica a biocompozitelor S2, S4 si S5 pentru temperatura de 25°C a prezentat valori mai mari decat pentru 37°C indicand conservarea comportamentului cold-active dupa imobilizare.

Tabel 4. Parametri cinetici ai enzimei libere si din compozitele S1-S5

	Km (mM)		kcat (min ⁻¹)		kcat/Km (mM ⁻¹ min ⁻¹)	
	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
Lipaza libera	2.18±0.15	1.85±0.09	1.63±0.08	1.95±0.09	0.75±0.05	1.05±0.09
S1	1.61±0.08	1.17±0.09	0.99±0.05	0.97±0.06	0.62±0.04	0.83±0.04
S2	0.56±0.04	0.65±0.03	0.93±0.05	0.99±0.06	1.67±0.09	1.54±0.07
S3	4.18±0.21	1.41±0.07	2.29±0.09	1.25±0.07	0.55±0.03	0.88±0.04
S4	0.63±0.03	0.78±0.05	0.65±0.03	0.92±0.05	1.02±0.09	1.17±0.09
S5	0.94±0.05	0.64±0.03	0.85±0.08	1.2±0.09	0.90±0.05	1.88±0.09

2.5. Extractia silimarinei si separarea silibinei din strotul de ulei de armurariu presat la rece

Deseul vegetal (srotul) provenit in urma procesului tehnologic de obtinere a uleiului de armurariu prin presare la rece a fost utilizat pentru extractia silimarinei si ai departe a silibinului. Astfel, resturile vegetale sub forma deshidratata au fost dispersate in etanol (100 g residuu la 1L etanol). In felul acesta s-a realizat extractia solid-lichid a silimarinei impreuna cu alte componente polare in solventul alcoolic. Urmele de grasime rezultate in extract au fost inlaturate prin extractie lichid-lichid cu hexan (hexan:sol etanol=1:1, v/v). Noul extract alcoolic rezultat a fost supus evaporarii pentru a inlatura solventul. S-a obtinut o pulbere in cantitate de 1.5 g reprezentand silimarina.

În continuare, s-a urmărit extracția silibinului din complexul de silimarina. Pentru aceasta s-a redizolvat complexul de silimarina în etanol absolut cu omogenizarea continuă a soluției obținut (10 g silimarina în 100 mL etanol absolut). Adăugarea treptată a picăturilor de apă distilată în soluția de silimarina permite precipitarea silibinului. Separarea precipitatului s-a realizat prin centrifugare. Apoi, pulberea obținută a fost uscată și cântărită. A rezultat o masă de 3.2 g silibin.

Un bilanț tehnologic pentru procesul de extracție realizat indică randamentul de 1.5 % pentru silimarina și 0.5 % pentru silibin raportat la reziduul vegetal rezultat în urma procesului tehnologic de obținere a uleiului de armurariu prin presare la rece.

2.6 Optimizarea reacției de transesterificare a silibinei utilizând lipaza

Procesul biocatalitic urmărit în cadrul experimentelor realizate a constatat în acilarea enzimatică a silibinului utilizând esteri ai acizilor grași drept agenți de acilare în reacția catalizată de lipază (Figura 13).

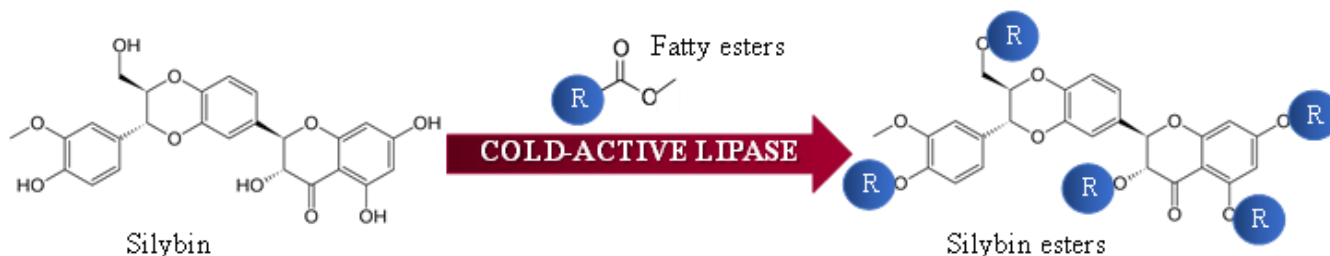


Figura 13. Acilarea silibinului cu esteri ai acizilor grași în prezența biocatalizatorului de tip lipază

Optimizarea reacției de transesterificare utilizând silibin a fost efectuată utilizând un amestec de reacție compus din 2 mM silibin dizolvat în THF, 40 mM agent de acilare (metildecanoat, metil laurat, metil miristat și metil palmitat și 10 % v/v biocatalizator (lipază liberă sau imobilizată sub formă biocompozitelor S1-S5). Amestecul obținut a fost incubat 24 h la 25°C sub agitare continuă (1000 rpm). După reacție, amestecul a fost centrifugat pentru separarea biocatalizatorului. Supernatantul rezultat a fost filtrat și supus evaporării. Proba uscată a fost

redizolvata in amestec acetonitrile:acetone (41:59 v/v) si analiza pe baza tehnicii HPLC cuplata cu detectie DAD (210 nm).

Conditiiile experimentale pentru analiza cromatografica au cuprins: coloana Poroshell 120 EC-C18, faza mobile CAN : acetona = 41:59 (v/v), 25 µL volum de injectare, 1 mL/min viteza fluxului in sistem, 30 min timp de analiza. Interpretarea cromatogramelor a permis identificarea si cuantificarea produsilor de reactie formati si a reactantilor in exces regasiti dupa reactie in amestec. Eficienta catalitica a procesului de acilare a fost evaluata pe baza valorilor de conversie obtinute. Conversia (%) a fost calculate dupa formula:

$$\text{Conversia, } C (\%) = \frac{\text{masa de silibin transformat}}{\text{masa initiala de silibin}} \times 100$$

In cadrul etapei de optimizare a procesului de acilare biocatalitica a silibinului au fost testati agenti de acilare din doua clase importante, acizi grasi (acidul oleic si acidul octanoic) si esterii metilici ai acizilor grasi (metil decanoate, metil laurat, metil miristat, metil palmitat). Rezultatele optimizarii acestui process sunt ilustrate in Figura 14.

Ca observatie generala, lipaza sub forma imobilizata a prezentat o activitate mai ridicata decat lipaza neimobilizata. Acest comportament este valabil pentru toate biocompozitele analizate (S1-S5). In felul acesta s-a pus in evidenta o aparenta activare a lipazei in urma imobilizarii.

In cazul utilizarii acizilor grasi ca agenti de acilare, selectivitatea lipazei a crescut proportional cu lungimea catenei. Un caracter lipofilic accentuat al agentului de acilare (vezi cazul acidului oleic in comparatie cu acidul octanoic) duce la o selectivitate ridicata, un comportament specific enzimelor lipolitice.

Utilizarea acizilor grasi, respectiv a esterilor corespunzatori, implica conversii similare. In acest fel se pune in evidenta capacitatea catalitica bivalenta a lipazei cold-active de a cataliza reactii de *esterificare* si *transesterificare*.

Compararea metodelor de imobilizare pentru acelasi tip de suport a evidentiat metoda EDC ca avand eficienta generala buna pentru majoritatea biocomponentelor preparate. Pe de alta parte, suportul cu grupari -COOH ofera posibilitatea de legare avantajoasa atat din punct de vedere al stabilitatii activitatii lipazei, cat si din punct de vedere al randamentului masic de imobilizare a enzimei.

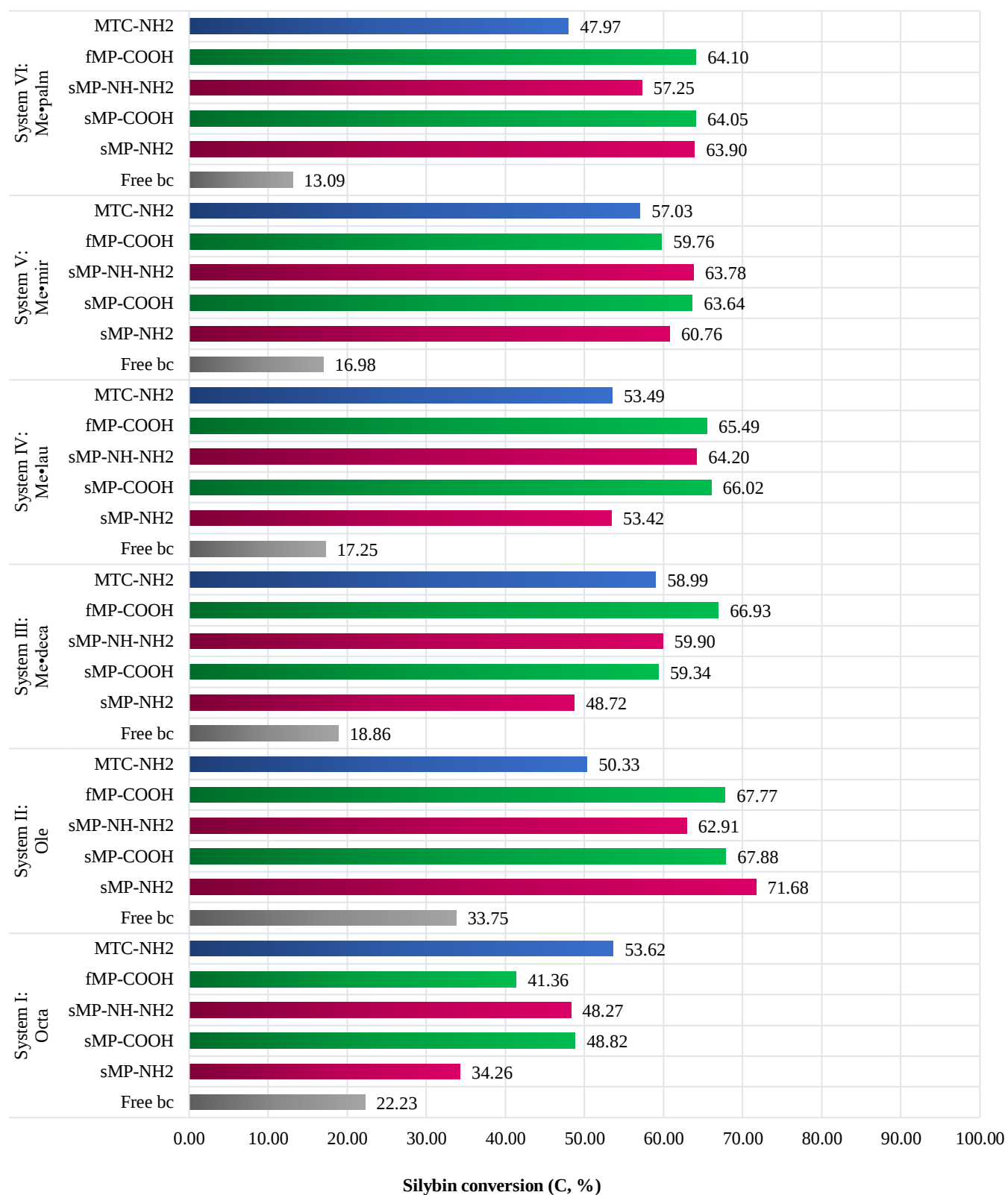


Figura 14. Optimizarea conversiei silibinului in procesul de acilare biocatalitica

În cadrul etapei de optimizare a procesului de acilare biocatalitică a silybinului au fost testați agenți de acilare din două clase importante, acizi grași (acidul oleic și acidul octanoic) și esteri metilici ai acizilor grași (metil decanoat, metil laurat, metil miristat, metil palmitat).

Ca observație generală, lipaza sub formă imobilizată a permis realizarea unei conversii mai bune decât pentru lipaza liberă. Acest comportament este valabil pentru toate biocompozitele analizate (S1-S5). În felul acesta s-a pus în evidență o aparentă activare a lipazei în urma imobilizării. Acest comportament a fost raportat în repetate rânduri specific pentru lipaza.

Pentru cazul utilizării acizilor grași ca agenți de acilare, se poate observa că selectivitatea lipazei crește împreună cu lungimea catenei. Un caracter lipofilic accentuat al agentului de acilare (vezi cazul acidului oleic în comparație cu acidul octanoic) duce la o selectivitate ridicată. Comportamentul este specific enzimelor lipolitice, clasa din care face parte lipaza.

Utilizarea acizilor grași, respectiv a esterilor corespunzători, implică conversii similare. În acest fel se pune în evidență capacitatea catalitică bivalentă a lipazei cold-active de a cataliza reacții de *esterificare* și *transesterificare*.

Compararea metodelor de imobilizare pentru același tip de suport a evidențiat metoda EDC ca având eficiența generală bună pentru majoritatea biocomponentelor preparate. Pe de altă parte, suportul cu grupări -COOH oferă posibilitatea de legare avantajoasă atât din punct de vedere al stabilității activității lipazei, cât și din punct de vedere al randamentului masic de imobilizare a enzimei.

2.7 Managementul proiectului și diseminarea rezultatelor

Reuniuni de lucru parteneri IBB - UB (4)

2 februarie 2021, 10 iunie 2021, 30 septembrie 2021, 20 octombrie 2021

Articole (2)

1. Gheorghita GI, Paun VI, Neagu S, Maria GM, Enache M, Purcarea C, Parvulescu VI, Tudorache M (2021) Cold-active lipase-based biocatalysts for silymarin valorization through biocatalytic acylation of silybin. *Catalysts*, 11(11):1390. <https://doi.org/10.3390/catal11111390> (Q2)

2. Paun VI, Lavin P, Chifiriuc MC, Purcarea C (2021) First report on antibiotic resistance and antimicrobial activity of bacterial isolates from 13,000-year old cave ice core. *Scientific Reports* 11, 514. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79754-5> (Q1)

Conferinte (6)

1. **Contemporary Solutions for Advances Catalytic Materials with a High Impact on Society (CoSolMat2021)**, 11-15 octombrie 2021, Bucuresti (online)
Gheorghita GR, Purcarea C, Sandulescu-Tudorache MV. Biocatalysis based on cold-active lipase for silymarin valorization from vegetal waste of cold-pressed milk thistle oil technology. *Prezentare orală*
2. **15th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations (BIOTRANS 2021)**, 19-22 iulie 2021, Graz, Austria (online)
Gheorghita GR, Purcarea C, Sandulescu-Tudorache MV. Biocatalysis based on cold-active lipase for silymarin derivatization. *Poster*
3. **International Symposium on Biomaterials for Fuels and Chemicals (SBFC)**, 26-28 aprilie, 2021 (online)
Gheorghita GR, Purcarea C, Sandulescu-Tudorache MV. Biocatalysis based on cold-active lipase for silymarin valorization from vegetal waste of cold-pressed milk thistle oil technology. *Prezentare orală*
4. **28th INTERNATIONAL KARSTOLOGICAL SCHOOL CLASSICAL KARST “Regional Karstology – Local and General Aspects within International Year of Karst and Caves”**, 14-18 iunie 2021, Slovenia (online)
Ojovan B, Gheorghita GR, Paun VI, Purcarea C. Cold active lipases from Scarisoara Ice Cave and their applicative potential. *Poster*
5. **Ziua Internațională a Microorganismelor (ZIM2021)** Bucuresti, 17 septembrie 2021
Paun VI, Gheorghita GR, Iancu L, Ojovan B, Sandulescu-Tudorache MV, Chifiriuc MC, Purcarea C. Genome sequence and applicative potential of the psychrotrophic *Psychrobacter* SC65A3 strain isolated from Scarisoara Ice Cave. *Prezentare orală*
6. **A 61-a Sesiune Anuala de Comunicari Stiintifice a Institutului de Biologie**, Bucuresti, 10 decembrie 2021
Paun VI, Gheorghita GR, Sandulescu-Tudorache MV, Purcarea C. Bacterii din gheata perena din peștera Scarisoara: sursa de biocatalizatori activi la temperaturi scăzute. *Prezentare orală*