



Universitatea Babeş-Bolyai
Cluj-Napoca
Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică



Identificarea de noi surse naturale de enzime hidrolitice cu aplicații potențiale în biotransformări selective

Rezumat

Conducător științific
Prof.dr.ing. Florin Dan Irimie

Student-doctorand
Laura-Mihaela Chiș

Cluj-Napoca
2012



UNIUNEA
EUROPEANĂ



GUVERNUL
ROMÂNIEI
MINISTERUL
MUNCII, FAMILIEI
ȘI
PROTECȚIEI
SOCIALE
AMPOSDRU



Fondul Social
European
POSDRU 2007-2013



Instrumente
Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
CERCETĂRII
TINERETULUI
ȘI SPORTULUI

OIPOSDRU



UNIVERSITATEA
BABEȘ-BOLYAI
CLUJ-NAPOCA

Investing in people!

Ph.D. scholarship, Project co-financed by the SECTORAL OPERATIONAL PROGRAM FOR HUMAN RESOURCES DEVELOPMENT 2007 - 2013

Priority Axis 1. "Education and training in support for growth and development of a knowledge based society"

Key area of intervention 1.5: Doctoral and post-doctoral programs in support of research.

Contract nr.: **POSDRU/88/1.5/S/60185** – "INNOVATIVE DOCTORAL STUDIES IN A KNOWLEDGE BASED SOCIETY" Babeș-Bolyai University, Cluj-Napoca, Romania

Universitatea Babeș-Bolyai

Cluj-Napoca

Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică

Teză de doctorat

Laura-Mihaela Chiș

Conducător științific: Prof. Dr. Florin Dan Irimie - Babeș-Bolyai University, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering

Presedintele comisiei: Prof. Dr. Cristian Silvestru - Babeș-Bolyai University, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering

Referenți:

Prof. dr. Carmen Socaciu, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Faculty of Agriculture, Departament of Chemistry and Biochemistry

Prof. dr. Nicolae Dragoș, Babeș-Bolyai University Cluj-Napoca, Faculty of Biology and Geology

Prof. dr. Valentin Zaharia, University of Medicine and Pharmacy Cluj-Napoca, Faculty of Pharmacy

Cuvinte cheie:

- ✓ bacterii termofile
- ✓ purificare proteine
- ✓ clonare moleculară
- ✓ Est/Lip periplasmică
- ✓ optimizare exprimare proteică
- ✓ optimizare purificare Est/Lip
- ✓ biocataliză

Cuprins

I. ASPECTE TEORETICE	7
CAPITOLUL 1. Introducere generală	7
1.1. Biocatalizatori vs. catalizatori chimic. Aplicații ale biocatalizei	7
1.2. Carboxil-esterase: definiție și funcție	8
1.2.1. Definiția carboxil-esterazelor	8
1.2.2. Surse și funcții	9
1.3. Carboxil-esterase bacteriene	11
1.3.1. Structura generală a carboxil-esterazelor	11
1.3.2. Structura situsului catalitic	12
1.3.3. Lid: structură și funcții	14
1.3.4. Clasificarea carboxil-esterazelor microbiene	17
1.3.5. Cum să diferențiem esterazele de lipaze?	19
1.4. Detectarea activității esterolitice/lipolitice	22
1.4.1. Metode calitative	22
1.4.2. Metode cantitative	23
1.4.3. Alte metode	24
1.5. Procedee de purificare	25
1.5.1. Metode de precipitare	25
1.5.2. Metode bazate pe tehnici cromatografice	26
1.6. Clonare moleculară	29
1.7. Microorganisme termostabile și enzimele acestora	32
1.7.1. Enzime termostabile: proprietăți și caracteristici	33
1.7.2. Carboxil-esterase termostabile	35
II. PARTE EXPERIMENTALĂ	36
Materiale și metode generale	37
Capitolul 2. Izolarea, identificarea și caracterizarea unei tulpine bacteriene, sursa unei enzime hidrolitice termostabile	39
2.1. Introducere	39
2.2. Materiale și metode	39

2.3. Resultate și discuții.....	42
2.3.1. Testarea activității enzimaticice ale tulpinilor bacteriene izolate.....	42
2.3.2. Identificarea tulpinii	43
2.3.3. Identificarea genetică a tulpinii bacteriene izolate	45
2.3.4. Caracterizarea creșterii celulare și a producției esterazei/lipazei	46
2.3.5. Producția Est/Lip în medii suplimentate cu ulei.....	49
2.4. Concluzii	50
Capitolul 3. Purificarea carboxil-esterasei în formă nativă	51
3.1. Introducere	51
3.2. Materiale și metode	52
3.3. Resultate și discuții.....	57
3.3.1. Purificarea Est/Lip prin metode de precipitare.....	57
3.3.2. Purificarea Est/Lip utilizând metode cromatografice	58
3.3.3. Purificarea Est/Lip cu ajutorul unor agenți de precipitare specifici	61
3.3.4. SDS-PAGE preparativ pentru purificarea Est/Lip.....	62
3.3.5. Caracterizarea activității lipolitice a extractului enzimatic brut obținut în urma precipitării cu acetonă.....	63
3.4. Concluzii	70
Capitolul 4. Clonarea și caracterizarea Est/Lip termostabilă din <i>Anoxybacillus flavithermus</i> T1	71
4.1. Introducere	71
4.2. Materiale și metode	71
4.3. Resultate și discuții.....	78
4.2.1. Clonarea moleculară și analiza <i>in silico</i> a genei Est/Lip	78
4.2.2. Modelarea structurii tridimensionale a Est/Lip	80
4.2.3. Exprimarea și purificarea Est/Lip recombinat	83
4.2.4. Caraterizarea biochimică a Est/Lip	84
4.4. Concluzii	93
Capitolul 5. Optimizarea exprimării și a purificării proteice	95
5.1. Introducere	95
5.2. Materiale și metode	96

5.3. Resultate și discuții.....	98
5.3.1. Efectele concentrației de IPTG în relație cu timpul și temperatura de inducere	98
5.3.2. Inducerea exprimării proteice cu IPTG vs. lactoză	101
5.3.3. Destabilizarea membrana	103
5.4. Concluzii	105
Capitolul 6. Aplicații ale Est/Lip recombinată din <i>A.flavithermus</i> T1 în reacții de biotransformare.....	107
6.1. Introducere	107
6.2. Materiale și metode	107
6.3. Resultate și discuții.....	109
6.4. Concluzii	110
III. DISCUȚII GENERALE	111
IV. CONCLUZII GENERALE	113

Introducere generală

Biocataliza joacă un rol important în industria modernă îndeosebi în domenii precum chimia organică și farmaceutică. Utilizarea biocatalizatorilor are drept scop îmbunătățirea condițiilor în care se desfășoară numeroase reacții, în special găsirea unor condiții compatibile cu mediul înconjurător.

Enzimele sunt biocatalizatori de mare importanță. Produse și modificate de către natură sunt de probabil subestimate și încă slab exploatate. În ultimele decenii s-au depus numeroase eforturi pentru a descoperi biocatalizatori eficace în diverse domenii (Arpigny and Jaeger, 1999). Acest fenomen s-a materializat în tot acest timp în numeroase publicații care descriu purificarea și caracterizarea de noi surse naturale de biocatalizatori.

În ultimii ani tot mai multe enzime de proveniență termofilă, cu precădere cele hidrolitice, au câștigat din ce în ce mai mare atenție în rândul cercetătorilor atât din domeniul microbiologiei cât și al chimiei. Există o continuă căutare de noi microorganisme de acest tip și enzimele lor, pentru simplul fapt că acestea au proprietăți speciale, dorite în biocataliză. Acestea sunt testate și caracterizate în vederea descoperirii de noi utilizări sau în scopul utilizării lor în procese vechi, în detrimentul catalizatorilor chimici.

Teza de față se rezumă la izolarea și caracterizarea unei noi surse indigene de biocatalizatori. Gena esterazei/lipazei din *Anoxybacillus flavithermus* a fost de asemenea clonată în *Escherichia coli*, purificată și caracterizată. Importanța enzimei în reacții de biocataliză a fost pusă în evidență în cadrul unor reacții selective.

Capitolul 1.

Primul capitol a fost axat pe studiul de literatură ce a avut în vedere date generale despre enzime hidrolitice precum lipazele și esterazele, metode de detectare și de purificare a acestora în stare nativă sau recombinată. Ultima parte a acestei introduceri a fost dedicată microorganismelor termofile și a enzimelor respective.

Capitol 2. Izolarea, identificarea și caracterizarea unei tulpini bacteriene, sursa unei enzime hidrolitice termostabile

În capitolul 2 am descris izolarea și caracterizarea unei tulpini indigene de *A. flavithermus*. De asemenea am verificat capacitatea microorganismului de a secreta o enzimă cu activitate lipolitică prin reacția de hidroliză a unui substrat specific lipazelor, *p*NPP, în funcție de temperatură, variație de pH, timp de creștere bacteriană și inductori ai enzimei.

Rezultate

Probele de apă din locațiile alese au fost transportate de la fiecare locație în recipiente termostate sterile și cultivate pe mediu LB-agar. De pe cele 4 plăci obținute, câte una pentru fiecare zonă, câte o colonie a fost apoi crescută în mediu LB-lichid. Activitatea lipolitică a fost urmărită utilizând *p*-nitrofenil palmitat drept substrat, iar proba enzimatică în această etapă a constat din supernatantul celular.

Colonia izolată din proba din izvorul termal din Tășnad a prezentat cea mai mare activitate lipolitică extracelulară, astfel că acesta a fost alesă pentru experimentele ulterioare. Caracteristicile morfologice și biochimice ale tulpinii bacteriene izolate au fost evaluate concomitent cu determinarea genetică a bacteriei.

Analiza genetică a indicat izolarea unei tulpini de *Anoxybacillus flavithermus* (identitate maximă obținută față de *Anoxybacillus flavithermus* AE3). Ulterior, tulpina a fost depusă la Colecția Națională de Microorganisme Agricole și Industriale din Budapesta, Ungaria, având numărul de acces NCAIM B 02482.

Principalele caracteristici (morfologice, fiziologice și biochimice) ale noii tulpini izolate sunt enumerate în tabelul 1.

Tabelul 1. Rezultatele testelor de caracterizare ale tulpinii izolate. + Indică o reacție pozitivă, - reacție negativă, +/- un rezultat slab.

Morfologie		Biochimie	
Forma celulară	bastonașe	Hidroliza:	
Mărime (medie)	lungimi 4.0-5.0 μm,	Gelatină	+

	lățime >0.5 μm		
Endospori	+	Amidon	-
poziție	terminali	Uree	-
formă	elipsoidali/cilindrici	Producerea de catalază	-
Motilitate	+/-	Producerea/formarea de:	
Colonii	circulare, galbene, convexe, Φ1-3 mm	H ₂ S	-
Colorație Gram	variabilă	Compuși indolici	-
Chemotip-Gram	pozitiv	Acetoină	-
Biochimie		Fiziologie	
Creștere pe:		Creștere anaerobă	+/-
NaCl 0.5-3%	+	Domeniul de pH	5.5-8.5
5%	-	Domeniul de temperatură (°C)	37-70
Mediu cu ou	+/-		
Agar cu sânge	-		
Bulion de carne	-		
Utilizare:			
D-Glucoză	+		
Manitol	-		
Inozitol	-		
D-Sorbitol	-		
L- Ramnose	-		
D- Zaharoză	+		
D- Melibioză	+		
Amigdalină	-		
L- Arabinoză	+		
Citrat	-		

Producția carboxil-esterazei a fost monitorizată variind temperature și pH-ul pe o anumă durată a creșterii bacteriei *Anoxybacillus flavithermus* T1. Secreția maximă de enzimă a fost înregistrată la o temperatură de 60°C, la pH 8 și în urma a 16 h de creștere celulară. De asemenea, s-a încercat indecerea secreției enzimatică prin suplimentarea mediului de cultură cu diferite uleiuri comerciale în concentrație de 1,5%: ulei de floarea soarelui, ulei de măsline sau ulei de palmier. Cel mai bun rezultat a fost înregistrat în cazul adăugării în mediu a uleiului de floarea soarelui.

Capitolul 3. Purificarea carboxil-esterazei nativă

Al treilea capitol descrie purificarea parțială a Est/Lip nativă din *A. flavithermus* T1 prin metode clasice, precum utilizarea precipitării cu sulfat de amoniu, a precipitării cu acetonă ca metode de purificare grosieră și cromatografia de schimbători de anioni și hidrofobă, în vederea purificării fine. De asemenea am utilizat o nouă procedură bazată pe precipitarea specifică a lipazelor, utilizată anterior de către Gorokhova *et al.* (2002) doar ca o metodă de imobilizare și activare a lipazelor.

Rezultate

Rezultatele experimentale au arătat faptul că prin precipitare cu sulfat de amoniu enzima a pierdut o mare parte din activitate. Precipitarea cu acetonă, preferabilă atât din punct de vedere al timpului cât și a activității obținute s-a dovedit a fi o alternativă bună. În urma trecerii probelor obținute în etapa de precipitare pe cromatografia de schimbători de anioni sau hidrofobă activitatea enzimatică nu a fost recuperată deloc (precipitat cu sulfat de amoniu) sau într-o mică măsură (precipitat cu acetonă). Analiza fracțiilor pe gel de electroforeză în condiții denaturante a arătat un grad mare de contaminare a fracțiilor obținute în urma cromatografiei.

Metoda utilizată pentru precipitarea specifică a Est/Lip în cazul nostru s-a dovedit a nu fi specifică pentru enzima de interes. În schimb potrivit analizelor MS, proteina precipitată majoritar prin această metodă a fost o glicoproteine din stratul-S membranar.

Impedimentele ivite în etapele de purificare a enzimei hidrolitice prin metodele clasice sau prin precipitare specifică ne-a determinat să continuăm cu caracterizarea acesteia în stare parțial purificată. Astfel, preparatul enzimatic brut (precipitatul cu acetonă) este caracterizat de o temperatură optimă înaltă (fig. 1) și o stabilitate ridicată la temperaturi de până la 98°C. pH-ul optim este de 7,8 (fig. 2), enzima fiind stabilă la valori de pH din gama alcalină (7.4-9.0), păstrând cel puțin 70% din activitatea sa după o incubare de 30 min. În afara acestui interval, activitatea sa scade rapid.

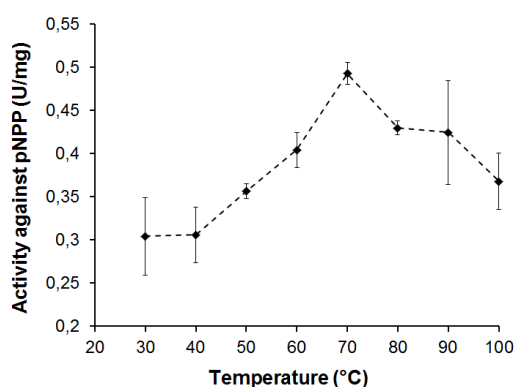


Figura 1. Profilul de temperatură al extractului enzimatic crud

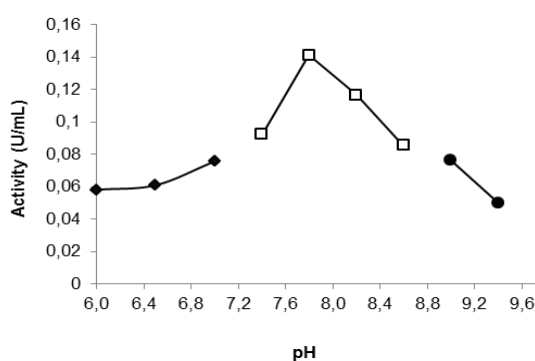


Figura 2. Profilul de pH al enzimei parțial purificate

Preparatul enzimatic obținut prin precipitare cu acetonă a arătat o ușoară creștere a activității atunci când a fost incubată în prezență de 1 mM Ba^{2+} , Mn^{2+} și Fe^{3+} timp de 30 sau 45 de minute la 60°C. Toți ceilalți cationi (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+}) însă par să nu aibă nici un efect sau prezintă un efect inhibitor moderat asupra carboxil-esterazei.

Printre solvenții organici utilizați pentru a verifica stabilitatea carboxil-esterazei, acetona și izopropanolul au dus la o creștere a activității enzimatiche chiar și după o incubare de 15h la 60°C. Cu toate acestea, acetatul de etil, metanolul, etanolul și acetonitrilul au demonstrat un efect inhibitor puternic asupra activității preparatului enzimatic brut.

În urma incubării timp de 30 minute și la o temperatură de 60°C în prezență de 1 mM detergenți/modulatori enzima nu a fost inhibată sau activată semnificativ. EDTA a inhibat Est/Lip cu un procent de 12%, iar SDS-ul a dus la o creștere a activității cu mai mult de 50%.

În vederea stabilirii specificității de substrat a preparatului enzimatic brut s-au folosit esteri ai *p*NP iar activitățile obținute sunt prezentate mai departe, exprimate în U/mL * 10³: *p*NP-acetat: 34.3; *p*NP-propionate: 35.5; *p*NP-butirat: 9.0; *p*NP-metil butirat (substrat chiral): 10.0; *p*NP-palmitat: 35.9 și *p*NP-oleat: 39.4.

Capitolul 4. Clonarea și caracterizarea unei Est/Lip termofile provenind de la *Anoxybacillus flavithermus* T1

Impedimentele survenite în cadrul experimentelor de purificare a enzimei în stare native ne-a determinat să clonăm gena enzimei, având avantajul cunoașterii secvenței acesteia din genomul deja secvențat al tulpinii *A. flavithermus* W1 (Saw *et al.*, 2008).

În cel de-al patrulea capitol al tezei de față am descris clonarea moleculară a genei carboxil-esterazei din *A. flavithermus* și exprimarea acesteia în *Escherichia coli* BL21 DE3. Purificarea și caracterizarea detaliată a Est/Lip recombinante sunt, de asemenea, prezentate.

Rezultate

Bazându-ne pe secvența genomului de la *A. flavithermus* am creat secvențele primerilor pentru a clona gena enzimei de interes. În vederea clonării genei am folosit polimeraza MyTaq, iar multiplicare plasmidică sau exprimarea carboxil-esterazei au fost realizate cu ajutorul vectorului pET 20b (+) introdus ulterior în *E. coli* XL1 Blue sau *E. coli* BL21 DE3.

Est/Lip a fost purificată din spațiul periplasmic utilizând un procedeu în două etape indicat de producătorul Novagen. Acest procedeu implică destabilizarea membranelor și cromatografia de afinitate pe bază de Ni-agaroză. Etapele purificării au fost analizate pe SDS-PAGE (fig. 3).

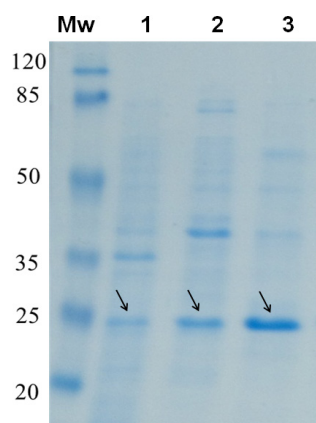


Figura 3. Gel denaturant SDS-PAGE în vederea analizării etapelor de purificare a Est/Lip. MW: marker de masă moleculară; banda 1: extract de celule, 5 h inducere cu IPTG; banda 2: fracția periplasmică; banda 3: enzima purificată în urma trecerii pe cromatografie de afinitate pe bază de Ni²⁺

Am analizat de asemenea structura tridimensională a modelului Est/Lip din tulpina *A. flavithermus* T1, pe baza similarității ridicate cu Est 30 din *Geobacillus stearothermophilus* (Liu *et al.*, 2004; Montoro-Garcia *et al.*, 2009), a cărei structură cristalină a fost deja determinată. Astfel s-a arătat că partea centrală a enzimei este compusă din șapte foi β -pliate, cu prima foaie β -pliată de la capătul N-terminal în poziție antiparalelă cu restul. Lidul este reprezentat ca o regiune distinctă de domeniul de bază, elicoidală fiind alcătuit din două α -helixuri și un 3_{10} -helix (fig. 4).

Astfel, proteina prezintă structura specifică carboxylester-hidrolazelor formată din α -helixuri și foi β -pliate. Prin comparație cu carboxil-esteraza din *Geobacillus stearothermophilus* mai sus menționată am propus drept amino acizi catalitici următorii: Ser 93, Asp 192 și His 222.

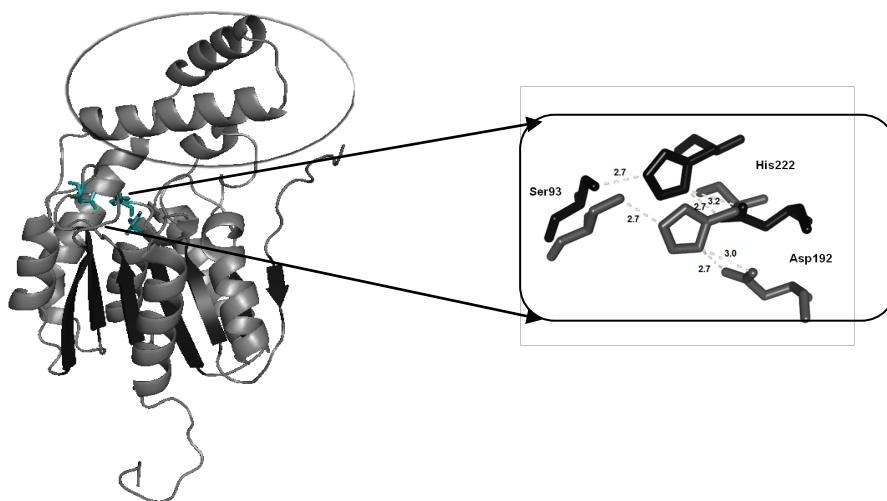


Figura 4. Diagrama structurii tridimensionale a Est/Lip. Lidul este marcat în partea de sus a structurii. Modelele-băț albastre reprezintă amino-acizi catalitici, detaliați în partea dreaptă: *A. flavithermus* T1 Est / Lip (în gri) și de *G. stearothermophilus* Est30 (în negru).

Caracteristicile enzimei recombinată purificată diferă într-o anumită măsură de enzima parțial purificată. Est/Lip recombinată are temperatura optimă de 60°C, atunci când activitatea a fost

măsurată cu *p*NPA și 65°C atunci când *p*NPP a fost utilizat drept substrat. La temperatura de 60°C Est/Lip a avut un timp de înjumătățire de aproximativ 5 ore. pH-ul optim este mai degrabă un interval de valori de pH-ului: 6.5 - 8.

Toți ioni metalici testați au inhibat Est/Lip. Metalele din grupele I și II au avut un efect inhibitor limitat, cu excepția magneziului, care a determinat o scădere de activitate cu aproximativ 70%. Dintre metalele de tranziție, Co^{2+} a exercitat cel mai puternic efect inhibitor inactivând enzima complet iar în prezență de Fe^{3+} , Cu^{2+} și a Hg^{2+} Est/Lip a reținut o activitate reziduală de aproximativ 10%.

Enzima și-a păstrat o mare parte din activitate (peste 60%) în prezență de 10% metanol și 10% DMSO. Creșterea concentrațiilor de metanol însă a dus la inactivarea Est/Lip pură. DMSO s-a dovedit mai compatibil cu Est/Lip, permițând păstrarea unor valori relativ mari de activitate până la o concentrație a acestui solvent de până la 30%. Acetonitrilul, de asemenea, pare a fi relativ bine tolerat de enzimă aceasta păstrând mai mult de 10% activitate la 20% concentrație solvent.

Testarea efectului unor detergent asupra enzimei s-a realizat în prezență de docdecil-sulfat de sodium (SDS), etilen-diamino tetraacetic (EDTA), Triton X-100 și β -mercaptoetanol (bME). SDS în concentrații de 1-10-100 μM și Triton X-100 în concentrații de 0.01-0.5% au exercitat un efect ușor inhibitor asupra Est/Lip în probele neincubate. Cu toate acestea, prezența unei concentrații scăzute a ambilor detergenții (1 μM SDS, respectiv 0.01-0.05% Triton X-100), au avut un efect mai pronunțat de stabilizare termică. O concentrație de 1 mM β -ME nu a afectat activitatea și a îmbunătățit ușor termostabilitatea enzimei. Atunci când este asociată cu incubare prelungită la 60°C, concentrația de 100 mM β -ME duce la o inactivare completă a enzimei.

Am testat din nou specificitatea Est/Lip, iar rezultatele au arătat o diferență mare față de extractul enzymatic brut: *p*NP - acetat: 61.3 ± 1.5 ; *p*NP - propionat: 84.1 ± 3.4 ; ***p*NP-butirat: 167.1 ± 2.7 ; *p*NP-metil butirat (substrat chirală): 149.1 ± 32.6** ; *p*NP-caprate: 73.6 ± 2.9 ; *p*NP-palmitat: 1.4 ± 0.3 ; *p*NP-oleat: 3.2 ± 0.4 ; trioleină: 14.3. Activitățile sunt exprimate în U/mg. Parametrii cinetici au fost calculați pentru enzima purificată și tabelul de mai jos rezumă rezultatele.

Tabel 2. Parametri cinetici pentru Est/Lip din *A. flavithermus* T1 măsurați față de *p*NPA and *p*NPP.

Datele au fost analizate cu ajutorul ecuației Hill, în OriginPro 6.1

Substrate	v_{\max} ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	K_M (μM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)	N
<i>p</i> NPA	82.89 ± 1.56	34.14 ± 1.37	7.34	0.21	1.96 ± 0.16
<i>p</i> NPP	1.44 ± 0.08	23.48 ± 3.88	0.12	0.0052	1.85 ± 0.32

Capitolul 5. Optimizarea expresiei și purificării Est/Lip

Clonarea moleculară și exprimarea proteinelor în microorganisme heterologe a devenit în ultimii ani o tehnică larg răspândită. Optimizarea randamentului și a purificării și eficiența costurilor a

transformat această metodă într-un mod convenabil de a obține proteine dorite cu un grad înalt de puritate. Exprimarea proteinelor heterologe în organismele gazdă poate să devină o povară pentru celulă (Han și Lee, 2006). IPTG (izopropil β -D-1-tiogalactopiranozidă), un derivat al lactozei, frecvent utilizat pentru inducerea exprimării proteinelor recombinante, este de asemenea toxic pentru microorganismul gazdă, fiind imposibil de metabolizat (Farmer *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2004).

În acest capitol descriem optimizarea procesului de exprimare a Es/Lip clonată, cu scopul de a identifica un set de condiții experimentale, care să permită exprimarea optimă a Est/Lip recombinante. Parametri investigați au fost natura inductorului, concentrația de IPTG, precum și influența temperaturii și a timpului de inducție. De asemenea, câteva metode în vederea destabilizării membranei au fost testate în vederea unei recuperări mai eficiente a enzimei din spațiul periplasmic.

Rezultate

Rezultatele arată că un randament ridicat al exprimării proteice poate fi atins în cazul în care inducerea se efectuează la 37°C, utilizând 5 IPTG mM și permițând o creștere celulară de 8h după inducție. Cu toate acestea, rezultate aproape similare au fost obținute și în cazul în care inducția a fost efectuată la 30°C, cu o concentrație de IPTG mult mai mică (0,4 mM) și după doar 1 oră de inducție. Având în vedere aspect legate de costuri și de timp-eficacitate, parametri din urmă ar putea fi o alternativă satisfăcătoare și cea mai bună opțiune practică.

Creșterea celulelor și exprimarea enzimei au înregistrat valori mai bune în cazul adăugării în cultura gazdă unei concentrații de 10 mM lactoză în comparație cu 0.1 IPTG mM (fig. 5 și 6). Testele de activitate și analiza cu ajutorul electroforezei au confirmat o exprimare mai eficientă în cazul folosirii lactozei. În concordanță cu rezultatele anterioare, cel mai bun randament a fost atins la 8 ore după inducție.

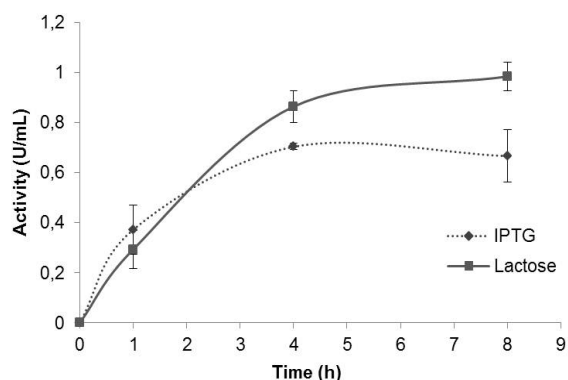


Figura 5. Activitatea Est/Lip în urma inducției cu 0.1 mM IPTG sau 10 mM lactoză

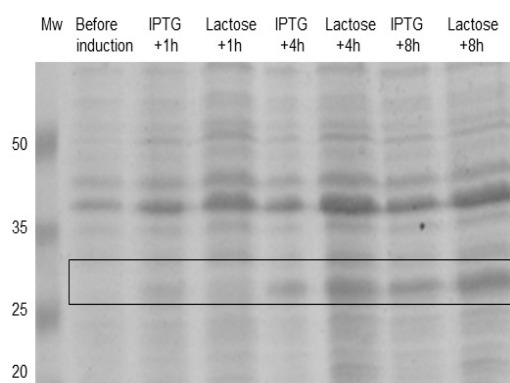


Figura 6. SDS-PAGE denaturant: monitorizarea în timp a exprimării Est/Lip după inducerea cu 0.1 mM IPTG sau 10 mM lactoză

Destabilizarea membranelor

Cea mai mare activitate exprimată de Est/Lip în fracția periplasmică a fost recuperată în urma tratamentului îngheț-dezghet. Rezultate similare au fost înregistrate prin utilizarea protocolului standard de șoc osmotic cu ajutorul soluției tampon Tris-zaharoză-EDTA-MgSO₄. Utilizarea de solvenți precum DMSO și cloroform ca agenți destabilizatori de membrană a dus la o recuperare mai mică atât a enzimei cât și a activității, dar cu valori încă satisfăcătoare (tabelul 3).

Tabelul 3. Recuperarea activității Est/Lip din fracțiunea periplasmică utilizând diverse metode destabilizare membranară

Metoda	Concentrație	Activitate (U/mL) ±dev.st
Șoc osmotic/EDTA/MgSO ₄	1 mM/5 mM	1.36 ± 0.26
DMSO	1%	1.19 ± 0.01
Cloroform	1%	1.00 ± 0.12
Îngheț-dezghet (5 cicluri)	-	1.47 ± 0.06

Capitolul 6. Aplicații ale Est/Lip recombinată de la *A.flavithermus* T1 în reacții de biocataliză

Genul *Anoxybacillus*, amintit în 1982 de către Heinen, a fost descris doar recent. Printre speciile de *Anoxybacillus* deja cunoscute există enzime descrise ca deținând un rol important în biotransformări.

Ibrahim și Ahmed (2007) au purificat o celulază de interes biotehnologic din *Anoxybacillus flavithermus*. O esterază care acționează precum o poli-hidroxiacanoat (PHA)-depolimerază a fost raportată a fi secretată de către *A. gonensis* G2 (Çolak *et al.*, 2005). O lipază termostabilă din *A. kamchatkensis* a fost descris mai recent (Olusesan *et al.*, 2009), care a păstrat mai mult de 50% din activitatea după 30 de minute la 80°C. Carboxil-esteraza parțial purificat de la *A. gonensis* A4 (Faiz *et al.*, 2007) și Est/Lip de la *Anoxybacillus* sp.PDF1 nu au fost utilizate până în prezent în biotransformări.

Rezultate

Est/Lip a arătat enantioselectivitate înaltă față de câteva substraturi din cele alese. Rezultatele arată că enzima noastră poate fi utilizată în reacții de hidroliză blândă. Termostabilitatea enzimei poate fi exploatată prin metode evoluție dirijată în viitoare experimente. Scopul este de a obține o enzimă mai activă din punct de vedere biocatalitic (Reetz, 2004).

Concluzii generale

În concluzie, noua tulpină de *Anoxybacillus flavithermus* izolată reprezintă o sursă locală de enzime hidrolitice termostabile, care prezintă o bună activitate esterolitică/lipolitică.

Extractul enzimatic brut (precipitatul cu acetone) prezintă temperatura optimă de lucru înaltă (70°C), termostabilitate bună, toleranță la solvent organici și o specificitate de substrat scăzută. Toate aceste caracteristici arată faptul că acest complex enzimatic poate fi utilizat în aplicații biotehnologice. Purificarea enzimei native a întâmpinat dificultăți, probabil datorită tendinței de agregare, fenomen care a dus la o recuperare scăzută atât a activității cât și a enzimei.

Clonarea Est/Lip din *Anoxybacillus flavithermus* T1 a fost realizată cu succes la Institutul de Enzimologie din Budapesta, Ungaria. Enzima a fost introdusă în *E.coli* BL21 DE3 în vederea exprimării și caracterizării. Exprimarea a fost realizată cu succes deși gazda este un microorganism mezofil, în timp ce enzima are proveniență termofilă. Testată în condiții asemănătoare cu cele utilizate în cazul enzimei parțial purificată, enzima recombinată a înregistrat modificări de activitate și stabilitate. Temperatura optimă a enzimei recombinante este 60-65°C. La 60°C și pH 8 timpul de înjumătățire al enzimei a fost de aproximativ 5 ore. Enzima tolerează, deși în concentrații mici (30%) solvenți organici precum acetonitril și DMSO. Analiza specificității de substrat a arătat o preferință pentru *p*NP esterificat cu acid butiric (C4), un substrat specific esterazelor.

Diferențele dintre complexul enzimatic obținut prin precipitare cu acetonă și cea recombinată purificată sunt o confirmare a necesității purității enzimei pentru o caracterizare corectă a acesteia. Totuși, stabilitatea termică a fost pierdută prin purificare, față de Est/Lip parțial purificată.

În cazul optimizării exprimării Est/Lip recombinată parametri optimi s-au dovedit a fi temperatura de 30°C, 0.4 mM concentrație IPTG și o oră de la inducție. De asemenea, lactoza este o alternativă preferabilă IPTG-ului, atât din punctul de vedere al costului cât și al toxicității scăzute. Purificarea Est/Lip din spațiul periplasmic a fost mai eficientă utilizând șocul osmotic și destabilizarea membranei prin cicluri repetate de îngheț-dezgeț. Utilizarea solvenților precum DMSO și cloroform au interferat cu activitatea enzimatică chiar dacă recuperarea Est/Lip a fost comparabilă cu cea prin celelalte două metode amintite.

Utilizarea enzimei recombinante în vederea stabilirii importanței în biocataliză a dus la rezultate care indică o selectivitate crescută la temperaturi moderate (45-50°C), inclusiv în reacții cu substraturi voluminoase.

Noutatea prezentei teze o constituie izolarea unei bacterii termofile de pe teritoriul țării noastre și clonarea și caracterizarea Est/Lip. De asemenea, am semnalat pentru prima dată utilizarea enzimei în reacții de biocataliză cu rezultate bune.

Referințe:

1. Arpigny, J. L., Jaeger K. E. Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties *Biochem. J.* **1999**, *343*, 177-183.
2. Çolak, A., Sişik, D., Sağlam, N., Güner, S., Canakçi, S., Beldüz, A. O. Characterization of a thermoalkalophilic esterase from a novel thermophilic bacterium, *Anoxybacillus gonensis* G2, *Bioresour. Technol.* **2005**, *96*, 625-631.
3. Faiz, Ö., Çolak, A., Sağlam, N., Çanakçi, S., Beldüz, A. O. Determination and characterization of thermostable esterolytic activity from a novel thermophilic bacterium *Anoxybacillus gonensis* A4, *J. Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *40*, 588-594.
4. Farmer, C. S., Kurtz, D. M. Jr., Phillips, R. S., Ai, J., Sanders-Loehr, J. A leucine residue “gates” solvent but not O access to the binding pocket of *Phascolopsis gouldii* hemerythrin, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17043-17050
5. Gorokhova, I. V., Ivanov, A. E., Zubov, V. P. Coprecipitation of *Pseudomonas fluorescens* lipase with hydrophobic compounds as an approach to its immobilization for catalysis in nonaqueous media, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2002**, *28*, 38-43.
6. Han, M. J., Lee, S. Y. The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects, *Microbiol. Mol. Biol. R.* **2006**, *70*, 362-439.
7. Ibrahim, A. S. S., Ahmed, I.E. Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme, *Aust. J. Basic. Appl. Sci.* **2007**, *1*, 473-478.
8. Liu, P., Wang, Y. F., Ewis, H. E., Abdelal, A. T., Lu, C. D., Harrison, R. W., Weber, I. T. Covalent reaction intermediate revealed in crystal structure of the *Geobacillus stearotherophilus* carboxylesterase Est30, *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 551-561.
9. Montoro-García, S., Martínez-Martínez, I., García-Carmona, F., Navarro-Fernández, J., Takami, H., Sánchez-Ferrer, A. Characterization of a novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426 shows the existence of a new carboxylesterase family, *J. Bacteriol.* **2009**, *19*, 3076-3085.
10. Olusesan, A. T. Azura, L. K., Abubakar, F., Hamid, N. S. A., Radu, S., Saari, N. Phenotypic and molecular identification of a novel thermophilic *Anoxybacillus* species: a lipase-producing bacterium isolated from a Malaysian hot spring, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *25*, 1981-1988.
11. Rietz, M.T. Controlling the enantioselectivity of enzymes by directed evolution: practical and theoretical ramifications, *PNAS.* **2004**, *101*, 5716-5722.
12. Saw, J. H., Mountain, B. W., Feng, L., Omelchenko, M. V., Hou, S., Saito, J. A., Stott, M. B., Li, D., Zhao, G., Wu, J., Galperin, M. Y., Koonin, M. V., Makarova, K. S., Wolf, Y., Rigden, D. J., Dunfield, P. F., Wang, L., Alam, M. Encapsulated in silica: genome, proteome and physiology of the thermophilic bacterium *Anoxybacillus flavithermus* WK1, *Genome Biol.*, **2008**, *9*.
13. Yan, J., Zhao, S. F., Mao, Y. F., Luo, Y. H. Effects of lactose as an inducer on expression of *Helicobacter pylori* rUreB and rHpaA, and *Escherichia coli* rLTKA63 and rLTB, *World J. Gastroentero.* **2004**, *10*, 1755-1758.