

## **Proiect SYMPLUS**

### **Imbogatirea continutului de silimarina al uleiului de armurariu presat la rece prin valorificarea deseurilor vegetale**

Contract: 356PED/2020

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

#### **Raport stiintific Etapa 3/2022**

**Obiectiv:** Validarea procesului de transesterificare pe baza lipazei active la temperaturi scazute, caracterizarea derivatilor de silibina si a uleiului de armurariu imbogatit, managementul proiectului si diseminarea rezultatelor

#### **3.1 Validarea procesului de transesterificare pe baza lipazei imobilizate**

Pentru validarea procesului de transesterificare pe baza lipazei bacteriene recombinante PSL-2 s-au obtinut stocuri de enzima purificata prin cromatografie de afinitate Ni-NTA, conform procedurii descrise in Etapa 2/2021. Batchurile enzimaticice rezultate de 6 ml si 8 ml au avut o concentratie proteica de 0,34 mg/ml si respectiv 0,93 mg/ml. Lipaza cold-active recombinanta a fost utilizata pentru obtinerea a 8 preparate de lipaza imobilizata in matrice polimerica de natura polizaharida indicate.

Reactia de transesterificare a silibinului a fost realizata in prezenta enzimei de tip lipaza imobilizata in matrice polimerica de natura polizaharida. Pentru construirea structurii compozidice biocatalitice active au fost utilizate doua polizaharide diferite, Na-alginat si K-caraginan. Procedura a constat in adaugarea in picatura a 3 mL solutie 4 % Na-alginat in solutie 5 %  $\text{CaCl}_2$  si, respectiv, 3 ml de solutie de 4 % k-caraginan in solutie 0.5 M KCl ([Kwon B.G. et al., Regional distribution of styrene analogues generated from polystyrene degradation along the coastlines of the North-East Pacific Ocean and Hawaii. Environ. Pollut. 188 \(2014\), 45:54.](#)

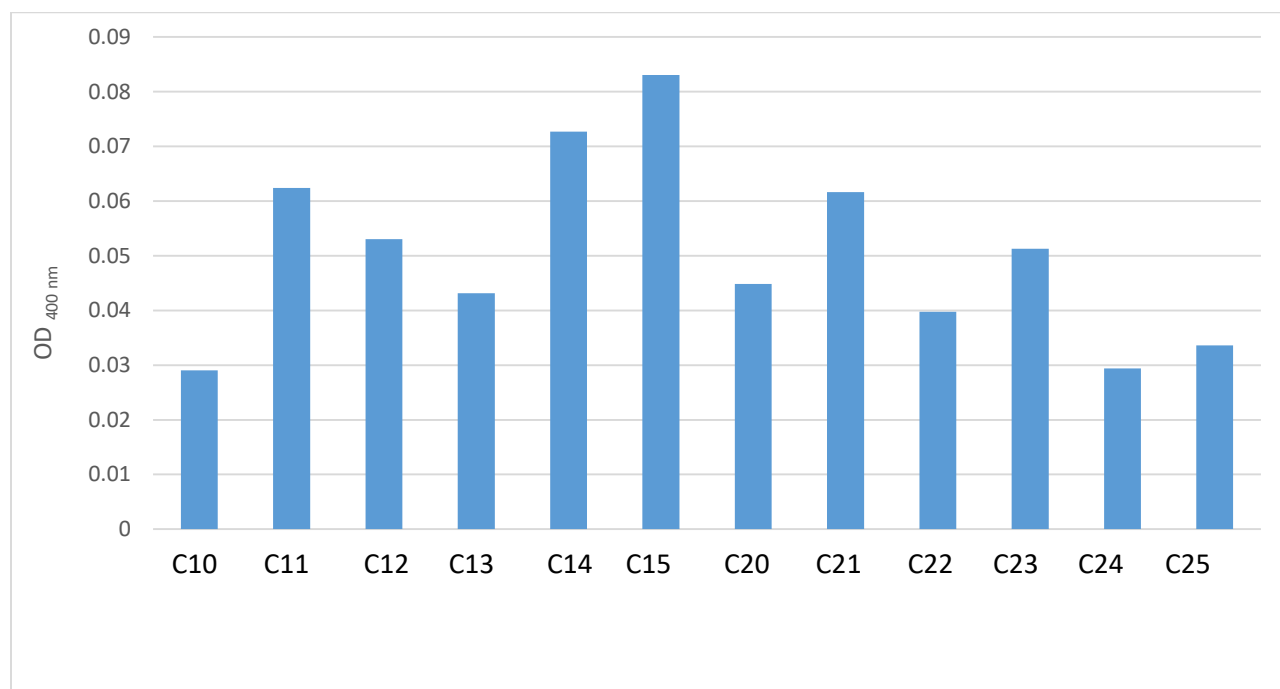
Pentru imobilizarea lipazei, solutia de enzima purificata PSL2 a constituit parte componenta a solutiilor preparate. Totodata, fragmente cu structure controlate de PET au fost inserate in compozitele realizate astfel. Structurile PET utilizate pentru construirea compozitelor enzimaticice

au fost pre-tratate diferit (modificare cu tiol si cu dimetil carbonat, (DMC), rezultand 12 variante (Tabel 1).

**Tabel 1.** Tipuri de biocompozite obtinute

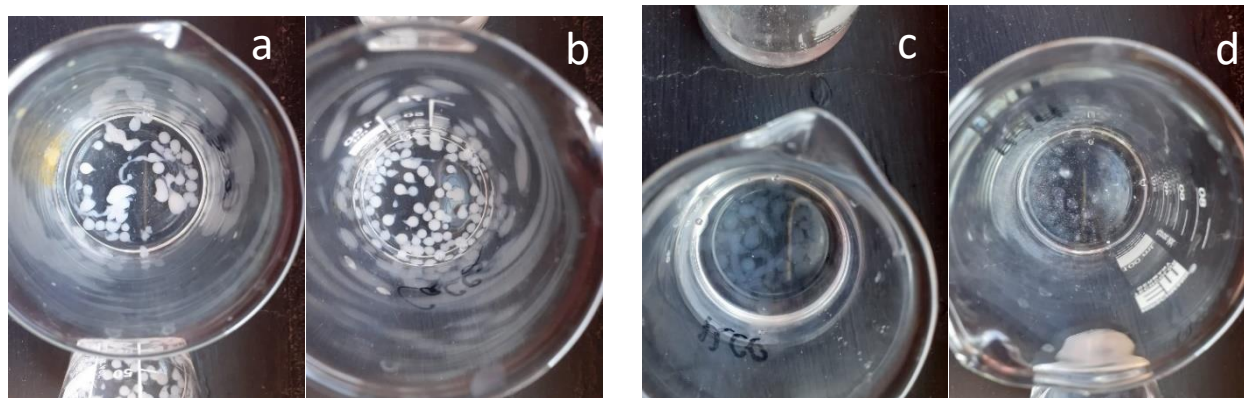
|             | Fara PET | PET nemodificat | PET modificat cu tiol 1 | PET modificat cu tiol 2 | PET modificat cu DMC (timp incubare 10 zile) | PET modificat cu DMC (timp incubare 15 zile) |
|-------------|----------|-----------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Na-alginat  | C10      | C11             | C12                     | C13                     | C14                                          | C15                                          |
| K-caraginan | C20      | C21             | C22                     | C23                     | C24                                          | C25                                          |

Activitatea enzimatica a tuturor structurilor preparate a fost determinata prin metoda spectrofotometrica standard utilizand p-nitrobutirat. Rezultatele experimentale obtinute sunt prezentate in Figura 1. S-au utilizat fragmente PET cu suprafata modificata pentru a oferi enzimei spatiu necesar interactiei cu substratul in interiorul structurii polimerice.



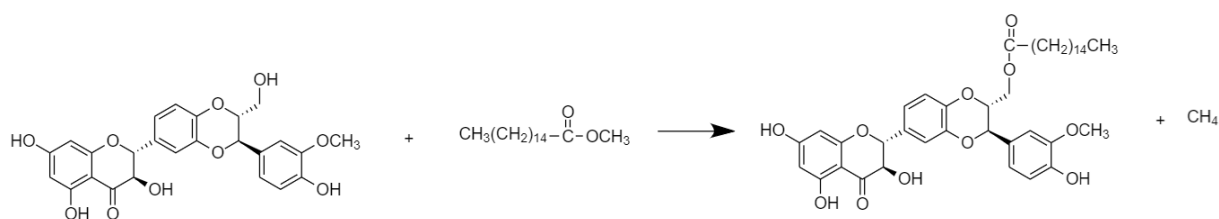
**Figura 1.** Activitatea enzimatica a compozitelor obtinute prin imobilizarea lipazei in structuri polizaharidice

În cazul alginatului de sodiu există o amplificare a activității catalitice pentru enzima imobilizată. Structurile pe bază de alginat de sodiu au prezentat o eficiență mai ridicată decât cele care utilizează k-caraginan. În plus, s-a observat că activitatea lipolitică a biocatalizatorilor generați este parțial inhibată în absența fragmentelor PET. Astfel, structurile PET nemodificate determină o amplificare a activității enzimatice, dar limitată. Activitatea enzimatică cea mai ridicată a fost înregistrată în cazul biocompozitelor obținute cu fragmente PET derivatizate, în particular prin utilizarea DMC ca agent de derivatizare.



**Figura 2.** Biocompozite cu lipaza imobilizată în matrice polimerică de tip Na-alginat a, b) și k-caraginan (c, d).

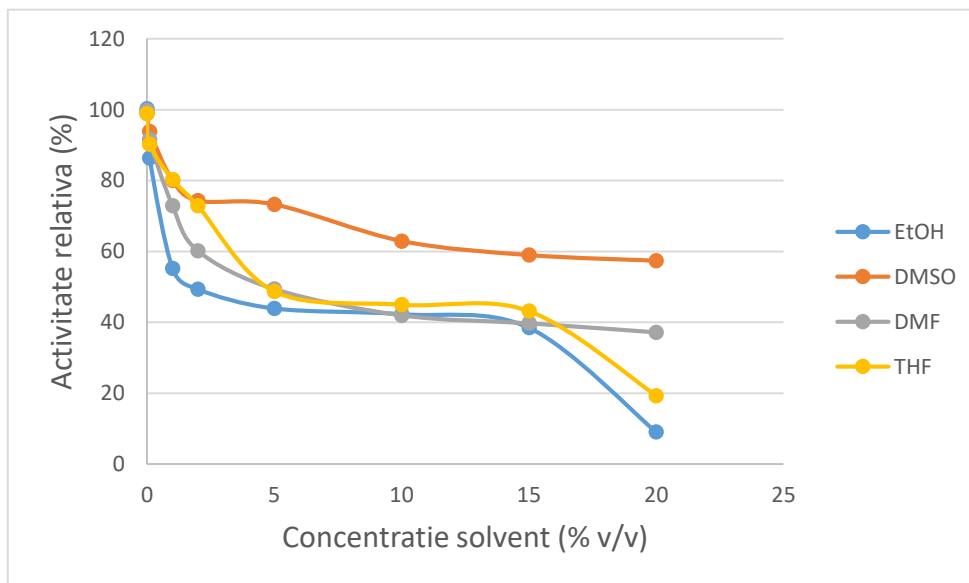
Structurile biocatalitice construite și caracterizate anterior au fost testate pentru reacții de derivatizare (acilare) a silibinului cu esteri ai acizilor grași de tip palmitat de metil.



**Figura 3.** Acilarea silibinului cu palmitat de metil

Ca etapă premergătoare validării reacției de acilare asistată de lipaza cold-active PSL-2 a fost determinat efectul diferiților solvenți (etanol, dimetilsulfoxid, dimetiformamidă și tetrahidrofuran) asupra activității lipazice, indicând o stabilitate parțială a enzimei cu o activitate reziduală de ~50%

in prezenta a 5%-15% (v/v) solvent, cu exceptia DMSO care a prezentat un efect inhibitor partial de 25% si 62% pentru concentratii de 5% si respectiv 20% (Figura 4).



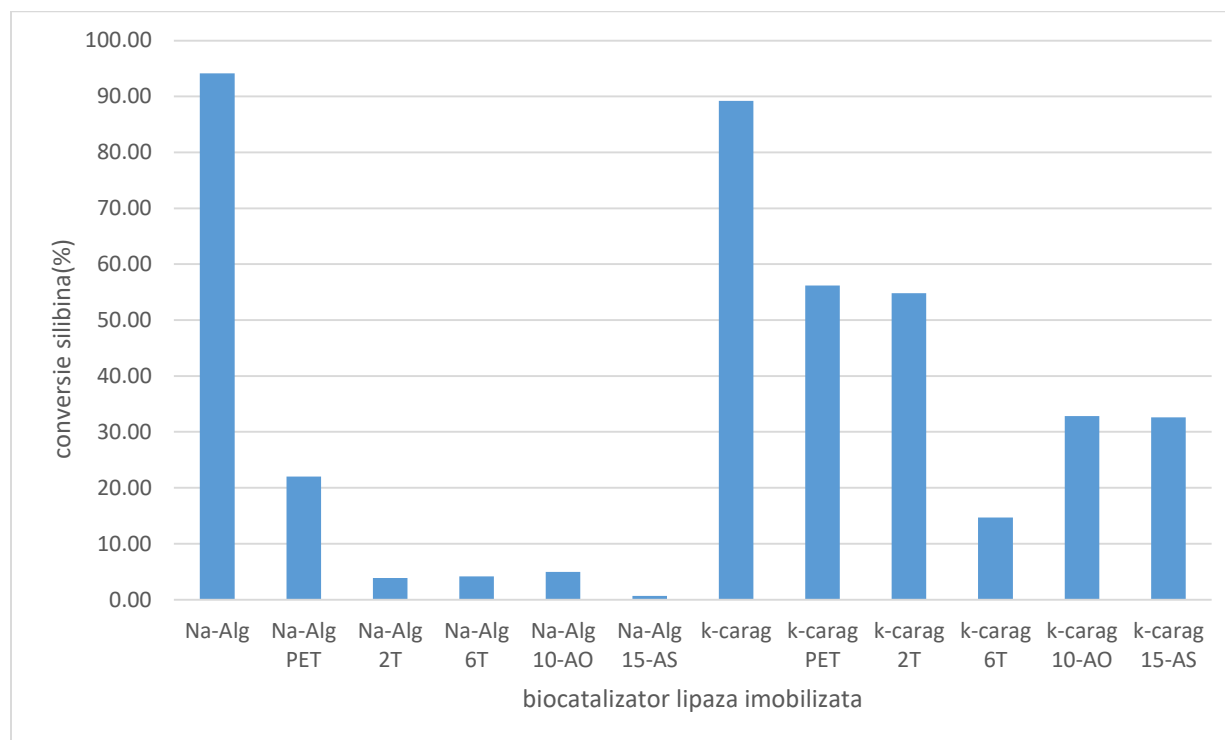
**Figura 4.** Efectul solventilor etanol (EtOH), dimetilsulfoxid (DMSO), dimetiformamida (DMF) si tetrahidrofuran (THF) asupra activitatii PSL-2

Reactia de acilare a silibinului s-a efectuat la temperatura de 25 °C pentru o perioada de timp de 24 ore in mediu de tetrahidrofuran. Solventul ales a fost considerat in baza solubilitatii substratului si produsului de reactii, pentru o buna omogenizare a amestecului de reactie. Totodata, s-a avut in vedere pastrarea activitatii enzimaticice in mediul corespunzator.

Considerand inhibarea partiala a enzimei PSL-2 prin prezenta solventului organic THF in concentratii diferite, realizarea structurilor de lipaza imobilizata cu ajutorul matricilor polizaharidice constituie o solutie pentru sistemul dezvoltat.

Astfel, s-a realizat o structura polimerica in care enzima a fost incapsulata. Na-alginat si k-caraginan au fost polizaharidele utilizate pentru construirea structurilor polimerice tip cusca. Pentru o buna interactie enzima-substrat s-au incapsulat fragmente PET alaturi de enzima. Bio-compozitele rezultate au fost testate drept biocatalizatori in reactie de acilare a silibinului. Rezultatele obtinute sunt prezentate in figura 5. In cazul seriei de biocatalizatori generati, reactia

optima de conversia a silibinului (100%) s-a obtinut pentru imobilizarea enzimei in cele doua matrici polizaharidice in absenta incapsularii in PET. Prezenta fragmentelor de PET duce la scaderea activitatii catalitice in reactii de acilare a silibinului. Acest fapt demonstreaza eficienta lipazei imobilizate in structuri de natura polizaharidica. Pentru biocatalizatori implicand fragmente PET, conversia maxima este de 57 % (Figura 5).



**Figura 5.** Conversia silibinului in prezenta biocatalizatorului enzima imobilizata.

Pentru stabilirea conditiilor de reactie in vederea atingerii eficientei maxime a sistemului de acilare a silibinului, au fost selectate 2 biocompozite din cele testate anterior (PET pretratat cu DMC timp de 15 zile) ca reprezentative atat pentru matricea Na-alginat (2T) cat si pentru matricea K-caraginan (15-AS).

Au fost testate 8 amestecuri de reactie variind concentratia si tipul de substrat (acid gras), cantitatea de enzima, si tipul de solvent, in prezenta unei cantitati constante (1 mg) de silibina (Tabel 2).

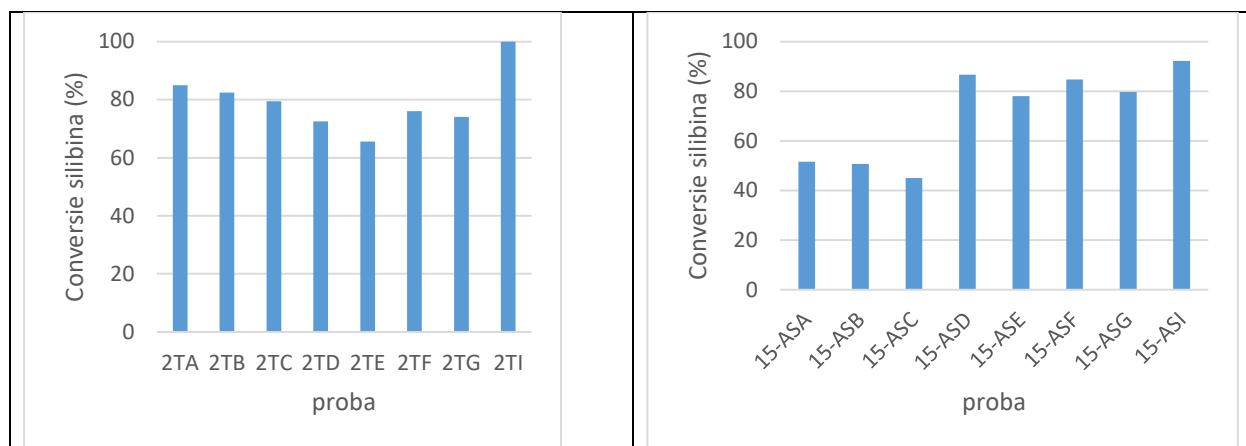
**Tabel 2.** Condițiile de reacție testate pentru cele două tipuri de tratare a PET-ului cu 2T și 15-AS

| Tip de tratare PET | Amestecuri de reacție                                                     |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| <b>2TA/15-ASA</b>  | 8.1 mg metil palmitat, 988 $\mu$ L THF, 1 mg silibin, 4 unitati enzima    |
| <b>2TB/15-ASB</b>  | 8.1 mg metil palmitat, 988 $\mu$ L THF, 1 mg silibin, 6 unitati enzima    |
| <b>2TC/15-ASC</b>  | 8.1 mg metil palmitat, 988 $\mu$ L THF, 1 mg silibin, 8 unitati enzima    |
| <b>2TD/15-ASD</b>  | 4 mg metil palmitat, 988 $\mu$ L THF, 1 mg silibin, 4 unitati enzima      |
| <b>2TE/15-ASE</b>  | 12 mg metil palmitat, 988 $\mu$ L THF, 1 mg silibin, 4 unitati enzima     |
| <b>2TF/15-ASF</b>  | 8.1 mg metil laurat, 988 $\mu$ L THF, 1 mg of silibin, 4 unitati enzima   |
| <b>2TG/15-ASG</b>  | 8.1 mg metil oleat, 988 $\mu$ L THF, 1 mg silibin, 4 unitati enzima       |
| <b>2TI/15-ASI</b>  | 8.1 mg metil palmitat, 988 $\mu$ L etanol, 1 mg silibin, 4 unitati enzima |

Cele două biocompozite testate (de tip 2T și 15-AS) corespunzătoare fragmentelor PET cu suprafețe tratate în mod diferit au generat interacții diferite cu enzima în interiorul structurilor polimerice, conducând la valori diferite ale conversiei silibinului (Figura 6). În ambele cazuri, probele 2TA, 2TB și 2TC și 15-ASA, ASB și ASC diferă prin concentrația de enzima (crescătoare de la A la C).

Rezultatele (Figura 6) indică pentru ambele structuri un randament optim pentru 4 unități enzimice cu activitate catalitică utilizate și o scădere lentă a conversiei cu creșterea concentrației de enzima. Aceasta demonstrează că excesul de centri catalitici nu avantajează procesul, ei nefiind utilizați (limitare concentrație substrat).

Pentru probele 2TA, 2TC și 2TD și 15-ASA, ASE și ASD, masa de substrat adăugată a fost crescătoare. În cazul biocompozitelor 2T, creșterea concentrației de substrat nu a condus la îmbunătățirea randamentului conversiei silibinului, spre deosebire de biocompozitele 15-AS. Utilizarea agenților de acilare cu rest organic variat a dus la răspunsuri similare.



**Figura 6.** Eficienta sistemului biocatalitic de acilare a silibinului in conditii diferite de reactie, utilizand bio-compozitele PET de tip 2T si 15-AS. Modul de preparare a probelor este indicat in Tabelul 2.

Astfel, se poate concluziona ca sistemul enzimatic dezvoltat poate fi usor adaptat pentru **agenti de acilare diferiti**, demonstrand **versatilitatea sistemului realizat**.

Tinand cont de efectul solventul de reactie asupra activitatii catalitice a biocatalizatorului (Figura 4), a fost evaluata activitatea biocatalizatorului rezultat prin imobilizarea PSL2 s in solventii THF sau etanol. In acest caz, valorile conversiei silibinului nu sunt afectate semnificativ de tipul de solvent utilizat (Figura 6). Astfel, design-ul biocompozitelor a permis **conservarea activitatii** catalitice a enzimei in cadrul procesului de acilare a silibinului **in mediu de solvent organic**.

Pentru **validarea** sistemului enzimatic propus s-au efectuat masuratori ale conversiei silibinului utilizand o serie de catalizatori enzimatici la temperature diferite. Aceste teste au vizat derularea reactiei de acilare a silibinului la temperaturi de 25°C si 40°C in prezenta lipazei PSL2 in solutie si imobilizata cu cele doua tipuri de carbohidrati, prezum si a enzimelor comerciale Novozym 435 (Novozyme) si lipazele de *Candida cylindracea*, *Rizopous niveus*, *Porcine pancreas* si *Pseudomonas cepacia* (Sigma-Aldrich). Performantele sistemelor enzimactice au fost evaluate in functie de randamentul de conversie a silibinului in esterii ai acizilor grasi in prezenta diferitelor biocatalizatori (Tabel 3).

**Tabel 3.** Conversia silibinului in derivate esterice in cazul utilizarii PLS2 in diferite conditii si a altor biocatalizatori comerciali la 25°C si 40°C

| Biocatalizator                                              | Temp (°C) | Conversie silibin (%) |
|-------------------------------------------------------------|-----------|-----------------------|
| <b>PLS2</b>                                                 | 25        | 25,11                 |
| PLS2-k-caraginan                                            |           | 25,00                 |
| PLS2-Na-alginat                                             |           | 45,00                 |
| Novozym 435 ( <i>Novozymes</i> )                            |           | 1,50                  |
|                                                             |           |                       |
| <b>PLS2</b>                                                 | 40        | 29,25                 |
| Sol gel <i>Candida cylindracea</i> ( <i>Sigma-Aldrich</i> ) |           | 48,00                 |
| <i>Rizopous niveus</i> ( <i>Sigma-Aldrich</i> )             |           | 33,57                 |
| <i>Porcine pancreas</i> ( <i>Sigma-Aldrich</i> )            |           | 34,00                 |
| <i>Pseudomonas cepacia</i> ( <i>Sigma-Aldrich</i> )         |           | 36,16                 |

La temperatura de 25°C, PLS2 in stare nativa prezinta o conversie de 25,11 %, superioara (de 16,7 ori) biocatalizatorului comercial Novozyme 435 care a prezentat o conversie scazuta la aceasta temperatura (1,50%). Randamentul de conversie utilizand PLS2 a crescut pentru enzima imobilizata cu Na-alginat, conversia silibinului ajungand la 45%, indicand o activitate de 30 de ori mai ridicata decat aceasta lipaza comerciala.

La temperatura de 40°C, valorile de conversie sunt relative mai ridicate decat cele la 25°C, in particular pentru biocompozitele cu lipaza conventionala. In cazul PLS2, conversia silibinului a crescut cu 16% fata de cea la temperatura scazuta. Acesta demonstreaza un comportament tipic enzimelor de tip extremofil cold-active specific pentru procese enzimatice la temperaturi scazute. Totodata, confirma activitate catalitica a enzimei recombinante PLS2 din tulpina *Psychrobacter* SC65A3 pentru reactii de acilare a silibinului cu esterii ai acizilor grasi.

**In concluzie, metoda enzimatica realizata utilizand noua lipaza PLS2 prezinta avantaj in obtinerea esterilor de silibin printr-o conversie superioara la temperaturi scazute fata de enzimele comerciale.**

### 3.2 Producerea de batch-uri de esterii de silibin

Esterii de silibina au fost produsi in urma reactiei de transesterificare a silibinului cu esterii ai acizilor grasi (metil palmitat, metil laurat si metil oleat). Pentru separarea fractiei de esterii

rezultati in urma reactiei de transesterificare, s-a folosit metoda cromatografica in strat subtire cuplata cu detectie UV la 254/ 210 nm.

Amestecurile de solvent utilizate pentru separare au fost:

1. cloroform : acetona: acid formic = 75 : 16.5 : 8.5
2. benzen : acetat de etil = 70 : 30
3. acetat de etil : hexan = 40 : 60.

Testarea celor 3 amestecuri de solventi a indicat o eficienta similara a amestecului 3 prezinta eficienta similara pentru cele trei fractii F1, F2 si F3, fiind selectat pentru separarea fractiilor in vederea determinarii randamentului de obtinere a esterilor de silibina.

Fractiile obtinute in urma separarii TLC (F1 – silibinapalmitat, F2 – silibinalaurat, F3 – silibinaoleat) au fost caracterizate NMR pentru identificarea prezentei esterilor de silibina.

Producerea celor 3 batch-uri s-a realizat cu randamente cu valori apropiate in intervalul 32-40% (Tabel 4).

**Tabel 4.** Randamentul obtinerii batch-urilor de ester de silibina

| Batch | Randament (%) |
|-------|---------------|
| F1    | 32            |
| F2    | 40            |
| F3    | 35            |

### 3.3 Caracterizarea derivatilor de silibina

Fractiile F1, F2, F3 obtinute in sectiunea anterioara au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic (coeficientul de partitie octanol/apa (Log Kow)) si al proprietatilor organoleptice (aspect, culoare, miros). Rezultatele obtinute pentru cele 3 batch-uri de ester de silibina (Tabel 5) indicaun comportament dependent de restul organic acil inserat in structura silibinului in urma reactiei de acilare, valori Log Kow in intervalul 7,5-12.5, aspect uleios, culoare variind intre alb-galbui pana la galben inchis si miros chimic.

**Tabel 5.** Caracteristicile derivatilor de silibina obtinuti

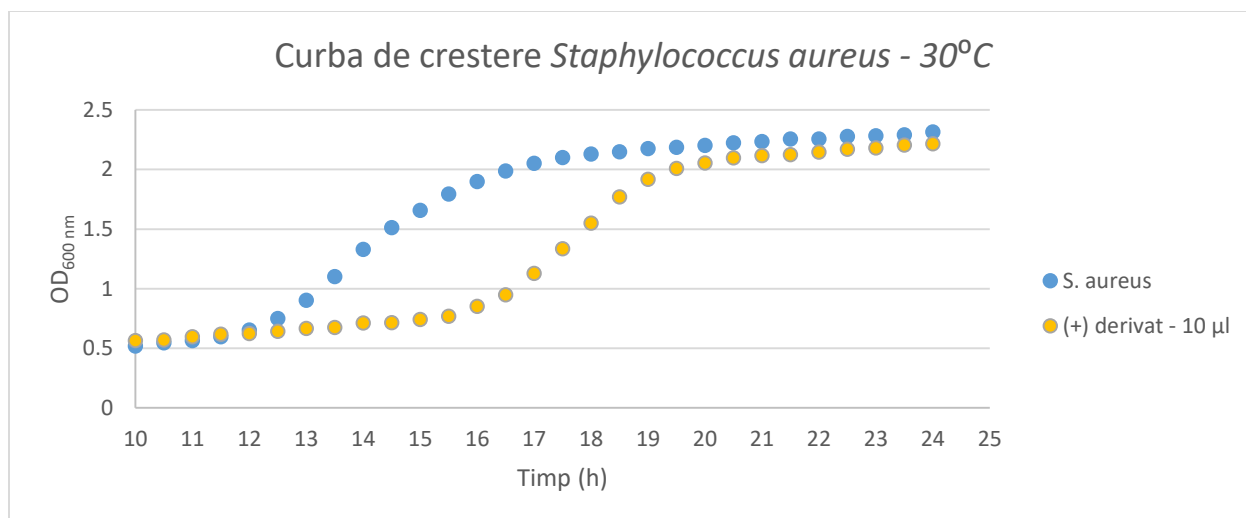
| Caracteristici                               | F1            | F2         | F3     |
|----------------------------------------------|---------------|------------|--------|
| Rest organic acil                            | C16,1         | C12,0      | C16,0  |
| Coeficient de partitie octanol/apa (Log Kow) | 10.7          | 7.5        | 12.5   |
| Culoare                                      | Galben inchis | Alb galbui | galben |
| Aspect                                       | uleios        | uleios     | uleios |
| Miros                                        | chimic        | chimic     | chimic |

Amestecul de esteri ai silibinului obtinuti in urma separarii au prezentat o buna solubilitate in mediu hidrofob, in acord cu structura chimica a esterilor de silibina in care component dominanta este structura silibinului cu un puternic caracter hidrofob.

#### **Caracterizarea proprietatilor biologice ale derivatilor de silibina**

Efectul derivatilor de silibina obtinuti asupra parametrilor de crestere a tulpinii bacteriene de *Staphylococcus aureus* a fost determinat prin suplimentarea in mediu de cultura cu esteri de silibina (10  $\mu$ l in solvent DMSO). Cultivarea s-a realizat la 30°C prin inocularea a 170  $\mu$ l mediu de cultura Luria Bertani (LB) continand 10% inocul bacterian corespunzator unei valori 0.5 McFarland ( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml). Testul s-a realizat in triplicat pentru culturile obtinute timp de 24 h in mediu LB, LB suplimentat cu DMSO si LB suplimentat cu esteri de silibina, in placi sterile de 96 godeuri (RatioLab). Efectul asupra curbei de crestere s-a determinat spectrophotometric la OD<sub>600 nm</sub> prin masuratori la 30 min cu un spectrometrul tip Omega plate reader.

Curbele de crestere la 30°C (Figura 7) rezultate dupa eliminarea efectului inhibitor al DMSO (~2%) in prezenta si absenta esterilor de silibina indica modificari aduse atat la nivelul perioadei de lag cat si a ratei de crestere in faza exponentiala, cu atingerea unei densitati optice similare in faza stationara. In aceste conditii, efectul de stimulare a ratei de crestere bacteriana in prezenta a 10  $\mu$ l ester de silibina (1 mg/ml in DMSO) in concentratie finala de 60  $\mu$ g/ml in mediu de cultura a fost de 11,5% (Tabel 6).



**Figura 7.** Efectul esterilor de silibina asupra curbei de crestere bacteriana

In cazul cultivarii la temperatura optima de crestere a acestei specii bacteriene (37°C), prezenta derivatilor de silibina suplimentati in mediu a avut un efect pozitiv atat asupra fazei de lag prin reducerea acesteia cu 12-22%, cat si prin imbunatatirea ratei de crestere cu 10,9-11% in cazul concentratiilor de 30 µg/ml si 60 µg/ml utilizate (Tabel 6).

**Tabel 6.** Efectul esterilor de silibina asupra parametrilor de crestere bacteriana la 30 °C si 37 °C

| Cultura bacteriana<br>± derivat                      | Temperature<br>(°C) | Faza de lag<br>(h) | Rata de<br>crestere<br>(OD/h) | % imbunatatire<br>rata crestere |
|------------------------------------------------------|---------------------|--------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i>                         | 30                  | 11,5               | 0,3842                        | -                               |
| <i>Staphylococcus aureus</i> +<br>derivat (60 µg/ml) | 30                  | 15,5               | 0,4284                        | 11,5                            |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                         | 37                  | 1,30               | 0,745                         | -                               |
| <i>Staphylococcus aureus</i> +<br>derivat (30 µg/ml) | 37                  | 1,15               | 0,808                         | 10,9                            |
| <i>Staphylococcus aureus</i> +<br>derivat (60 µg/ml) | 37                  | 1,02               | 0,823                         | 11,0                            |

### 3.4 Caracterizarea uleiului de armurariu imbogatit

#### Caracterizarea fizico-chimica a uleiului de armurariu imbogatit

Indicii specifici uleiurilor vegetale au fost determinați în conformitate cu procedurile standard. Au fost testate două probe S4-a și S4-b de ulei de armurariu imbogatit cu derivat de silibin, și amestecul inițial în absența reacției de derivatizare cu același raport ulei/silibinin, notat ca Si. Rezultatele determinărilor fizico-chimice sunt prezentate în Tabelul 7.

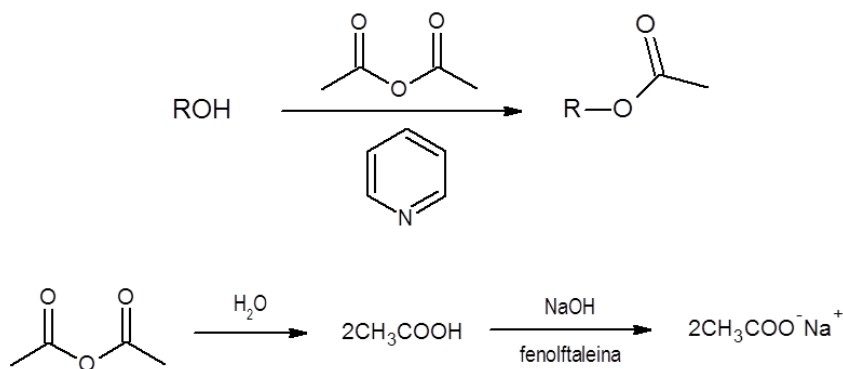
**Tabelul 7.** Parametrilor fizico-chimici ai uleiului de armurariu și probele înainte și după reacție

| Indici | S4-a  | S4-b  | Si    | ulei armurariu |
|--------|-------|-------|-------|----------------|
| Ii     | 119.6 | 119.6 | 119.6 | 117.5          |
| Ia     | 11.4  | 11.1  | 12    | 11.4           |
| Is     | 163.4 | 174.6 | 181.3 | 189            |
| Ip     | 9.8   | 9.9   | 9.9   | 9.8            |

Ii – indice de iod, Ia – indice de aciditate, Is – indice de saponificare, Ip - indice de peroxid

În comparație cu uleiul de armurariu inițial se observă o creștere ușoară a valorilor indicilor de iod (Ii) și de aciditate (Ia) în amestecul inițial cu silibinin. În urma reacțiilor enzimatice acești indici nu se modifică considerabil, sugerând același grad de nesaturare și pondere a acizilor grași liberi. Aceeași observație este valabilă și pentru indicele de peroxid (Ip) care nu a variat considerabil. Cea mai importantă variație se observă pentru indicele de saponificare (Is), care scade de la 189 la 181.3 în amestecul inițial comparativ cu uleiul de armurariu. Această scădere însă poate fi corelată cu o masă mai mică a uleiului în probă, impusă pentru a obține o concentrație de silibin ester în proba care să fie detectabilă prin metodele de analiză alese. După reacția enzimatică, valoarea Is scade considerabil la 174.6 pentru S4-b și respectiv 163.4 pentru S4-a. Un indice de saponificare mai mic indică o masă moleculară medie mai mare a resturilor de acizi grași prezenți în molecula esterilor și prin urmare mai puține legături esterice. Cu toate acestea, valoarea Is depinde și de tipul de ester, iar având în vedere că timpul reacției de saponificare a fost același pentru toate analizele, o variație a Is poate sugera că în urma reacției enzimatice au avut loc transesterificări cu formarea unor esteri mai complecși.

Pe lângă indicii determinați în mod uzual pentru ulei a fost determinat și indicele de hidroxil (Ih) care indică prezența grupărilor hidroxilice în compus. Grupările hidroxilice din proba analizată reacționează cu anhidrida acetică în prezența piridinei. La finalul reacției, anhidrida netransformată este convertită în prezența apei în acid, care este titrat cu o bază (Figura . Reacția este prezentată în Figura 8.



**Figura 8.** Schema reacției pentru determinarea indiceleui de hidroxil

Pentru determinarea valorilor Ih, 0.5 g din probă au fost refluxate cu un amestec de piridină și anhidridă acetică (3:1 v/v) timp de o oră. La finalul reacției refrigerentul a fost spălat cu 20 mL de apă distilată. Soluția obținută a fost amestecată și răcită, după care a fost titrată cu o soluție de NaOH 0.5N, folosind fenoftaleina drept indicator. Proba control a fost realizată în mod similar. Ih este exprimat ca mg de NaOH / 1g de probă.

$$\text{Ih (necorectat)} = 40 \cdot (\text{B}-\text{S})\text{N}/\text{W},$$

unde B=Volumul in ml de NaOH folosit pentru blanc, S=Volumul in ml de NaOH folosit pentru proba, N=concentratia normal a NaOH, W=masa probei.

Deoarece acizilor grași liberi din probă pot reacționa cu NaOH în procesul titrării, Ih poate fi corectat cu indicele de aciditate determinat separat pentru aceeași probă.

$$\text{Ih (corectat)} = \text{Ih (necorectat)} + \text{Ia}$$

Grupările hidroxilice pot fi determinate ca procent %OH.

$$\% \text{OH} = \text{Ih (corectat)} / 32.98$$

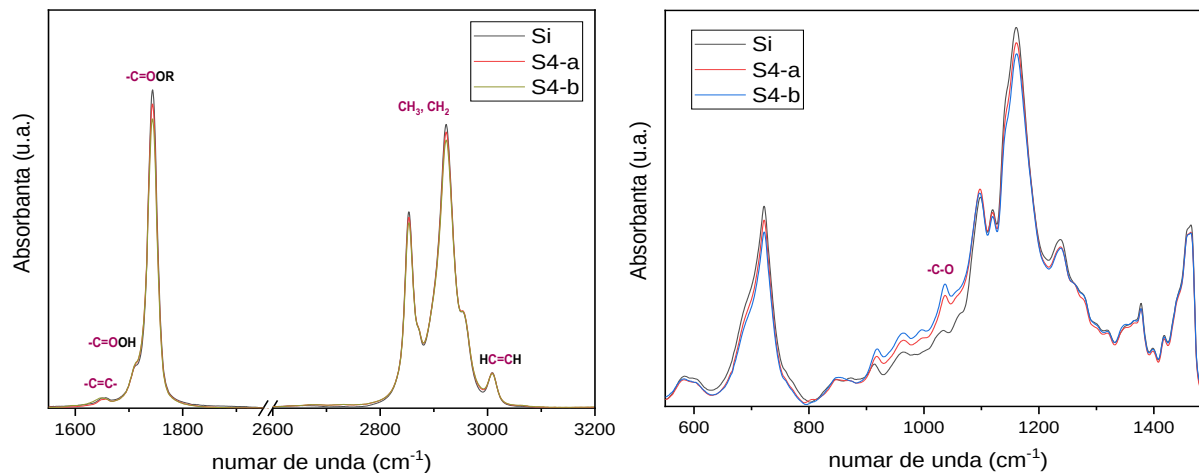
Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 8.

**Tabelul 8.** Valorile indicilor I<sub>h</sub> și %OH determinate pentru probele înainte și după reacție.

| Indici I <sub>h</sub>       | S4-a  | S4-b  | Si    |
|-----------------------------|-------|-------|-------|
| I <sub>h</sub> (necorectat) | 162.7 | 115.2 | 310.6 |
| I <sub>h</sub> (corectat)   | 174.1 | 126.3 | 322.6 |
| %OH                         | 5.3   | 3.8   | 9.8   |

În conformitate cu datele obținute, ponderea grupărilor hidroxicale libere după reacțiile enzimatică scade considerabil cu aproximativ 45 și 60% în probele S4-a și S4-b comparativ cu Si. Având în vedere că o mare parte a grupărilor –OH provin din silibinin, se poate concluziona că acești hidroxi liberi au fost implicați în formarea unor noi legături, cel mai probabil esterice.

Spectrele FTIR-ATR ale probelor Si, S4-a și S4-b (Figura 9) indica cele 3 regiuni importante din structura acestora. Astfel, se observa ca benzile specifice pentru silibinin nu pot fi detectate, contribuția majoră fiind a vibrațiilor specifice grupărilor funcționale din uleiurile vegetale. În regiunea cuprinsă între 1600 și 3200 cm<sup>-1</sup> nu se observă modificări importante ale intensităților benzilor specifice vibrațiilor grupărilor nesaturate sau carboxilice din acizii grași liberi, fapt confirmat și de valorile I<sub>i</sub> și I<sub>a</sub>. O ușoară scădere a intensităților benzilor specifice grupărilor esterice și grupărilor –CH<sub>2</sub>, –CH<sub>3</sub> poate fi observată pentru probele S4-a și S4-b obținute după reacția enzimatică. În regiunea de amprentă a spectrului FTIR poate fi din nou observată modificarea intensităților benzilor la 721cm<sup>-1</sup>, asociate vibrațiilor de deformare a grupărilor — (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> și la 1031cm<sup>-1</sup>, 1097cm<sup>-1</sup>, 1120cm<sup>-1</sup>, 1160cm<sup>-1</sup> corespunzând vibrațiilor de întindere a grupărilor –C–O caracteristice esterilor alifatici. O scădere a intensității se observă și pentru benzile asociate vibrațiilor –O–CH<sub>2</sub> din structura glicerolului la 1377cm<sup>-1</sup> (Arslan, F.N., Çağlar, F. *Attenuated Total Reflectance–Fourier Transform Infrared (ATR–FTIR) Spectroscopy Combined with Chemometrics for Rapid Determination of Cold-Pressed Wheat Germ Oil Adulteration. Food Anal. Methods* **12**, 355–370 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1368-x>). O diferență importantă în spectrele probelor S4-a și S4-b se observă prin deplasarea benzii de la 1031cm<sup>-1</sup> în proba Si, corelată cu grupările –C–O ale esterilor, la 1033 cm<sup>-1</sup> și o creștere a intensității acesteia. Având în vedere că spectrele ATR-FTIR pot indica doar o modificare a grupărilor funcționale în ulei, se poate constata că **cele mai importante schimbări au avut loc la nivelul legăturii C-O din grupările esterice, fapt confirmat și de analizele fizico-chimice.**

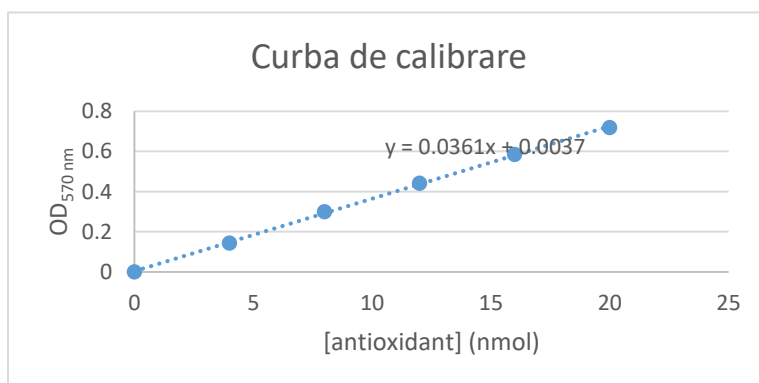


**Figura 9.** Spectrele FTIR-ATR înregistrate pentru probele SI, S4-a și S4-b

### Caracterizarea enzimatica a uleiului de armurariu imbogatit

Activitatea antioxidanta a uleiului de armurariu imbogatit cu derivatul de silibina obtinut a fost evaluata in comparatie cu uleiul comercial suplimentat cu concentratii diferite de esteri de silibina.

Tinand cont de solubilitatea produsilor de esterificare ai silibinului, s-a obtinut un stoc de produs dizolvat in matricea uleiului de armurariu de 1 mg/ml ulei, utilizat pentru testarea efectului antioxidant in diferite concentratii. Metoda s-a bazat pe masurarea capacitatii totale antioxidante prin metoda spectrofotometrica utilizand sistemul *Total Antioxidant Capacity Assay Kit* (Sigma-Aldrich). Curba de calibrare a absorbantei la 570 nm corespunzatoare reducerii ionilor de  $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{+}$  s-a obtinut pentru intervalul 0-20 nmoli.



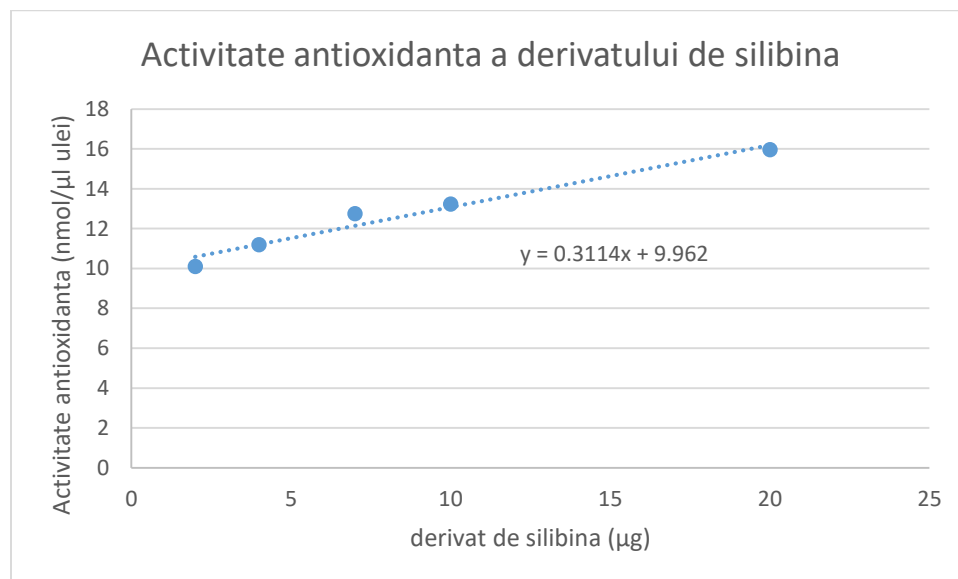
**Figura 10.** Curba de calibrare pentru activitatea antioxidanta

Valorile activitatii antioxidante ale uleiului de armurariu imbogatit cu esterii de silibina suplimentate in cantitati diferite (Tabel 9).

**Tabel 9.** Activitatea antioxidanta a uleiului de armurariu imbogatit cu esterii de silibina

| Proba ulei armurariu<br>( $\pm$ esterii de silibina - EB) | Activitate antioxidanta<br>ulei imbogatit<br>(nmol/ $\mu$ l ulei) | Activitate antioxidanta<br>suplimentara<br>(%) |
|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Ulei                                                      | 5,13                                                              | -                                              |
| Ulei + 2 $\mu$ g EB                                       | 10,09                                                             | 96,7                                           |
| Ulei + 4 $\mu$ g EB                                       | 11,18                                                             | 117,9                                          |
| Ulei + 7 $\mu$ g EB                                       | 12,75                                                             | 148,5                                          |
| Ulei + 10 $\mu$ g EB                                      | 13,22                                                             | 157,7                                          |
| Ulei + 20 $\mu$ g EB                                      | 15,96                                                             | 211,1                                          |

Activitatea antioxidanta a uleiului de armurariu imbogatit cu esterii de silibina obtinuti prin noua metoda catalitica indica o crestere a potentialului antioxidant al uleiului in intervalul 10,09-15,96 nmol/ $\mu$ l ulei, corespunzator unei activitati suplimentare de 96,7-211,1% nmol/ $\mu$ l/ $\mu$ g derivat de silibina in functie de cantitatea de esterii de silibina adaugata (2-20  $\mu$ g) (Tabel 8).



**Figura 11.** Activitatea antioxidanta a derivatului de silibina suplimentat in uleiul de armurariu

Activitatea antioxidanta suplimentara datorata esterilor de silibina adaugati in uleiul de armurariu corespunde unei valori de 0.3114 nmol/μl ulei/μg derivat (Figura 11).

### 3.5 Obținerea de batch-uri de ulei de armurariu îmbogățit

Pe baza rezultatelor obtinute privind proprietatile enzimatice si fizico-chimice ale uleiului de armurariu îmbogățit cu esterii de silibina rezultati prin procesul de transesterificare utilizand noua lipaza recombinanta cold-active imobilizata au rezultat preparate de ulei de armurariu cu caracteristici superioare privind capacitatea antioxidanta in vederea reducerii a numeroase afectiuni ale ficatului, neurologice, in tratarea dislipidemiei, a osteoporozei, a acneei, a nivelului glicemic, etc (*Karimi G, et al., "Silymarin", a promising pharmacological agent for treatment of diseases. Iran J Basic Med Sci. 2011 Jul;14(4):308-17.*

### 3.6 Diseminarea rezultatelor si managementul proiectului

In cadrul etapei 3/2022 a proiectului au avut loc 5 reuniuni de lucru ale consorțiului, s-au obtinut 2 produse si s-a elaborat 1 noua metoda. Diseminarea rezultatelor a cuprins 3 articole (1 publicat, 1 in evaluare si 1 in curs de redactare), o aplicatie de brevet national (OSIM) si participarea la 5 conferinte nationale (1) si internationale (4).

#### **REUNIUNI DE LUCRU PARTENERI IBB-UB (5)**

9 martie 2022, 3 iunie 2022, 6 septembrie 2022, 15 septembrie 2022, 14 octombrie 2022

#### **PRODUSE (2)**

1. Enzima PSL2 recombinanta purificata
2. Biocatalizator lipazic prin incapsularea lipazei PSL2

#### **METODE (1)**

1. derivatizare enzimatica a silibinului folosind lipaza bacteriana psihrofila

#### **ARTICOLE (3)**

1. Paun VI, Banciu RM, Lavin P, Vasilescu A, Fanjul-Bolado P, Purcarea C (2022) Antarctic aldehyde dehydrogenase from *Flavobacterium* PL002 as a potent catalyst for acetaldehyde determination in wine. *Scientific Reports*, DOI: 10.1038/s41598-022-22289-8 (Q2)

2. Paun VI, Ion S, Gheorghita GI, Ftodiev A, Sandulescu-Tudorache M, Purcarea C. Cold-active lipase from the ice cave *Psychrobacter* SC65A.3 strain, a new catalyst for silymarin valorization. *Molecules*, [in evaluare \(Q2\)](#)
3. Ion S, Ftodiev A, Gheorghita G, Paun VI, Purcarea C, Tudorache M. New biocatalytic method for silibin derivatization using a cold-active lipase from *Psychrobacter* SC65A3, [in curs de redactare \(Q1/Q2\)](#)

### **APLICATIE BREVET NATIONAL (1)**

Metodă de obținere a lipazei bacteriene PSL-2 din tulpina bacteriană *Psychrobacter* SC65A3 izolată din gheața de peșteră din Ghețarul Scărișoara. *Autori:* Purcărea Cristina, Păun Victoria Ioana, Ojovan Bianca-Oana, Sandulescu-Tudorache Mădălina, Ion Sabina (OSIM) – [Numar inregistrare: A/00652/19.10.2022](#)

### **CONFERINTE (5) – 3 prezentari orale si 2 postere**

**13<sup>th</sup> International Symposium of the Romanian Catalysis Society. RomCat 2022**, Baile Govora, Romania, 22-24 iunie 2022

Giulia Gheorghita, Sabina Ion, Andreea Ftodiev, Victoria I. Paun, Cristina Purcarea, Madalina Tudorache. Biocatalytic system for silymarin derivatization based on cold-active lipase biocatalyst. [Poster](#)

**10<sup>th</sup> SCAR Open Science Conference**. Online 1-10 august 2022.

Victoria I. Paun, Antonio Mondini, Zohaib Anwar, Paris Lavin, Lea Ellegaard-Jensen, Carsten Suhr Jacobsen, [Cristina Purcarea](#). Ice microbiome response to thermal stress. [Prezentare orală](#)

**9<sup>th</sup> IUPAC International Conference on Green Chemistry**. Atena, Grecia 5-9 septembrie 2022,

Giulia Gheorghita, Sabina Ion, Andreea Ftodiev, Victoria I. Paun, Cristina Purcarea, [Madalina Tudorache](#). Silymarin derivatization using biocatalytic system based on cold-active lipase biocatalyst. [Prezentare orală](#)

**13<sup>th</sup> International Congress on Extremophiles**, Loutraki, Grecia, 18-22 septembrie 2022.

Sabina Ion, Victoria I. Paun, Giulia R. Gheorghita, Andreea Ftodiev, Simona Neagu, Madalina Tudorache, Cristina Purcarea. Psychrophilic bacterial lipase for improved biocatalytic acylation process in oil industry. [Poster](#)

**Conferinta de Microbiologie "G. Zarnea"**. Bucuresti, 29 septembrie 2022.

[Victoria I. Paun](#), Roberta Banciu, Alina Vasilescu, Sabina Ion, Madalina Sandulescu, Cristina Purcarea. Enzyme din bacterii psihrofile cu potential aplicativ. [Prezentare orală](#)

**Director de proiect**

Dr. Cristina Purcarea  
Data: 31.10.2022

